

DETECCIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL *Cymbidium* (CymMV) Y DEL VIRUS DE LA MANCHA ANILLADA DEL *Odontoglossum* (ORSV) EN ORQUÍDEAS CULTIVADAS EN COSTA RICA

DETECTION OF *Cymbidium* MOSAIC VIRUS (CymMV) AND *Odontoglossum* RINGSPOT VIRUS (ORSV) IN ORCHIDS GROWN IN COSTA RICA

Alejandro Arce-Rodríguez¹, Wayner Montero-Carmona², Ingrid Varela² y Omar Gätjens-Boniche^{3*}

¹ Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig 38106, Alemania.

² Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales, Escuela de Agronomía, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Apartado Postal 223-21001, Santa Clara, San Carlos, Alajuela, Costa Rica.

³ Laboratorio de Biología Molecular, : Escuela de Ciencias Naturales y Exactas, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Apartado Postal 223- 21001, Santa Clara, San Carlos, Alajuela, Costa Rica.

RESUMEN

El virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) y el virus de la mancha anillada de *Odontoglossum* (ORSV) son los agentes virales más importantes en orquídeas debido a su alta incidencia y a los daños económicos que causan. Ambos virus fueron detectados simultáneamente en orquídeas provenientes de dos viveros costarricenses por medio de la técnica TD/RT-PCR (*Touchdown/Retrotranscription-Polimerase Chain Reaction*). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa y por medio de un sistema de electroforesis automatizada por microchip (MultiNa-Shimadzu). El 52% de las 21 plantas analizadas resultaron positivas para la presencia de al menos uno de los dos virus. El CymMV presentó la mayor infección con 33%, en comparación con el 14% de plantas infectadas con el ORSV. Solamente una planta evidenció infección mixta por ambos virus. Se encontraron además dos plantas asintomáticas infectadas con el CymMV. Se detectó también la infección por virus CymMV en la orquídea *Lycaste aromatica*, una especie nativa de Costa Rica. La utilización de la técnica TD/RT-PCR en combinación con la electroforesis automatizada por microchip permitió detectar simultáneamente el CymMV y el ORSV con una mayor sensibilidad, rapidez y con menor costo en comparación con otras técnicas como el ELISA.

Palabras clave: CymMV, ORSV, Orquídea, Touchdown/RT-PCR, Costa Rica.

ABSTRACT

The *Cymbidium* mosaic potexvirus (CymMV) and the *Odontoglossum* ringspot tobamovirus (ORSV) are the most problematic orchid infecting viruses due to their worldwide distribution, prevalence and economic impact. By implementing a Touchdown/Reverse Transcription-PCR reaction (TD/RT-PCR), it was possible to detect both single and mixed infections of CymMV and ORSV in different orchid species in two nurseries in Costa Rica. PCR products were analyzed by traditional agarose gel electrophoresis and by automatic microchip electrophoresis (MultiNa-Shimadzu).

Autor para correspondencia: Omar Gätjens-Boniche
Correo electrónico: ogatjens@itcr.ac.cr y ogatjensboniche@gmail.com

Recibido: 20 de octubre de 2013

Aceptado: 25 de marzo de 2014

From 21 orchids analyzed, 52% presented contamination with at least one virus, being the infection with CymMV (33%) more frequent than the infection with ORSV (14%). Moreover, one specimen of *Laelia lobata* presented mixed contamination with both viruses. We also found two asymptomatic plants infected with CymMV. An infection of a native orchid from Costa Rica (*Lycaste aromatica*) with CymMV was also detected. Using the TD/RT-PCR protocol and the microchip automatic electrophoresis system, we demonstrated that it is possible to simultaneously detect the infection with CymMV and ORSV with a relatively less time-consuming, more sensitive, accurate and comparatively cheaper method than other usually employed, like ELISA.

Keywords: CymMV, ORSV, Orchid, Touchdown/RT-PCR, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son plantas herbáceas perennes pertenecientes a la familia Orchidaceae y a la clase Liliopsida (Monocotiledóneas; Rivera, 1998). Esta familia de plantas es la productora de flores más grande del Reino Vegetal. Se estima que existen al menos 24 000 ejemplares agrupados en alrededor de 800 géneros distintos (Fay y Chase, 2009), a los que deben sumarse los más de 70 000 híbridos artificiales producidos (Rivera, 1998). De estos especímenes, Costa Rica se destaca por abarcar en su pequeño territorio alrededor de 1360 especies pertenecientes a 180 géneros distintos, de las cuales 356 se consideran endémicas del país (Pupulin, 2002).

Las orquídeas tienen comparativamente una mayor cantidad de enfermedades causadas por patógenos virales que la mayoría de los cultivos conocidos. En este sentido, se conocen alrededor de 30 tipos de virus que infectan este tipo de plantas (Lawson, 1990; Zettler *et al.*, 1990; Chacón, 2002). De estos virus, los dos más importantes son el potexvirus causante del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) y el tobamovirus de la mancha anillada del *Odontoglossum* (ORSV), debido principalmente a sus altos niveles de incidencia, su amplia distribución a nivel mundial y a los daños económicos que generan (Lawson, 1990; Zettler *et al.*, 1990; Hu *et al.*, 1994; Rivera, 1998).

El CymMV comúnmente ocasiona síntomas en las hojas que van desde estriados cloróticos hasta manchas necróticas y patrones lineales necróticos. Así mismo, las flores pueden presentar manchas necróticas (Lawson, 1990; Navalinskienė *et al.*, 2005; Rivera, 1998). El ORSV por su parte ocasiona mosaico y moteado clorótico, manchas en forma de anillo y ocasionalmente parches necróticos en hojas, así como variegado (Lawson, 1990; Gibbs *et al.*, 2000) y necrosis en las flores (Lakani *et al.*, 2010). Ambos virus pueden afectar también el crecimiento de la planta (Pearson y Cole, 1986), el tamaño de los bulbos (Chung *et al.*, 2010), la capacidad fotosintética de la planta, así como el desarrollo y tamaño de las inflorescencias (Chia y He, 1999; He *et al.*, 2004). A pesar de la severidad de los síntomas, el CymMV y el ORSV ocasionalmente se muestran asintomáticos, por lo que suelen pasar desapercibidos en plantas aparentemente sanas (Zettler *et al.*, 1990). Por otra parte, los síntomas de la infección suelen también ser confundidos con enfermedades causadas por otros patógenos o con desórdenes fisiológicos (Lawson, 1990; Rivera, 1998).

No existen vectores naturales conocidos que ayuden a dispersar estos dos virus. Sin embargo, sí se conoce su dispersión a través de las herramientas contaminadas durante las prácticas tradicionales de cultivo y en el cultivo de tejidos (Zettler *et al.*, 1990; Chia *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1994). Por lo anterior, existe la necesidad de buscar sistemas de detección viral precisos, que permitan la detección y estudio de las enfermedades virales más comunes en orquídeas de interés comercial. En este sentido, el diagnóstico basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se muestra como un método más sensitivo, confiable y rápido para la detección de pequeñas cantidades de partículas virales en comparación con otras técnicas comúnmente utilizadas como el ELISA o la microscopía electrónica (Seoh *et al.*, 1998).

El objetivo principal de esta investigación fue la implementación de un sistema de detección simultánea para el CymMV y el ORSV mediante un procedimiento de touch-down/retrotranscripción-PCR (TD/RT-PCR), en orquídeas presentes en dos viveros costarricenses, que permita disminuir el tiempo y los recursos económicos que se requieren para la detección viral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material experimental

Las muestras de orquídeas se tomaron de dos viveros ubicados en el cantón central de la provincia de Alajuela (Costa Rica) durante el mes de julio de 2006. El vivero A corresponde a una colección de orquídeas, compuesta predominantemente de híbridos de *Cattleya*, mientras que en el vivero B se encuentran orquídeas para colección y para comercialización, especialmente especies de *Cattleya* y *Phalaenopsis* (Tabla 1).

Para la recolección de las muestras, se cortaron segmentos de hoja de plantas con síntomas típicos de virosis y plantas asintomáticas, tomadas mediante muestreo al azar en distintas áreas de los viveros mencionados. Durante la

toma de cada muestra, se desinfectó la navaja mediante flameo con etanol al 70% y la herida en la planta se cubrió con la aplicación de sellador Agrofíxer®. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético y se colocaron en hielo para su traslado al laboratorio. Simultáneamente, se le asignó un código a cada muestra en donde se indicó el nombre de la especie y síntomas en las hojas, flores (en el caso de las plantas con floración) y bulbos o rizomas, así como otras características para la identificación de la planta, correlacionando así sus síntomas con la posible infección viral (Tabla 1). Las muestras se analizaron en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos.

Se evaluó la infección del CymMV y el ORSV en un total de 21 orquídeas de diversos géneros. Como control positivo para el CymMV, se utilizó material *in-vitro* de una *Brassolaeliocattleya* Blue Grotto 'Blue Luste' infectada con éste virus. Cabe destacar que ésta misma planta presentó una infección mixta con el ORSV, como pudimos determinar mediante TD/RT-PCR (ver resultados). Por lo tanto, se utilizó esta misma muestra como control positivo del ORSV. Como control negativo de infección, se utilizó tejido vegetal de una *Guarianthe skinneri* libre de virus. La infección del CymMV en las plantas utilizadas como controles también se determinó mediante pruebas de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), realizadas en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica (datos no mostrados).

Extracción de los ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos totales (ANT) se realizó acorde al método de la solución tampón CTAB descrito por Gibbs y Mackenzie (1997) con algunas modificaciones. Para ello se tomaron 100 mg de tejido foliar en un tubo de 1.5 mL y se maceraron con ayuda de un pistilo de vidrio o por medio de palillos de madera debidamente esterilizados, manteniendo la muestra siempre sobre hielo. Se añadieron 600 µL de solución amortiguadora de extracción CTAB (2% bromuro de cetiltrimetilamonio [CTAB], 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.5% β-mercaptoetanol) y se continuó con la maceración de la muestra, la cual posteriormente se incubó a 55 °C por 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 400 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) a la muestra, la cual se agitó vigorosamente con ayuda del vórtex y se centrifugó durante 10 min a 14 500 rpm. En un tubo nuevo se rescató la fase acuosa y se mezcló con 0.1 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M y un volumen de isopropanol. Esta mezcla se incubó 10 min a 4 °C y posteriormente se centrifugó a 14 500 rpm otros 10 min, descartando la fase acuosa. El precipitado de ácidos nucleicos se lavó con 1 mL de etanol 70% y se dejó secar. Finalmente los ácidos nucleicos totales fueron reconstituidos en 50 µL de agua calidad PCR (Promega Corporation. Madison, Wisconsin. EEUU).

Adicionalmente, se utilizó el kit RNeasy® (QIAGEN) para extraer los ARN totales y así comparar los resultados obtenidos con este método y los del método de CTAB. La me-

tecnologías de extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

“Detección del CymMV y el ORSV mediante TD/RT-PCR

La detección simultánea del CymMV y el ORSV se realizó basándose en la técnica de TD/RT-PCR descrita por Seoh y colaboradores (1998), la cual utiliza un mismo par de cebadores degenerados para detectar ambos virus en una misma reacción. La retrotranscripción de los ARN virales, así como la Reacción en Cadena de la Polimerasa con protocolo de *touch-down* (TD/RT-PCR) a partir del ADN complementario (ADNc) de los virus, se realizaron de forma simultánea en un termociclador PTC-200 (MJ Research, Waltham, Massachusetts, EEUU). Antes de llevar a cabo el análisis de las muestras se estandarizó la cantidad de ácidos nucleicos y de transcriptasa reversa óptimos para las reacciones. Ambas reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL conteniendo 1 volumen de solución amortiguadora de PCR, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de mezcla de dNTPs, 2 U de Taq Polimerasa (Fermentas Life Sciences, Lituania), 1 volumen de solución amortiguadora para la transcriptasa reversa, 20U de transcriptasa reversa RevertAid™M-MuLV (Fermentas Life Sciences, Lituania) y 1.2 µM de cada uno de los oligonucleótidos degenerados L1 [5'-(C,T)(A,G)T(A,C)TG(A,T)G(A,G)ACATCCTTT-3'] y U1,3 [5'-C(A,C)(A,T)AATCTTGACATTCGC-3'] (Invitrogen Life Technologies, Ontario, Canadá). Como molde para las reacciones se utilizaron 5 µL de una dilución apropiada de ácidos nucleicos totales obtenidos mediante el método de CTAB o 5 µL de ARN extraído mediante el kit comercial de Qiagen. El perfil térmico para la reacción de TD/RT-PCR consistió en 1 ciclo de retrotranscripción a 48 °C durante 45 min, seguido por un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, 30 ciclos de amplificación (1 min a 94 °C, 1 min desde

55 °C hasta 40 °C y 1 min a 68 °C) y un ciclo final de extensión de 5 min a 68 °C. Por tratarse de un protocolo *touchdown*, la temperatura de alineamiento inicial de los oligonucleótidos con el ADNc molde, fue de 55 °C y disminuyó en 0.5 °C durante cada uno de los 29 ciclos siguientes hasta alcanzar finalmente los 40 °C.

Interpretación de resultados

Dos metodologías fueron utilizadas para separar y analizar los fragmentos de ADN amplificados por la reacción de PCR. Para la primera metodología se utilizó la electroforesis en geles de agarosa al 1.5-1.7% preparados en solución amortiguadora TBE 0.5X y teñidos con bromuro de etidio. La visualización y análisis de las bandas se realizó mediante el sistema de captura digital Edas 290 de Kodak. En la segunda metodología se utilizó un sistema más rápido y preciso para separar, analizar, cuantificar y medir la longitud de los productos de amplificación por PCR. Para esto, se empleó el sistema MultiNA de electroforesis automatizado por microchip (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japón) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

RESULTADOS

Mediante la implementación de la técnica de TD/RT-PCR se obtuvo la amplificación de dos segmentos de ADN de distinta longitud para las muestras aisladas a partir de material vegetal de la planta *Brassolaeliocattleya* Blue Grotto 'Blue Luste', la cual fue positiva para CymMV mediante ELISA. El segmento de mayor tamaño presentó una longitud de entre 500 a 600 pb, mientras que el fragmento menor presentó un tamaño aparente de 300 pb (Figs. 1 y 3). La longitud de los fragmentos obtenidos concuerdan con la de los productos de amplificación previamente reportados por Seoh y colaboradores

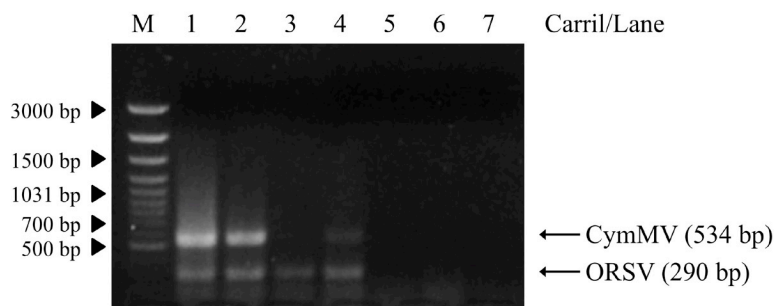


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN específicos del CymMV y el ORSV amplificados mediante TD/RT-PCR. Las reacciones se realizaron por duplicado a partir del material genético total aislado mediante el método de CTAB (ver Materiales y métodos). Carriles 1-4: muestras obtenidas a partir de la *Brassolaeliocattleya* (Blc) Blue Grotto 'Blue Luste' infectada con el CymMV y el ORSV. Los carriles 1-2 y 3-4 corresponden a dos réplicas realizadas con una dilución 1:10 y una dilución 1:25 de ácidos nucleicos totales, respectivamente. Carriles 5 y 6: muestras de la *G. skinneri* libre de virus. Carril 7: control negativo de la RT-PCR sin ácidos nucleicos añadidos. Carril M: Marcador GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus.

Figure 1. Agarose-gel electrophoresis of CymMV and ORSV specific DNA fragments amplified by TD/RT-PCR. Reactions were carried out in duplicates from total nucleic acids samples isolated using the CTAB protocol. Lanes 1-4: Samples from *Brassolaeliocattleya* (Blc) Blue Grotto 'Blue Luste' infected with CymMV and ORSV. The lanes 1-2 and 3-4 correspond to duplicates made with 1:10 and 1:25 dilution of total nucleic acids isolated with the ANT method, respectively. Lanes 5-6: Virus-free *G. skinneri* sample. Lane 7: RT-PCR negative control without nucleic acids. Lane M: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus.

(1998), y que corresponden a segmentos específicos de la región codificante para la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) del CymMV (banda de 534 pb) y del ORSV (banda de 291 pb) (Chng *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1997). Para confirmar el tamaño exacto de los fragmentos de ADN obtenidos a partir del material vegetal, los productos de amplificación fueron posteriormente analizados mediante el sistema MultiNA de electroforesis en microchip (Figura 2). Mediante este método se pudo determinar que el fragmento de ADN más grande presentó una longitud promedio de 547 pb, similar a los 534 pb reportados previamente para el CymMV, mientras que el fragmento de menor tamaño presentó una longitud promedio de 291 pb, lo cual lo correlaciona perfectamente con el amplicón esperado para el ORSV (Seoh *et al.*, 1998). Estos resultados confirman no solamente que la técnica utilizada permite amplificar y detectar simultáneamente regiones específicas para el CymMV y el ORSV, sino también que la orquídea control *Brassolaeliocattleya* Blue Grotto 'Blue Luste' presenta una infección mixta por ambos virus.

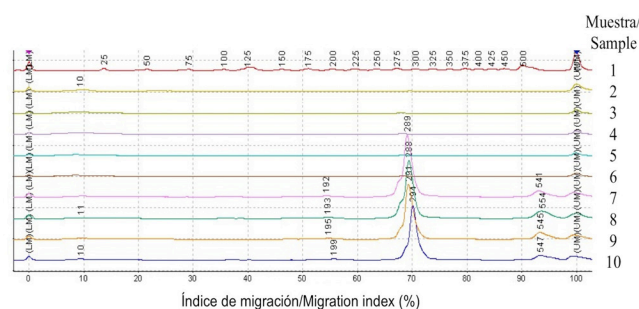


Figura 2. Detección mediante el sistema MultiNA de electroforesis en microchip de los fragmentos específicos de ADN amplificados para el CymMV y el ORSV. Las reacciones se realizaron por duplicado. Muestra 1: marcador de peso molecular. Muestra 2: control negativo de reacción sin ácidos nucleicos añadidos. Muestras 3-6: réplicas de la reacción de RT-PCR utilizando la *G. skinneri* libre de virus, cuyos ácidos nucleicos se obtuvieron mediante el protocolo de extracción con CTAB (muestras 3 y 5) o mediante un kit comercial (4 y 6). Muestras 7-10: réplicas de la *Brassolaeliocattleya* (Blc) Blue Grotto 'Blue Luste' infectada con el CymMV y el ORSV, cuyos ácidos nucleicos se obtuvieron mediante el método de CTAB (muestras 6 y 8) o mediante un kit comercial (7 y 9).

Figure 2. Detection of the specific amplification fragments from CymMV and ORSV by MultiNA microchip electrophoresis. Reactions were carried out in duplicates. Sample 1: Molecular weight marker. Sample 2: PCR Negative control. Samples 2-6: TD/RT-PCR reaction using total nucleic acids from virus-free *G. skinneri*. The nucleic acids were extracted by the CTAB protocol (samples 3 and 5) or by the Qiagen commercial kit (samples 4 and 6). Samples 7-10: TD/RT-PCR reaction from CymMV/ORSV infected *Brassolaeliocattleya* (Blc) Blue Grotto 'Blue Luste'. The nucleic acids were extracted by the CTAB isolation method (samples 6 and 8) or by the Qiagen commercial kit (samples 7 and 10).

Respecto a la estandarización del protocolo de TD/RT-PCR se encontró que la concentración adecuada de ácidos nucleicos totales se encontraba entre la dilución 1:10 y 1:25 (Figura 1), las cuales se realizaron añadiendo 5 μ L de material genético en 45 μ L y en 120 μ L de agua calidad PCR, respectivamente. Debido a estos resultados, se decidió trabajar con diluciones 1:15 del material genético extraído. Por otra parte,

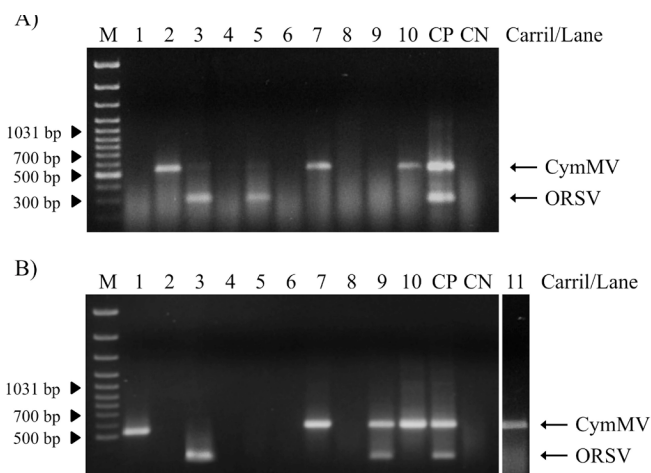


Figura 3. Detección del CymMV y el ORSV mediante TD/RT-PCR en las orquídeas procedentes de los dos viveros analizados. El material genético se extrajo mediante el método de CTAB. (A) Especímenes del vivero A. Carriles 1: *Cattleya trianae*; 2: *C. maxima*; 3, 5 y 10: Cattleyas híbridas; 4: *C. burana beauty*; 6: *C. tutankamon*; 7: *C. yellow button*; 8: *Oncidium fuscatum*; 9: *Prosthechea tardiflora*; CP: Control positivo de infección correspondiente a la Blc Blue Grotto 'Blue Luste' infectada; CN: Control negativo de infección correspondiente a la *G. skinneri* libre de virus. (B) Especímenes del vivero B. Carriles 1: *Cattleya intermedia*; 2: *Laelia juvelis*; 3: *C. forbesii*; 4: *Phalaenopsis* Pink Stripes; 5: *Phalaenopsis* Golden Peoker; 6: *Phalaenopsis* Little Fly; 7: *Lycaste aromatica*; 8: Blc tierra de amor; 9: *Laelia lobata*; 10: *Enciclya alata* x *E. cordigera*; 11: *Cymbidium* sp.; CP: Control positivo de infección correspondiente a la Blc Blue Grotto 'Blue Luste' infectada; CN: Control negativo de infección correspondiente a la *G. skinneri* libre de virus.

Figure 3. Detection of CymMV and ORSV by TD/RT-PCR in orchids bred in two nurseries. The nucleic acids from the samples were isolated using the CTAB protocol. (A) Orchids from nursery A. Lane 1: *Cattleya trianae*; 2: *C. maxima*; 3, 5 and 10: *Cattleya* hybrids; 4: *C. burana beauty*; 6: *C. tutankamon*; 7: *C. yellow button*; 8: *Oncidium fuscatum*; 9: *Prosthechea tardiflora*; CP: Positive control of viral infection (Blc Blue Grotto 'Blue Luste'); CN: Negative control of viral infection (virus-free *G. skinneri*). (B) Orchids from nursery B. Lane 1: *Cattleya intermedia*; 2: *Laelia juvelis*; 3: *C. forbesii*; 4: *Phalaenopsis* Pink Stripes; 5: *Phalaenopsis* Golden Peoker; 6: *Phalaenopsis* Little Fly; 7: *Lycaste aromatica*; 8: Blc "tierra de amor"; 9: *Laelia lobata*; 10: *Enciclya alata* x *E. cordigera*; 11: *Cymbidium* sp.; CP: Positive control of viral infection (Blc Blue Grotto 'Blue Luste'); CN: Negative control of viral infection (virus-free *G. skinneri*).

se observó también que al utilizar 50 U de enzima transcriptasa reversa se presentaba un ruido de fondo extendido a lo largo del carril en la muestra con la dilución 1:10 de ácidos nucleicos totales. Dicho ruido de fondo es posiblemente debido en gran parte a los ácidos nucleicos retrotranscritos tanto del virus como de la planta al agregar una gran cantidad de transcriptasa reversa. Debido a lo anterior, así como también a la alta concentración en la presentación utilizada de la enzima (200 U/ μ L), se decidió agregar 20 U de transcriptasa reversa en cada reacción. Particularmente, como se observa en el carril 3 de la Figura 1, la primera repetición del TD/RT-PCR con la dilución 1:25 de ácidos nucleicos totales no amplificó el ADNc correspondiente al CymMV, mientras que la segunda repetición con la misma muestra si presentó la banda correspondiente a la presencia de éste virus. Debido a esto se destaca la importancia de realizar varias repeticiones

con cada una de las muestras que se quiera analizar para tener mayor certeza en los resultados obtenidos mediante esta técnica.

Cabe destacar que los resultados obtenidos mediante el protocolo de extracción de ácidos nucleicos totales por CTAB fueron comparables con los resultados logrados al extraer el ARN de las muestras vegetales con un kit comercial, como se aprecia en los electroferogramas de la Figura 2. Esto corrobora que la calidad de los ácidos nucleicos extraídos mediante el protocolo tradicional es adecuada para certificar la presencia de ambos virus mediante la técnica de TD/RT-PCR.

De las 21 plantas analizadas de ambos viveros el 52% resultaron infectadas por al menos uno de los dos virus. De estas el 33% presentaron infección individual con el CymMV, mientras que el 14% resultaron infectadas solamente por el ORSV (Figura 3 y Tabla 1). Solamente una planta del total de

Tabla 1. Detección del virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) y el virus de la mancha anillada del *Odontoglossum* (ORSV) y sintomatología asociada en orquídeas provenientes de dos viveros de la provincia de Alajuela, Costa Rica.

Table 1. Detection of *Cymbidium* mosaic virus (CymMV) and *Odontoglossum* ringspot virus (ORSV) in orchids bred in two nurseries and description of symptoms observed.

Especie	Infección Viral	Síntomas en las hojas	Síntomas en las flores	Síntomas en bulbo/rizoma
Vivero A				
<i>Cattleya trianae</i>	N.D.	Necrosis	Flor deforme y arrugada. Patrones desordenados de pigmentación	Necrosis
<i>Cattleya maxima</i>	CymMV	Amarillamiento	Botones florales deformes. Patrones desordenados de pigmentación	S.S.
<i>Cattleya</i> híbrida	ORSV	Amarillamiento. Necrosis	S.F.	S.S.
<i>Cattleya burana beauty</i>	N.D.	Amarillamiento. Necrosis	S.F.	S.S.
<i>Cattleya</i> híbrida	ORSV	Amarillamiento. Rayado necrótico		
<i>Cattleya tutankamon</i>	N.D.	S.S.	S.F.	S.S.
<i>Cattleya yellow button</i>	CymMV	S.S.	S.F.	S.S.
<i>Oncidium fuscatum</i>	N.D.	S.S.	S.F.	S.S.
<i>Prosthechea tardiflora</i>	N.D.	Amarillamiento. Bandeado clorótico en las venas. Necrosis	S.F.	S.S.
<i>Cattleya</i> híbrida	CymMV	Amarillamiento. Deformación de la lámina foliar. Necrosis	S.F.	S.S.
Vivero B				
<i>Cattleya intermedia</i>	CymMV	S.S.	S.F.	S.S.
<i>Laelia juvelis</i>	N.D.	Deformación de la lámina foliar. Manchas cloróticas	S.F.	S.S.
<i>Cattleya forbessi</i>	ORSV	Manchas cloróticas en forma de anillo.	Flores deformes y arrugadas.	S.S.
<i>Phalaenopsis</i> Pink Stripes	N.D.	S.S.	S.F.	S.S.
<i>Phalaenopsis</i> Golden Peoker	N.D.	S.S.	S.S.	S.S.
<i>Phalaenopsis</i> Little Fly	N.D.	S.S.	S.F.	S.S.
<i>Lycaste aromatica</i>	CymMV	Mosaico y clorosis intervenal	S.F.	S.S.
<i>Brassolaeliocattleya</i> tierra de amor	N.D.	S.S.	S.F.	S.S.
<i>Laelia lobata</i>	CymMV ORSV	Amarillamiento. Necrosis	S.F.	Amarillamiento Necrosis.
<i>Enciclya alata x cordigera</i>	CymMV	Amarillamiento. Deformación de la lámina foliar. Necrosis	S.F.	S.S.
<i>Cymbidium</i> sp.	CymMV	Mosaico clorótico.	S.F.	S.S.

N.D.: No se detectó infección viral / viral infection not detected

S.S.: Sin síntomas aparentes / asymptomatic

S.F.: Sin flor / without flowers

las orquídeas evaluadas presentó infección mixta con ambos virus analizados, la cual correspondió a la *Laelia lobata* perteneciente al vivero B. Estos resultados concuerdan con las investigaciones realizadas en Florida, Luisiana y Carolina del Sur (EEUU; Wisler *et al.*, 1982), en la Polinesia Francesa (Wisler y Zettler, 1987), Hawai (Hu *et al.*, 1993) y en Tailandia (Tanaka *et al.*, 1997), en donde a pesar de la distribución a nivel global de ambos virus, el CymMV se encontró con mayor prevalencia que el ORSV.

Respecto a la sintomatología que presentaron las plantas infectadas con el CymMV, se observó principalmente un amarillamiento y necrosis en forma de manchas y rayas localizadas sobre las hojas (Tabla 1). Por ejemplo en el caso de las orquídeas *Lycaste aromatica* y *Cymbidium* sp. del vivero B, se observó un mosaico clorótico generalizado, característico de la enfermedad provocada por éste virus (Figura 4B y 4D). Así mismo, se observó la deformación del botón floral en los casos en que los especímenes presentaban flor. En el caso de las plantas con infección por el ORSV la sintomatología más común observada fue el amarillamiento y la necrosis localizada en hojas y bulbos (Tabla 1 y Figura 4). Particularmente, el ejemplar de *C. forbesii* del vivero B con infección simple del ORSV presentó en las hojas un leve síntoma de manchas cloróticas en forma de anillo, propio de ésta enfermedad.

De las 21 orquídeas analizadas solamente en *Laelia lobata* del vivero B se detectó una infección mixta con ambos virus. Producto de ésta infección, ésta planta presentó un fuerte estriado y moteado necrótico, particularmente en los bulbos (Figura 4). Por otra parte, también se encontraron

plantas asintomáticas como la *Cattleya yellow button* del vivero A y la *Cattleya intermedia* del vivero B, ambas infectadas con el CymMV.

DISCUSIÓN

El virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) y el virus de la mancha anillada del *Odontoglossum* (ORSV) son las enfermedades virales más prevalentes y económicamente más importantes que presentan las orquídeas (Lawson, 1990; Zettler *et al.*, 1990; Hu *et al.*, 1994). Su detección a tiempo es la forma más eficaz de evitar la propagación de estas enfermedades entre las distintas especies de orquídeas en un mismo vivero o en viveros distintos. En este trabajo describimos un protocolo de detección viral rápido y altamente sensible que permite identificar la infección por ambos virus en una única reacción de amplificación por PCR. Dicha amplificación simultánea se debe a que durante el protocolo de touchdown, al disminuir progresivamente la temperatura de hibridación, se genera un intervalo de temperaturas que permite la unión de las secuencias degeneradas de los cebadores L1 y U1,3 en los ADNc retrotranscritos de ambos virus (Seoh *et al.*, 1998).

Resulta destacable que más del 50% de los especímenes muestreados en los viveros presentaron infección con al menos uno de estos dos virus. Esto es particularmente problemático en el caso del vivero B, ya que algunos de los ejemplares analizados son utilizados para comercialización. Solamente dos especies de las plantas analizadas son nativas de Costa Rica: la *Prosthechea tardiflora* del vivero A y la *Lycaste aromatica* del vivero B; resulta llamativo que esta última

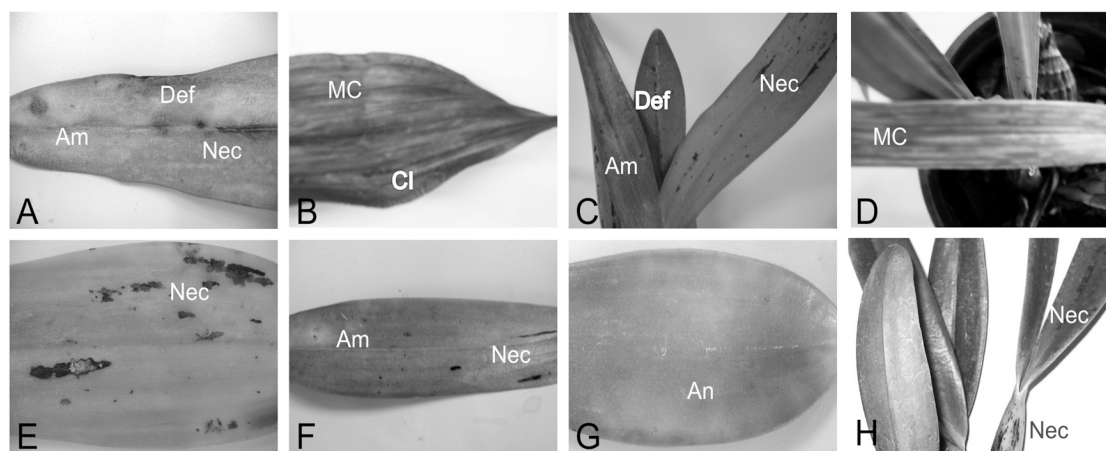


Figura 4. Sintomatología observada en las orquídeas infectadas por el CymMV y el ORSV. Las plantas A-D corresponden a especímenes de (A) *Cattleya* híbrida; (B) *Lycaste aromatica*; (C) *Enciclyla alata* x *Enciclyla cordigera* y (D) *Cymbidium* sp. infectadas con el CymMV. Las imágenes E-G corresponden a (E y F) dos *Cattleyas* híbridas y (G) *Cattleya forbesii* infectadas con el ORSV. (H) *Laelia lobata* con una infección mixta del CymMV y el ORSV. Am: Amarillamiento; Def: Deformación de la lámina foliar; Nec: Necrosis; MC: Mosaico; Cl: Clorosis intervenal; An: Manchas cloróticas con forma de anillo.

Figure 4. Symptoms observed in orchids infected with CymMV and ORSV. A-D correspond to plants with single infection with CymMV: (A) hybrid *Cattleya*, (B) *Lycaste aromatica*, (C) *Enciclyla alata* x *Enciclyla cordigera* and (D) *Cymbidium* sp. E-G correspond to plants infected with ORSV: (E and F) *Cattleya* hybrids, (G) *Cattleya forbesii*. (H) *Laelia lobata* with CymMV/ORSV mixed infection. Am: Yellowing; Def: Leaf deformation; Nec: Necrosis; MC: Mosaic; Cl: Vein chlorosis; An: Chlorotic ring-spots.

resultó con infección por el CymMV. Recientemente, Chacón (2002) identificó mediante ELISA 45 orquídeas nativas de Costa Rica infectadas con el CymMV y 18 especies infectadas con el ORSV. Este estudio, junto con el nuevo reporte de la *L. aromatica* del vivero A, confirman que es posible encontrar ambos virus infectando orquídeas típicas de la región que son mantenidas dentro de las colecciones de los viveros. El resto de plantas analizadas fueron especialmente híbridos y especies traídas del extranjero directamente, o que fueron introducidas en los viveros analizados a partir de colecciones de otros viveros nacionales. Es en este transcurso en donde las plantas se vieron posiblemente expuestas a la infección e igualmente pudieron servir de inóculo para la infección de otras plantas, ya que el acelerado movimiento de las orquídeas a nivel nacional e internacional es el principal factor que ha llevado a la amplia dispersión de ambos virus (Hsu *et al.*, 1992).

En general, las enfermedades virales producen en las plantas una serie de síntomas que son característicos de cada virus y que son resultado de la interacción entre el efecto depresivo producto de la multiplicación del parásito en la planta huésped y la reacción defensiva de la misma (Cornuet, 1992). Estos síntomas, así como su nivel de expresión, dependen también en gran medida de factores ambientales como la temperatura, la luz, el nivel de agua en la planta y la fertilización. De esta manera, estos factores de estrés biótico y abiótico actúan conjuntamente generando síntomas virales más severos (He *et al.*, 2004). En esta investigación, los síntomas que más presentaron las orquídeas infectadas por uno o por ambos virus fueron el amarillamiento en zonas de la hoja, así como los parches cloróticos y necróticos en la hoja y en los bulbos. Este amarillamiento en las plantas infectadas por virus generalmente se debe a que estos se multiplican en los tejidos vasculares y perturban las funciones conductoras de la planta, pudiendo bloquear también el metabolismo de los azúcares y ocasionar la acumulación de almidón en la hoja (Cornuet, 1992). Igualmente, el mosaico clorótico puede ser causado por la acción de los virus a nivel de cloroplastos y cromoplastos con localización del efecto en ciertas zonas de la hoja (Cornuet, 1992; Chia y He, 1999). Por otra parte, las manchas y el estriado clorótico y necrótico pueden deberse a una reacción de defensa del huésped, que provoca la muerte de las células y a veces la localización del virus (Cornuet, 1992). Sin embargo, durante el análisis de la infección por ambos virus también se encontraron plantas asintomáticas. Éstas últimas son de especial consideración para los criadores de orquídeas, ya que las plantas infectadas pasan desapercibidas y son fuente de inóculo que pudieran infectar a las plantas sanas (Zettler *et al.*, 1990).

La alta prevalencia del CymMV y del ORSV en las colecciones de los viveros analizados en esta investigación, unidas a las malas prácticas de cultivo por parte de los criadores y a la posibilidad de encontrar plantas asintomáticas infectadas con ambos virus, conlleva a la necesidad de encontrar una metodología eficaz para la detección viral en orquídeas. Tradicionalmente, el análisis de infecciones causadas por virus se

realiza mediante técnicas serológicas como el ELISA debido a su simplicidad, precisión y bajo costo (Webster *et al.*, 2004). No obstante, en este trabajo se eligió optimizar una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa, por ser una metodología relativamente simple, rápida y altamente sensitiva para la detección viral (Lim *et al.*, 1993; Seoh *et al.*, 1998; Webster *et al.*, 2004). De hecho, una de las principales ventajas de las técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa es que pueden detectar menos inóculo viral en cerca de cinco órdenes de magnitud en comparación con el ELISA (Eun *et al.*, 2002). Unido a esto, el análisis de los productos de PCR mediante el sistema MultiNA de electroforesis automatizada permite cuantificar la concentración de cada uno de los amplicones, por lo que es posible estimar la cantidad de inóculo viral presente en el tejido vegetal. Aunque el equipo y su operación tienen un costo elevado, el hecho de que el análisis de fragmentos de ADN esté altamente automatizado, así como la rapidez con que se obtienen los resultados mediante este sistema, permiten reducir en gran medida el tiempo que se dedica en realizar el análisis de los marcadores moleculares de los virus. Más aún, la detección simultánea del CymMV y el ORSV con un solo par de oligonucleótidos degenerados mediante TD/RT-PCR, disminuye aún más los costos y el tiempo implicados en la detección de ambos virus, especialmente si se desea certificar material para su comercialización (Seoh *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estandarizó un protocolo para la detección simultánea del CymMV y del ORSV en distintas especies de orquídeas. Ambos virus son considerados como los más problemáticos para el cultivo de orquídeas, por lo que resulta importante desarrollar un protocolo altamente sensible que permita detectar inclusive bajas cantidades de inóculo viral. Esta investigación evidencia además la alta incidencia con la que se pueden encontrar estos virus en viveros comerciales y en colecciones privadas, al detectarse su presencia en más del 50% de las muestras analizadas. A pesar de que algunas plantas presentaron los síntomas típicos de una infección viral, se evidenció también la presencia de plantas asintomáticas. La identificación de éstas últimas como potencial fuente de inóculo es de suma importancia para evitar la dispersión de los virus a plantas sanas, dado que la transmisión mecánica de ambos patógenos es muy eficiente. Se detectó también la presencia del CymMV en *Lycaste aromatica*, siendo éste el primer reporte de la infección por el potexvirus en ésta especie originaria de Costa Rica.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. José Raúl Cascante por su ayuda en la recolección de muestras y en la identificación de las especies de orquídeas muestreadas en los viveros. A Jaime Soto por su colaboración y ayuda técnica en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos.

REFERENCIAS

- Chacón, J. G. 2002. Identificación de virus que infectan orquídeas nativas en dos viveros del Valle Central de Costa Rica. Tesis de licenciatura. Universidad de Costa Rica. San José.
- Chia, T. F., Chan, Y. S. & Chua, N. H. 1992. Detection and localization of viruses in orchids by tissue-print hybridization. *Plant Pathology* 41: 355-361.
- Chia, T. F. & He, J. 1999. Photosynthetic capacity in *Oncidium* (Orchidaceae) plants after virus eradication. *Environmental and Experimental Botany* 42: 11-16.
- Chng, C. G., Wong, S. M., Mahtani, P. H., Loh, C. S., Goh, C. J., Kao, M. C., Chung, M. C. & Watanabe, Y. 1996. The complete sequence of a Singapore isolate of *Odontoglossum* ringspot virus and comparison with other tobamoviruses. *Gene* 171: 155-161.
- Chung, B. N., Yoon, J. Y. & Kim, M. S. 2010. Viral infection of tissue-cultured orchids and evaluation of damages. *Plant Pathology Journal* 26: 194-197.
- Cornuet, P. 1992. Elementos de virología vegetal. Mundi-Prensa (ed). Madrid, España.
- Eun, A. J., Huang, L., Chew, F. T., Fong-Yau Li, S. & Wong, S. M. 2002. Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance-based DNA biosensors. *Phytopathology* 92: 654-658.
- Fay, M. F. & Chase, M. W. 2009. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. *Annals of Botany* 104: 359-364.
- Gibbs, A. & Mackenzie, A. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 63: 9-16.
- Gibbs, A., Mackenzie, A., Blanchfield, A. L., Cross, P., Wilson, C. R., Kitajima, E., Nightingale, M. & Clements, M. 2000. Viruses of orchids in Australia; their identification, biology and control. *Australian Orchid Review* 65: 10-21.
- He, J., Ouyang, W. & Chia, T. F. 2004. Growth and photosynthesis of virus-infected and virus-eradicated orchid plants exposed to different growth irradiances under natural tropical conditions. *Physiologia Plantarum* 121: 612-619.
- Hsu, H. T., Vongsasitorn, D. & Lawson, R. H. 1992. An improved method for serological detection of *Cymbidium* mosaic potexvirus infection in orchids. *Phytopathology* 82: 491-495.
- Hu, J. S., Ferreira, S., Wang, M. & Xu, M. Q. 1993. Detection of *Cymbidium* mosaic virus, *Odontoglossum* ringspot virus, tomato spotted virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. *Plant Disease* 77: 464-468.
- Hu, J. S., Ferreira, S., Xu, M. Q., Lu, M., Iha, M., Pflum, E. & Wang, M. 1994. Transmission, movement, and inactivation of *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ringspot viruses. *Plant Disease* 78: 633-636.
- Lakani, I., Suastika, G., Mattjik, N. & Damayanti, T. 2010. Identification and molecular characterization of *Odontoglossum* ringspot virus (ORSV) from Bogor, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences* 17: 101-104.
- Lawson, R. H. 1990. Orchid viruses and their control. En *Handbook on orchid pests and diseases*. A. M. Pridgeon & L. L. Tillman (ed.), p. 66-101. West Palm Beach, Florida. EEUU.
- Lim, S. T., Wong, S. M., Yeong, C. Y., Lee, S. C. & Goh, C. J. 1993. Rapid detection of *Cymbidium* mosaic virus by the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Virological Methods* 41: 37-46.
- Navalinskienė, M., Raugalas, J. & Samuitienė, M. 2005. Viral diseases of flower plants 16. Identification of viruses affecting orchids (*Cymbidium* Sw.). *Biologija* 2: 29-34.
- Pearson, M. N. & Cole, J. S. 1986. The effects of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus on the growth of *Cymbidium* orchids. *Journal of Phytopathology* 117: 193-197.
- Pupulin, F. 2002. Catálogo revisado y anotado de las Orchidaceae de Costa Rica. *Lankesteriana* 1: 4-88.
- Rivera, G. 1998. Orquídeas: Generalidades y cultivo. Fundación UNA (ed.) Heredia, Costa Rica.
- 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. *Journal of Virological Methods* 72: 197-204.
- Tanaka, S., Nishii, H., Ito, S., Kameya-Iwaki, M. & Sommartya, P. 1997. Detection of *Cymbidium* mosaic potexvirus and *Odontoglossum* ringspot tobamovirus from Thai orchids by rapid immunofilter paper assay. *Plant Disease* 81: 167-170.
- Webster, C. G., Wylie, S. J. & Jones, M. G. K. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. *Current Science* 86: 1604-1607.
- Wisler, G. C. & Zettler, F. W. 1987. Virus infections of *Vanilla* and other orchids in French Polynesia. *Plant Disease* 71: 1125-1129.
- Wisler, G. C., Zettler, F. W. & Purcifull, D. E. 1982. A serodiagnostic technique for detecting *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ringspot viruses. *Phytopathology* 72: 835-837.
- Wong, S. M., Mahtani, P. H., Lee, K. C., Yu, H. H., Tan, Y., Neo, K. K., Chan, Y., Wu, M. & Chng, C. G. 1997. *Cymbidium* mosaic potexvirus RNA: complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *Archives of Virology* 142: 383-391.
- Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliot, M. S. & Wong, S. M. 1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Disease*. 74: 621-626.