

ÁREA DE CONSOLIDACIÓN: CULTIVOS INTENSIVOS

“PRODUCCIÓN DE ANTISUERO PARA LA DETECCIÓN DE LOS PRINCIPALES VIRUS DE LAS DISTINTAS ESPECIES DE *ORCHIDACEAE* EN CÓRDOBA”



Alumna: DOTTORI, Carolina Andrea

Tutor: Ing. Agr. (MSc.) TUMA BORGONOVO, María Alejandra

2018



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
IMPORTANCIA ECONÓMICA Y ZONAS DE PRODUCCIÓN	3
CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS	4
FORMAS DE PROPAGACIÓN	4
ENFERMEDADES EN EL CULTIVO DE ORQUÍDEAS	5
OBJETIVOS.....	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
HIPÓTESIS	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
1. <i>Purificación viral</i>	9
<i>Fuente de inóculo</i>	9
Purificación de partículas virales	9
Microscopía electrónica	9
2. <i>Producción y purificación de antisueros contra CymMV y ORSV</i>	10
3. <i>Desarrollo de reactivos de diagnóstico</i>	10
Titulación de antisueros.....	10
Calibración del antisuero para la técnica <i>Plate-trapped antigen-enzyme linked immunosorbent assay (PTA)</i>	11
Purificación de inmunoglobulinas (Igs).....	11
Calibración de la inmunoglobulina y el conjugado para la técnica de <i>Double antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA)</i>	11
4. <i>Comprobación si los antisueros obtenidos permiten detectar las virosis en las plantas producidas y/o comercializadas en Córdoba.</i>	12
RESULTADOS.....	13
Purificación de partículas virales	13
Microscopía electrónica	13
Calibración de la técnica de Placa Tapizada con Antígeno (PTA)	17
Calibración de la inmunoglobulina y el conjugado para DAS-ELISA	18
Análisis de plantas de producción y/o comercialización local con los antisueros obtenidos	18
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES.....	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23
ANEXO 1	25

PROTOCOLOS DE TÉCNICAS SEROLÓGICAS	25
Y TAMPONES EMPLEADOS.....	25
Protocolo N° 1. NC-ELISA	26
<i>(nitrocellulose-enzyme linked immunosorbent assay)</i>	<i>26</i>
Protocolo N° 2. PTA-ELISA.....	27
<i>(plate-trapped antigen-enzyme linked immunosorbent assay)</i>	<i>27</i>
Protocolo N° 3. DAS-ELISA.....	28
<i>(double antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay)</i>	<i>28</i>
ANEXO 2.....	29
LECTURAS DE PLACAS DE CALIBRACION Y MUESTRO CON LAS TECNICAS	
PTA Y DAS-ELISA	29
Calibración de antisueros para PTA-ELISA.....	30
Calibración de antisueros para DAS-ELISA.....	31
Muestreo de Orquídeas. Lecturas de DAS ELISA.....	32

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi tutora, Ing. Agr. Alejandra Tuma por su apoyo y confianza en la realización de este trabajo.

A Claudia Nome y Sole de Breuil por su predisposición y confianza desde el primer momento, apoyándome y transmitiendo sus conocimientos.

A los directivos del IPAVE por brindarme sus instalaciones para poder realizar mi trabajo.

A Lourdes, Franco y Sole por su buena voluntad y colaboración en ciertas actividades.

A mis amigos por ser mi sostén, alentándome a seguir en momentos difíciles.

Y a mi familia por el soporte incondicional.

“Producción de antisuero para la detección de los principales virus de las distintas especies de *Orchidaceae* en Córdoba.”

RESUMEN

La floricultura es una disciplina en crecimiento, actualmente, la producción y comercialización de orquídeas (familia *Orchidaceae*) se encuentra en auge debido a que representan un grupo de especies altamente demandadas por los mercados. La multiplicación de las orquídeas es principalmente agámica. Esta forma de reproducción hace necesario partir de material madre libre de virus. En el mundo, los virus más importantes, en esta familia, por sus elevados valores de prevalencia, son *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV). El objetivo de este trabajo fue elaborar reactivos de diagnóstico serológicos para la detección e identificación de plantas infectadas con estos patógenos. Se realizó una purificación de partículas virales desde plantas de *Nicotiana glutinosa* coinfectadas con CymMV y ORSV mediante centrifugación diferencial en gradientes de cloruro de cesio. Las dos bandas formadas en el gradiente fueron evaluadas por microscopía electrónica observándose en la banda superior mayor cantidad de partículas rígidas de ca. 300 nm de longitud, correspondientes al ORSV, mientras que en la banda inferior se visualizaron, en mayor proporción, partículas flexuosas de unos 480 nm de longitud, características del CymMV. Cada fracción viral purificada fue inoculada de manera intramuscular en diferentes conejos. Como resultado se obtuvieron antisueros contra CymMV + ORSV para la elaboración de reactivos de diagnóstico con las técnicas de DAS y PTA ELISA, los cuales fueron utilizados para analizar una muestra de 63 orquídeas, pertenecientes a 11 géneros diferentes, provenientes de distintos establecimientos ubicados de la ciudad de Córdoba. El porcentaje de plantas infectadas fue de 15.87% según la técnica de PTA-ELISA y de 17.46% en base a las pruebas de DAS-ELISA.

Palabras claves: floricultura, orquídeas, *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, antisuero

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las flores y plantas forman parte del diseño y decorado de un jardín, del interior de una casa, de oficinas, salas, halls, etc. Además de los aspectos estéticos, y de los beneficios al medio ambiente circundante, como son mejorar la calidad del aire, humidificarlo y reducir el ruido; varios estudios han demostrado beneficios a nivel psicológico, reduciendo el estrés y generando una mejora anímica. La disciplina que permite conocer en detalle todo el desarrollo productivo, tecnológico, económico, comercial y social de las plantas ornamentales es la FLORICULTURA. Este tipo de producción conlleva un uso intensivo de la superficie y de la mano de obra. La tecnología de cultivo y el mejoramiento de las especies ornamentales han estado enfocados en una producción de uso eficiente de la superficie (Morisigue, *et al*, 2012).

La floricultura es una actividad que utiliza muchos y distintos insumos. Los más utilizados para la producción florícola son: macetas o contenedores, bandejas de siembra, sustrato, fertilizantes, reguladores de crecimiento. La infraestructura necesaria tanto para cultivos en maceta o corte, comprende: invernaderos, cubiertas plásticas o de vidrio, mesadas, cámaras de crecimiento, cámaras de frío, salas para maquinarias. Las herramientas y maquinarias empleadas son, entre otras: herramientas manuales, motocultivadores, arados, pulverizadoras, sembradoras, enmacetadoras, clasificadoras de flores, equipos de riego y fertilización, sistemas de calefacción y/o refrigeración, iluminación artificial. Todo ello está indicando que son numerosos los actores que componen la cadena de producción del sector florícola para obtener flores y plantas ornamentales (Mascarini, *et al*, 2010).

Existen diferentes criterios para clasificar las especies florícolas. Según el valor del producto puede ser, la planta entera, flor, hoja, follaje, fruto. A grandes rasgos esta clasificación contempla dos grandes grupos: I) flor o follaje de corte y II) plantas en macetas. Otras clasificaciones se basan en los requerimientos ecológicos y las características morfológicas, (anuales/bianuales, herbáceas perennes, bulbosas y leñosas) y otras tienen en cuenta el tipo de producto (semillas, bulbos, flores de corte, follaje de corte, plantas en maceta para flor, plantas en maceta para uso interior, plantas arbustivas o árboles, plantas o plantines a partir de semillas o esquejes) (Tuma, 2017).

Respecto de la demanda de productos florícolas, el mercado está en constante movimiento. El público cambia sus patrones de consumo de modo constante y está abierto a nuevas especies, variedades, colores y está dispuesto a pagar más por eso. Como producto suntuario, su consumo guarda directa relación con el poder adquisitivo de la población y, por lo tanto, la expansión del negocio está ligada de modo estrecho al mejoramiento de las condiciones económicas, sociales y culturales de los pueblos (Mascarini, *et al*, 2010).

Dentro de las plantas, la producción y comercialización de orquídeas (Fig. 1) es una alternativa que promueve el desarrollo local y regional, mejorando los ingresos, el empleo y la inserción de los pequeños productores rurales en los mercados. Han sido consideradas como flores místicas; aunque algunos pueblos primitivos también la han utilizado con fines medicinales. Debido a la importancia económica a nivel nacional y a su belleza, las orquídeas son motivo de cultivo por productores a nivel comercial como flor cortada y como planta ornamental (Salamanco, 2018). Su principal forma de propagación es asexual a través del cultivo de meristemas (Argentina no tiene mucha renovación de meristemas) donde en su primera fase de crecimiento requiere condiciones especiales; y a través de la división de tallos, de allí la importancia de proveer un material sano ya que es una especie de difícil cuidado.

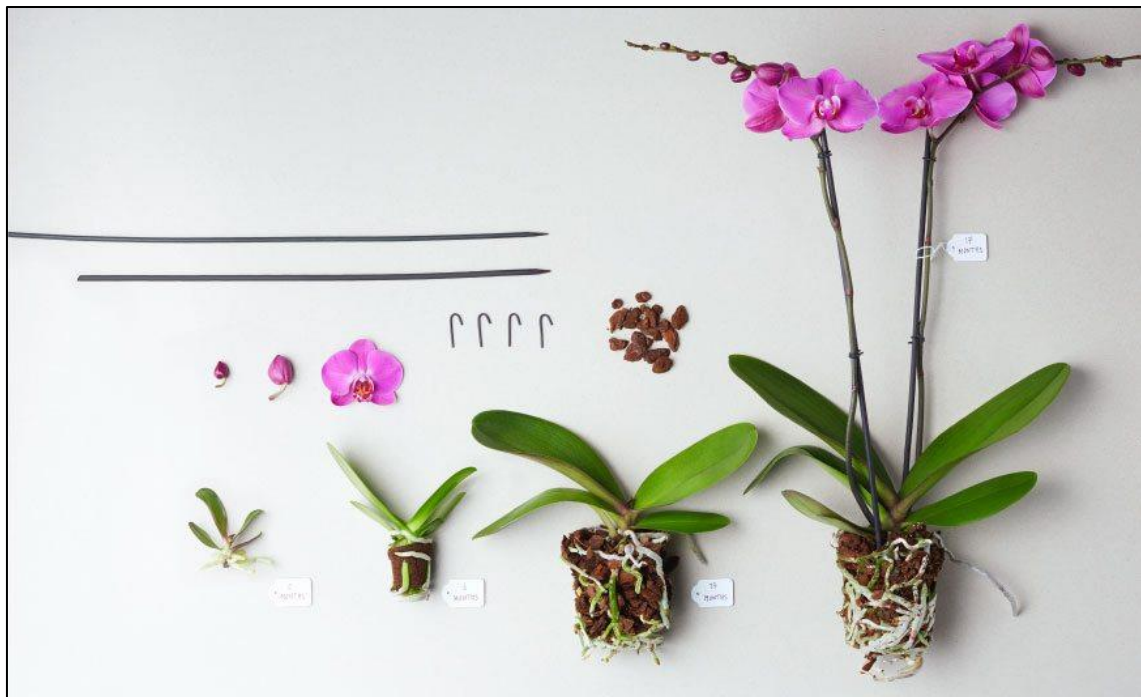


Figura 1. Plántulas de *Phalaenopsis sp.* procedentes de meristemas. Fuente: Anthura.

IMPORTANCIA ECONÓMICA Y ZONAS DE PRODUCCIÓN

En nuestro país, la diversidad de climas permite producir un amplio espectro de cultivos. Hay 2500 hectáreas cultivadas de flores (25% bajo invernadero) y unas 1700 de estas se encuentran en La Plata y en el segundo y tercer cordón del conurbano bonaerense, en la zonas de Escobar, Florencio Varela y Pilar. Según la dirección de Economías Regionales de la Confederación Argentina de la Mediana Empresa (Came), 58% del terreno cultivado está en la provincia de Buenos Aires, 12% en Santa Fe, 6.8% en Corrientes y 22% en el resto del país. El 99.6% de la producción se destina a mercado interno y solo el 0.4% lo hace al mercado externo.

La Provincia de Córdoba produce flores de corte y plantas ornamentales. La producción se concentra en los alrededores de la ciudad de Córdoba. La producción de flores de corte se basa en especies como Rosa, Crisantemo, Clavel y Lisiantus. En cuanto a la producción de plantas en macetas se destacan las especies florícolas para jardín y florales en macetas. Producción de Estrella Federal, Crisantemo, Begonia y Cyclamen en Córdoba Capital. En cuanto a la comercialización de orquídeas, éstas ocupan un lugar preferencial por su precio y la aceptación del consumidor al ser considerada una flor exótica (Tuma, 2017).

CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

Las orquídeas son plantas monocotiledóneas, pertenecientes a la familia *Orchidaceae*. Dentro de esta familia existen unos 700 géneros con más de 25000 especies descubiertas y aún hay regiones sin relevar, varias de ellas en la Argentina (Freuler, 2003). Su diversidad se ve ampliada dado que presentan gran facilidad para dar híbridos exitosos, no solo entre especies del mismo género, sino también intergenéricas. Las orquídeas se distribuyen a lo largo de todo el territorio argentino, principalmente en la región subtropical, si bien existen especies que se desarrollan en otras regiones filogeográficas con pérdida de diversidad, pero con adaptaciones específicas para el crecimiento en regiones templadas y frías (Freuler, 2007). Hay plantas litófitas, es decir, que crecen sobre rocas, pero la mayoría son epífitas, es decir, crecen sobre los tallos de otras plantas o sobre las ramas de los árboles, lo que les permite alcanzar mejor la luz en los frondosos bosques tropicales. No son parásitas, puesto que han desarrollado su propio sistema de alimentación por medio de raíces aéreas, en las que se deposita materia orgánica y pequeños elementos del aire y del agua de lluvia (Salamanca, 2018).

Las orquídeas pueden seguir dos patrones de crecimiento, monopodial o simpodial. El monopodial se caracteriza en que tienen un único tallo del que van naciendo nuevas hojas por ápice, y de entre ellas nacen el tallo floral y las raíces aéreas (género *Phalaenopsis*). En el crecimiento simpodial las plantas tienen varios tallos o pseudobulbos que brotan de un rizoma, los nuevos tallos crecen desde la base del tallo del año anterior y generalmente las flores nacen del nuevo tallo (géneros *Cymbidium*, *Cattleya*, *Odontoglossum*) (Solis, 2009).

FORMAS DE PROPAGACIÓN

Al igual que la mayoría de las plantas, las orquídeas se reproducen de forma sexual y asexual. La reproducción sexual implica que la descendencia obtiene genes de ambos progenitores lo que garantiza una mayor diversidad genética y, por ende, fenotípica. Sin embargo, la principal forma de reproducción de estas plantas es asexual, en la cual la nueva planta se obtiene a partir de fracciones de la planta madre (Hartmann & Kester, 1991).

La producción y multiplicación agámica de las orquídeas puede realizarse de diversas maneras, el método más simple utilizado por coleccionistas y comerciantes de pequeña escala es la división del tallo (Hartmann & Kester, 1991). En varias especies de orquídeas el pseudobulbo está formado por muchos nudos en los cuales se desarrollan hijuelos, estos

hijuelos son separados de la planta madre y puestos a enraizar en otro recipiente. Las especies de mayor importancia comercial, tales como *Cattleya*, *Laelia*, *Miltonia* y *Odontoglossum*, pueden propagarse por división del rizoma en secciones, las que deben llevar de 3 a 4 pseudobulbos. Los denominados bulbos traseros, aquellos que ya han perdido el follaje, se usan comúnmente para propagar clones de *Cymbidium*. Estos bulbos se remueven de la planta y se colocan en otro recipiente con un sustrato adecuado para que formen raíces. En cuanto a las desventajas, estas técnicas de propagación agámica favorecen la propagación y diseminación de enfermedades, especialmente de etiología viral (Zettler et al., 1990).

Las orquídeas también pueden ser multiplicadas a gran escala mediante técnicas de micropropagación (Arditti & Ernst, 1993). La reproducción a través del cultivo *in vitro* de meristemas es más eficiente y consiste en quitar la punta de la raíz o el extremo de un brote y situarlo en un medio de cultivo adecuado bajo condiciones estériles. Las plántulas así obtenidas se separan unas de otras y se cultivan en tubos de ensayo independientes. Posteriormente, las plantitas serán trasladadas a invernáculos para su adaptación o rusticación y allí continúan su desarrollo hasta la formación de flores, lo cual varía de 2 a 3 años según el género utilizado. De esta manera, las plantas son clones perfectos de la planta original (planta madre), por lo que la propagación de meristemas se ha convertido en un método muy útil para la multiplicación masiva de variedades de calidad destacada y especialmente de híbridos estériles.

Así, mediante reproducción asexual se puede obtener en poco tiempo una mayor cantidad de plantas. Además, la multiplicación puede llevarse a cabo en cualquier época del año, lo que permite aumentar la eficiencia del ciclo del cultivo favoreciendo más de una floración por año (Menchaca, 2011).

ENFERMEDADES EN EL CULTIVO DE ORQUÍDEAS

La gravedad de las enfermedades que padecen las orquídeas es extremadamente variable principalmente en función de las técnicas de cultivo adoptadas. En efecto, la mayor parte de las patologías que se manifiestan en las orquídeas son causadas por técnicas inadecuadas de cultivo.

Entre las principales enfermedades causadas por HONGOS que afectan las orquídeas tenemos:

-Podredumbre negra de las hojas, pseudobulbos y raíces

Originado por *Phytophthora sp.* y *Pythium sp.*, se manifiestan con manchas de color negruzco circundadas por un halo amarillento prácticamente sobre todas las partes de la planta (excepto flores), pudiendo causar la muerte de la planta. Se propaga al momento de la subdivisión de la planta causada por instrumentos inadecuadamente desinfectados o heridas.

-Podredumbres foliares o florales

Se observan tejidos blandos o manchas redondeadas sobre pétalos que aparecen normalmente en la zona central mientras se rodean de un halo oscuro que poco a poco se extiende a toda la mancha; esto es producido por *Botrytis spp.*.

-Manchas foliares

El agente causal es *Fusarium spp.* Observándose manchas necróticas irregulares, hasta formar áreas necróticas.

En cuanto a las BACTERIAS presentes en este cultivo encontramos:

-Necrosis foliar

Las responsables son *Pseudomonas spp.* y *Acidivoras spp.* Los síntomas típicos son lesiones de manchas aceitosas que sucesivamente se convierten en oscuras. En las orquídeas adultas la infección se inicia en las hojas y puede alcanzar el fuste. Las áreas infectadas manifiestan exudaciones que son colonias bacterianas.

-Podredumbres en pseudobulbos

Esta patología es originada por *Erwinia spp.* observándose manchas aceitosas amarillentas inicialmente en el centro de las hojas, poco a poco se va oscureciendo, alcanzando los tejidos interiores de la planta; pueden atacar directamente raíces y pseudobulbos con la misma sintomatología.

En cuanto al control de estas enfermedades, se puede recurrir a un manejo preventivo como la eliminación de plantas enfermas, evitar encharcamientos, desinfección de herramientas de poda, utilización de plantas madres sanas, etc. En el caso de infecciones severas, se recurre a la aplicación alterna de productos químicos con el fin de evitar resistencias (Elicriso, 2018).

Al referirnos a los VIRUS, en el mundo, se han reportado varios que afectan diferentes géneros de orquídeas, pero dos de ellos adquieren relevancia desde el punto de vista económico debido a la elevada prevalencia e incidencia que tienen a nivel mundial y debido a los daños que le ocasionan a estas especies. Estos patógenos son: *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), dos virus que se transmiten de una planta infectada a otra sana por contacto mecánico, y cuya perpetuación y aumento de la concentración viral en los tejidos se ve favorecido por la propagación agámica de estas especies (Pradhan *et al.*, 2016; Rani *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 1994).

CymMV, pertenece al género *Potexvirus*, en la familia *Alphaflexiviridae*; es un virus monopartito, elongado flexuoso de aproximadamente 480 nm de longitud (ICTV, 2017). Este patógeno infecta varios géneros de orquídeas en las cuales ocasiona distintos síntomas según el género al que pertenece la planta. Así, en el género *Cymbidium* al principio aparece un mosaico difuso y pequeñas manchas decoloradas sobre las hojas jóvenes, que luego se transforman en estrías color naranja en ambas caras de la hoja; en las flores ocasiona estrías necróticas en pétalos y/o sépalos. En el género *Cattleya* se presentan manchas irregulares sobre las hojas con amarillamiento y posterior caída de las hojas más viejas; en este género los síntomas sobre las flores son más marcados y graves. En el género *Phalaenopsis* primero se producen decoloraciones en el envés de las hojas jóvenes, llegando a producir necrosis de los tejidos y finalmente pérdida foliar; sobre las flores provoca a veces pequeñas manchas puntiformes de color negro (Pearson & Cole, 1986; Pant *et al.*, 2010).

ORSV, es un virus perteneciente al género *Tobamovirus*, en la familia *Virgaviridae*; los viriones son elongados rígidos, con forma de bastón, de aproximadamente 300 nm de largo (ICTV, 2017). Los síntomas característicos de la infección con ORSV son puntos necróticos en las hojas y estrías coloreadas en las flores. Las plantas infectadas presentan disminución en el número y tamaño de los escapos florales y de las flores, las cuales a su vez pueden manifestar deformaciones morfológicas (Hu *et al.*, 1993).

Las plantas de orquídea también pueden presentar co-infección con ambos virus, en este caso los síntomas observados son flores amarronadas, estrías de color marrón y necrosis en flores y pérdida de vigor de las plantas (Tanaka *et al.*, 1997).

Existen ocasiones en que plantas aparentemente sanas están infectadas con estos virus, por lo que la simple evaluación visual de síntomas no es un método confiable para determinar la condición sanitaria de una planta (Zettler *et al.*, 1990).

En Argentina, ambos virus fueron reportados en 2010 infectando orquídeas del género *Oncidium* producidas bajo cubierta en la provincia de Buenos Aires (Cánovas *et al.*, 2016).

En los sistemas de cultivos intensivos y/o semi-intensivos, la forma más práctica de reducir los daños ocasionados por virus consiste en la detección temprana y eliminación de las plantas infectadas a fin de asegurar la producción de material vegetal sano, libre de virus (Muñoz, 2018) ya que no existen productos químicos para su eliminación.

A nivel comercial existen varios métodos para diagnosticar estas virosis, sin embargo, los mismos no son económicos, ni se encuentran fácilmente disponibles para la mayoría de los floricultores. Este hecho, favorece la multiplicación y comercialización de material infectado impactando de manera negativa en las economías e industrias floricultoras de nuestra región.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ❖ El presente trabajo tiene como objetivo general generar reactivos de diagnóstico serológicos para la detección de los virus más relevantes en las distintas especies de orquídeas que se comercializan en la provincia de Córdoba, a fin de promover la producción, multiplicación y comercialización de plantas libres de virus en el territorio provincial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Purificar partículas virales correspondientes a CymMV y ORSV.
2. Producir y purificar antisueros para CymMV y ORSV.
3. Desarrollar reactivos de diagnósticos serológicos para CymMV y ORSV.
4. Comprobar si los antisueros obtenidos permiten detectar las virosis en plantas producidas y/o comercializadas en Córdoba.

HIPÓTESIS

Los reactivos de diagnóstico serológicos permiten identificar plantas de orquídeas infectadas con *Cymbidium mosaic virus* y *Odontoglossum ringspot virus* en establecimientos de producción y/o comercialización de la provincia de Córdoba.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Purificación viral

Fuente de inóculo

El material vegetal utilizado para llevar adelante la metodología que se describe a continuación consistió de hojas y tallos provenientes de plantas de *Nicotiana glutinosa* L. coinfectadas con CymMV y ORSV. El inóculo se mantuvo almacenado a -20°C.

Purificación de partículas virales

Se maceraron 70 g de hojas de nicotianas infectadas con ambos virus en 350 ml de tampón fosfato de sodio pH 7.4, 0.1M, más el agregado de 200 µl de ácido tioglicólico, 0.05 g de DIECA, 2.1 g de sulfito de sodio y 350 ml de cloroformo. El homogenato se filtró a través de una gasa a fin de separar la fracción líquida de los sólidos gruesos y posteriormente se centrifugó a 4355 g durante 20 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa, la cual se sembró en colchones de sacarosa al 20% en tampón fosfato de sodio 0.1M. Los colchones se centrifugaron a 113000 g por 1 h 30 min. Se recuperaron los pellets en 1 ml del mismo tampón. Finalmente, cada pellet resuspendido se sembró en un gradiente de cloruro de cesio fraccionado 10% - 40%, en tampón fosfato 0.04 M. La corrida fue de 3 h 30 min a 82700 g. Las fracciones seleccionadas se diluyeron 1/10 en tampón fosfato 0.01M y se centrifugaron a 113000 g durante 1 h para eliminar el cloruro de cesio. Los pellets se resuspendieron en 200 µl de tampón fosfato pH 7, 0.01M y se midió la concentración viral mediante espectrofotometría.

Microscopía electrónica

El grado de pureza de los productos finales obtenidos mediante centrifugación en gradiente diferencial de cloruro de cesio, fue analizado al microscopio electrónico de transmisión (MET). Se seleccionaron las dos bandas diferenciadas en el gradiente y cada una de ellas se evaluó mediante preparaciones rápidas para MET (Kitajima y Nome, 1999). Para ello 6 µl

de cada fracción fueron enfrentados durante 10 min a una grilla de cobre de 300 mesh (Sigma, St. Louis. Mo) recubierta de una película de colodión carbonizada. Después de lavar las grillas con agua destilada, las mismas se secaron con papel de filtro, se contrastaron con acetato de uranilo 2 % y se examinaron al MET JEOL 1200 (Jeol, Tokyo, Japan).

2. Producción y purificación de antisueros contra CymMV y ORSV

Las dos fracciones del gradiente de cloruro de cesio que presentaron mayor concentración de partículas virales fueron inyectadas de manera independiente a dos conejos machos californianos vía intramuscular. La primer inoculación fue de 125 μ g para CymMV y 90 μ g para ORSV, con el agregado de coadyuvante de Freud completo (1:1 v/v) en un volumen final de 1 ml. Se aplicó un refuerzo a los 24 días con una segunda inoculación con 60 μ gr de CymMV y 30 μ gr de ORSV en mezcla 1:1 v/v con coadyuvante de Freud incompleto. Se realizaron sangrías a los 14, 31 y 41 días después de la primera inoculación (dpi). Cada una de las sangrías obtenidas fueron inicialmente incubadas a 37°C durante 1 h y luego 1 h a 4°C. Posteriormente, se obtuvieron las fracciones séricas mediante centrifugación a 3024 g durante 5 min. Los sueros se fraccionaron en alícuotas de 1 ml cada uno y se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

3. Desarrollo de reactivos de diagnóstico

Titulación de antisueros

El título de los antisueros (As) se evaluó utilizando diluciones seriadas (1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000) de las diferentes fracciones séricas en pruebas de NC-ELISA (*Nitrocelulosa-Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay*) siguiendo los pasos del protocolo N° 1 descrito en el Anexo 1. Luego, 5 μ l de cada purificación viral diluida (antígeno) fueron adsorbidos usando vacío en una membrana de nitrocelulosa. Se utilizaron As primarios (diluciones seriadas) y un As secundario IgG de cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:3000 en tampón antisuero. Las membranas se revelaron en una solución de sustrato (tetrazolium nitroazul y fosfato bromocloroindolil, SIGMA) y agua destilada. La aparición de color púrpura fue considerada como muestra positiva. En cada prueba se utilizaron plantas de orquídea enfermas como controles positivos, y orquídeas más plantas de *Nicotiana glutinosa* sanas como controles negativos de la técnica.

Calibración del antisuero para la técnica *Plate-trapped antigen-enzyme linked immunosorbent assay* (PTA)

Sobre la base de las titulaciones realizadas en membrana de nitrocelulosa, se seleccionaron las sangrías de 14 días para CymMV suponiendo que podría reaccionar en forma diferencial para dicho virus, y 41 días para ORSV por tener alto título para ambos virus, debido a que ninguna de las sangrías mostró reacción diferencial para el mismo. Los antisueros fueron diluidos en tampón de conjugado en concentraciones de 1/100, 1/250, 1/500, 1/750, 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/2500, 1/3000, 1/3500 y 1/4000, según protocolo N° 2 descrito en el Anexo 1. Las muestras vegetales (aproximadamente 0,1 g) se molieron 1:5 p/v en tampón de sensibilización. En cada placa de ELISA se colocaron controles positivos (purificaciones virales) y negativos (plantas de orquídea y nicotianas sanas). Los valores de absorbancia a 405 nm fueron determinados en un lector de ELISA, a intervalos de 60 min, después de la adición de p-nitrofenilfosfato como sustrato.

Purificación de inmunoglobulinas (Igs)

Se seleccionó el antisuero con mayor título y se lo mezcló con igual volumen de sulfato de amonio saturado. La mezcla se dejó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 15300 g por 15 min. Luego se dializó con PBS 0.5X. Se colocó el contenido en una columna DEAE Sephacel y se adicionó PBS 0.5X. Se recogieron 10 fracciones de 1 ml cada una y se determinó la concentración de inmunoglobulinas mediante lectura en espectrofotómetro a 280 nm. Se seleccionaron las dos fracciones con mayor absorbancia, la mayor para ser conjugada con la enzima fosfatasa alcalina, y la segunda para ser utilizada como Ig. La mezcla (Igs + enzima + glutaraldehído) se dejó en reposo 4 h a temperatura ambiente y posteriormente se dializó con PBS 1X 3 veces. Por último, se le añadió 0.05% de albúmina de suero bovino y 0.01% de azida sódica.

Calibración de la inmunoglobulina y el conjugado para la técnica de *Double antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay* (DAS-ELISA)

Las Igs e Igs conjugadas con fosfatasa alcalina fueron diluidas en concentraciones de 1/500, 1/1000, 1/1500 y 1/2000. Estas diluciones fueron utilizadas para testear tejido vegetal infectado con CymMV y/o ORSV mediante la técnica de DAS-ELISA según protocolo N° 3 descrito en el Anexo 1. Las muestras vegetales (aproximadamente 0,1 g) se molieron 1:5 p/v en tampón de extracción. Se utilizaron anticuerpos (Ac) policlonales (anti CymMV y

anti ORSV), junto con los respectivos Ac conjugados con fosfatasa alcalina. En cada placa de ELISA se colocaron controles positivos (purificaciones virales) y negativos (plantas de orquídea y nicotianas sanas). Los valores de absorbancia a 405 nm fueron determinados en un lector de ELISA, a intervalos de 20 min, después de la adición de p-nitrofenilfosfato como sustrato. Las muestras con valores de absorbancia mayores a dos veces la media de los controles sanos fueron consideradas positivas.

4. Comprobación si los antisueros obtenidos permiten detectar las virosis en las plantas producidas y/o comercializadas en Córdoba.

Durante agosto de 2018 se visitaron 4 viveros comerciales y el Jardín Botánico de la ciudad de Córdoba. Se tomaron 63 muestras en total, provenientes tanto de plantas de orquídeas asintomáticas como de aquellas que manifestaban síntomas característicos de infección viral. Se analizaron 11 géneros de orquídeas: *Oncidium sp.*, *Dendrobium sp.*, *Cattleya sp.*, *Phaleanopsis sp.*, *Cymbiduium sp.*, *Epidendrum sp.*, *Brassavola sp.* (*B. tuberculata*), *Encyclia sp.*, *Christensonella sp.*, *Miltonia sp.* (*M. flavescens*) y *Leptotes sp.* (*L. unicolor*), algunas procedentes de Buenos Aires (Escobar), otras de Misiones y otras del NOA.

Para determinar la presencia de virus, todas las muestras fueron analizadas mediante las pruebas serológicas de PTA-ELISA y DAS-ELISA, siguiendo los protocolos N° 2 y 3 descritos en el Anexo I, respectivamente. Se utilizaron orquídeas sanas e infectadas como controles negativos y positivos de las técnicas, respectivamente. Las muestras con valores de absorbancia correspondientes al doble del promedio de los valores de lecturas de plantas sanas, fueron consideradas enfermas.

RESULTADOS

Purificación de partículas virales

En el gradiente de cloruro de cesio se observó una banda opalescente no definida en la fracción correspondiente al 30%. Asimismo, se observó un precipitado denso en la fracción correspondiente al 40%. Las dos bandas observadas en el gradiente fueron seleccionadas, precipitadas y evaluadas por espectrofotometría obteniéndose valores de $0.18 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $0.25 \mu\text{g ml}^{-1}$ para la fracción del 30% (Fig. 2) y del 40%, respectivamente. Estos resultados indican concentración de partículas virales en cada una de las fracciones evaluadas.

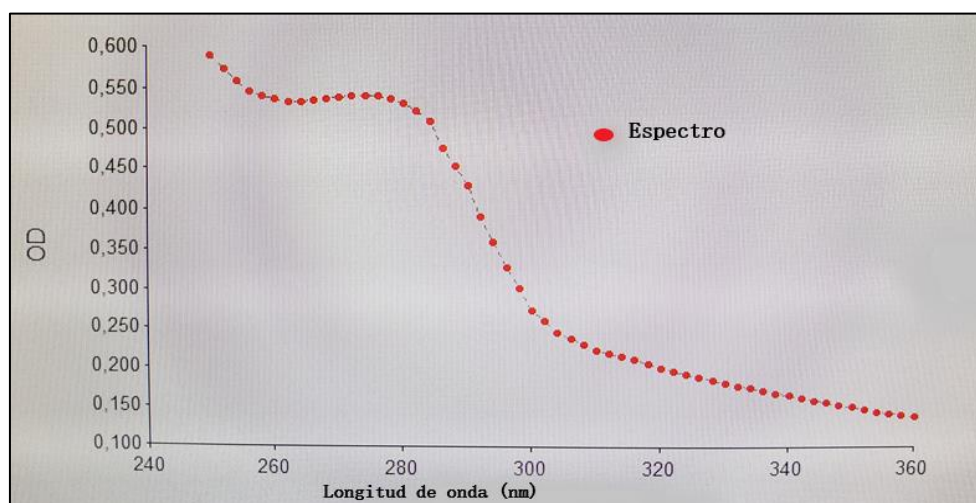


Figura 2. Lectura al espectrofotómetro (λ 405nm) correspondiente a la banda observada en la fracción del gradiente del 30%.

Microscopía electrónica

Las dos bandas formadas en el gradiente fueron evaluadas por microscopía electrónica observándose en la banda superior (gradiente del 30%) gran cantidad de partículas rígidas de aproximadamente 300 nm de longitud, correspondientes al ORSV, y escasas partículas virales flexuosas que corresponderían al CymMV (Fig. 3). En la banda inferior (gradiente del 40%) se visualizó una alta concentración de partículas flexuosas de unos 480 nm de longitud, características del CymMV, y partículas aisladas, rígidas de unos 300 nm de longitud, correspondientes al ORSV (Fig. 4).

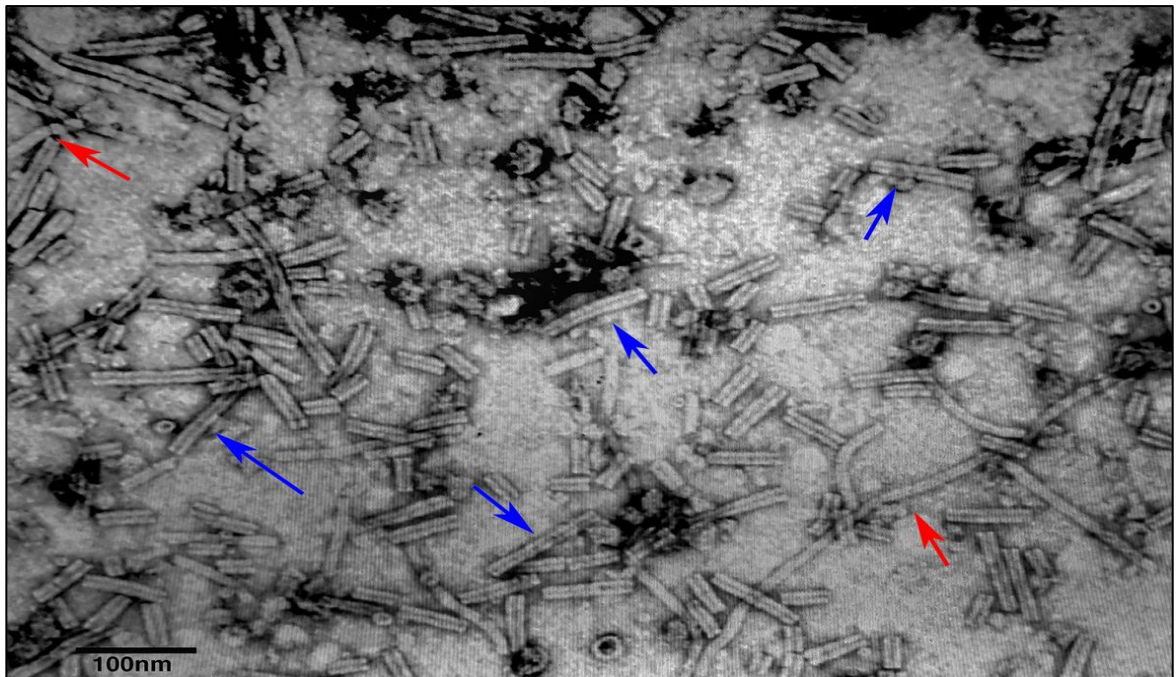


Figura 3. Preparado de fracciones recuperadas de purificación viral, observadas al MET. Las flechas azules indican partículas virales rígidas, correspondientes a ORSV; las flechas rojas señalan partículas virales flexuosas que corresponderían al CymMV.

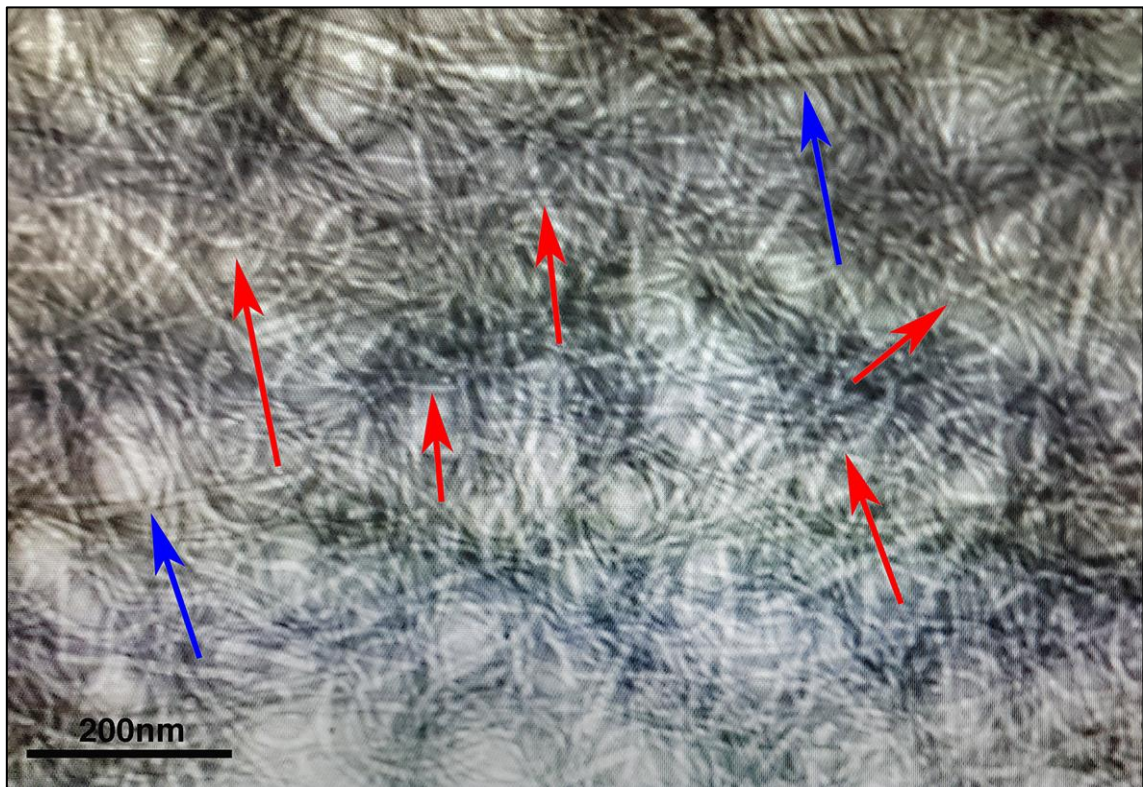


Figura 4. Preparado de fracciones recuperadas de purificación viral, observadas al MET. Las flechas azules indican partículas virales rígidas, correspondientes a ORSV; las flecha roja señalan una partículas virales flexuosas que corresponderían al CymMV.

Titulación de antisueros

La titulación de antisueros se llevó a cabo mediante la técnica de NC-ELISA. La tabla 1 presenta el esquema de siembra que se utilizó para la evaluación de todas las sangrías, provenientes de cada uno de los conejos utilizados para la producción de los anticuerpos.

Tabla 1. Esquema de sembrado en membranas de nitrocelulosa para titulación de sangrías.					
T	E_{mix}	E_O	P_{CymMV}	S_N	S_O
S_N	S_O	P_{ORSV}	E_{mix}	E_O	B

Referencias:









T: tampón; **S_N:** Nicotiana sana; **E_O:** Orquídea enferma; **S_O:** Orquídea sana.

E_{mix}: Enfermo mix (planta infectada con ORSV + CymMV).

P_{CymMV}: Purificación viral de CymMV.

P_{ORSV}: Purificación viral de ORSV.

La sangría correspondiente a los 14 días, de ambos conejos, mostraron reacción contra CymMV y no reaccionaron contra ORSV ni contra plantas sanas (Tabla 2).

Tabla 2. Membranas de nitrocelulosa mostrando la reacción obtenida con las diferentes diluciones de la primera sangría.		
14 días	CymMV	ORSV
1/100		
1/1000		
1/10000		
1/100000		

Las sangrías correspondientes a los 31 y 41 días, de ambos conejos, mostraron reacción contra ORSV y CymMV por igual, sin presentar reacción contra plantas sanas (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Membranas de nitrocelulosa mostrando la reacción obtenida con las diferentes diluciones de la segunda sangría.












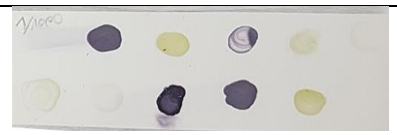

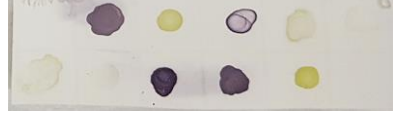


31 días	CymMV	ORSV
1/100		
1/1000		
1/10000		
1/100000		

Tabla 4. Membranas de nitrocelulosa mostrando la reacción obtenida con las diferentes diluciones de la última sangría.

41 días	CymMV	ORSV
1/100		
1/1000		
1/10000		
1/100000		

A partir de los resultados obtenidos en la titulación de los antisueros, se seleccionaron diferentes sangrías para desarrollar las técnicas de PTA-ELISA y DAS-ELISA, respectivamente. Para PTA-ELISA se seleccionó la primera sangría (14 ds) del conejo inoculado con CymMV, puesto que este antisuero mostró reacción específica sólo para este virus. Por el contrario, para PTA-ELISA se escogió la tercer sangría (41 ds) del conejo inyectado con ORSV. Para la técnica de DAS-ELISA se seleccionaron las sangrías correspondientes a los 31 días del conejo inoculado con ORSV.

Calibración de la técnica de Placa Tapizada con Antígeno (PTA)

La Figura 5 muestra el esquema de calibración seguido para evaluar la reacción de los antisueros. El antisuero correspondiente al conejo inoculado con CymMV no mostró diferencias entre las lecturas correspondientes a los controles, por lo que el mismo fue descartado para esta técnica.

Por el contrario, respecto al conejo inoculado con ORSV, se seleccionó el antisuero diluido 1/2000 por ser la máxima dilución que permite diferenciar entre controles sanos y enfermos. Sin embargo, este antisuero presenta reacción contra ambos patógenos virales, por lo que esta prueba permite la detección tanto de ORSV como de CymMV.

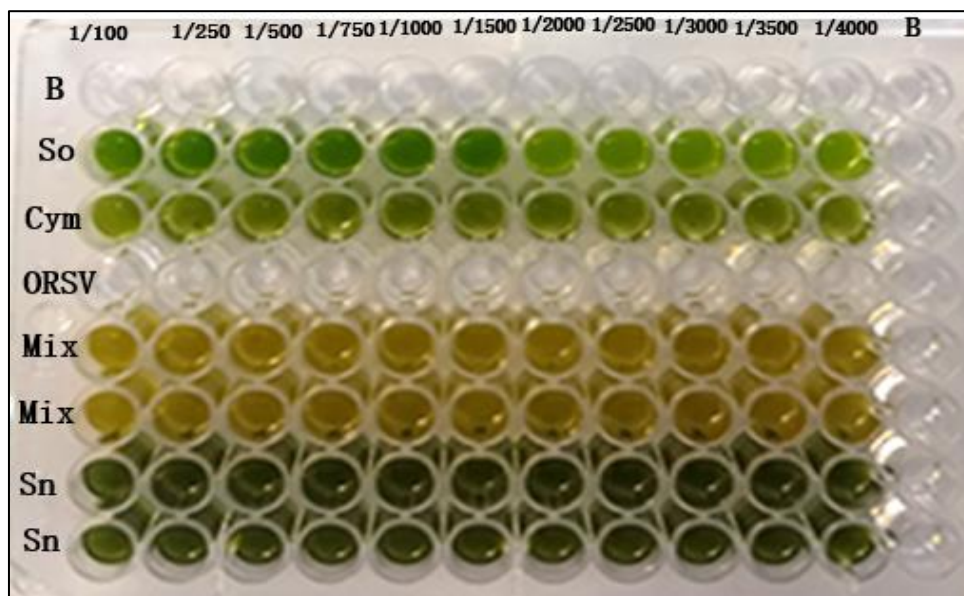


Figura 5. Placa de calibración de antisuero para la técnica de PTA-ELISA. Placa con sembrado de testigos. **B:**Tampón; **So:** Orquídea Sana, **Cym:** Nicotiana con aislamiento de CymMV; **ORSV:** Purificación viral de ORSV; **Mix:** Testigo con ambas infecciones; **Sn:** Sana nicotiana.

Calibración de la inmunoglobulina y el conjugado para DAS-ELISA

Se trabajó con la sangría del día 31 del conejo inoculado con ORSV. En la Tabla 5 se presenta el esquema de siembra utilizado para las distintas diluciones. Durante la calibración se determinó que la mejor combinación fue la dilución 1/500 tanto para la inmunoglobulina como para el conjugado, ya que a esas concentraciones se pudo observar una diferencia significativa entre los testigos sanos y los testigos enfermos (Anexo 2).

Tabla 5: Esquema de sembrado.		
S_O	S_N	E_O
P_{ORSV}	P_{CymMV}	S_O

Referencias:

S_O: Orquídea Sana, **S_N**: Nicotiana Sana; **E_O** Orquídea; enferma; **P_{ORSV}**: Purificación viral de ORSV; **P_{CymMV}**: Purificación viral de CymMV.

Los resultados obtenidos por DAS-ELISA mostraron que los anticuerpos reaccionan contra ambos patógenos virales por lo que esta prueba permite identificar plantas enfermas con ORSV y CymMV.

Análisis de plantas de producción y/o comercialización local con los antisueros obtenidos

Se recolectaron 61 muestras provenientes de orquídeas que manifestaban síntomas característicos de infección viral, como puntos necróticos y amarronamiento de las flores, y manchas cloróticas y necróticas en las hojas (Fig. 2). Asimismo, se colectaron 2 muestras a partir de orquídeas asintomáticas.



Figura 6. Plantas de orquídeas recolectadas en viveros de Córdoba. **(A)** Flor con puntos necróticos de la especie *Phaleanopsis*; **(B)** Flores amarronadas de una orquídea del género *Cymbidium*; **(C)** Plantas del género *Dendrobium* manifestando manchas cloróticas y necróticas en hojas.

Las muestras colectadas se sembraron en dos placas diferentes, numeradas del 1 al 33 y del 34 al 64, respectivamente (Anexo 3). Para la interpretación del PTA-ELISA, aquellas muestras con valores de absorbancia mayores a 0.015 para la placa con muestras 1 a 33 y 0.089 para la placa 34 a 64, se consideraron positivas. Un total de 10 muestras, correspondientes a orquídeas de diferentes géneros, reaccionaron contra el antisuero producido. A su vez, se identificaron plantas infectadas en todos los establecimientos visitados (Tabla 6).

Las mismas muestras fueron analizadas por DAS-ELISA siguiendo el mismo esquema de siembra en ambas placas (Anexo 2). Para el análisis de los resultados, los valores de absorbancia de 0.012 para la placa 1-33 y 0.001 para la placa 34-64 fueron considerados el punto de corte para clasificar las muestras como sanas o infectadas. En base a ello, se identificaron 11 muestras positivas para la infección viral, las cuales correspondían a orquídeas de diferentes géneros y distintos establecimientos (Tabla 6).

Entre las muestras infectadas con virus se encuentran plantas provenientes de otras provincias multiplicadoras/productoras, las cuales estarían distribuyendo plantas infectadas a los diferentes sitios de comercialización (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados del análisis serológicos de muestras de orquídeas colectadas en establecimientos de la provincia de Córdoba.

Vivero/ Espacio público	Género de orquídeas	N° de muestras evaluadas	Muestras Positivas		Procedencia
			PTA	DAS	
Vivero 1	<i>Cattleya</i>	1	---	---	Desconocida
	<i>Dendrobium</i>	2	2	---	
	<i>Oncidium</i>	1	---	---	
Vivero 2	<i>Cymbidium</i>	8	2	2	Proveedor de Escobar, Bs. As.
	<i>Phaleonopsis</i>	6	1	2	
Vivero 3	<i>Dendrobium</i>	11	1	1	Desconocida
	<i>Phaleonopsis</i>	5	2	1	
Vivero 4	<i>Cymbidium</i>	4	1	1	Desconocida
	<i>Phaleonopsis</i>	7	---	3	
Jardín Botánico de Córdoba	Desconocida	1	---	---	Desconocida
	<i>Brassavola</i>	1	---	---	
	<i>Cattleya</i>	1	---	---	
	<i>Christensonella</i>	1			
	<i>Cymbidium</i>	2			
	<i>Oncidium</i>	4	1		
	<i>Epidendrum</i>	3			
	<i>Híbrido</i>	1		1	
	<i>Leptotes</i>	1			
	<i>Miltonia</i>	1			
	<i>Encyclia</i>	1			NOA
<i>Epidendrum</i>	1			Misiones	

Las muestras provenientes de plantas asintomáticas resultaron negativas en las pruebas realizadas con ambas técnicas serológicas.

DISCUSIÓN

En la purificación de partículas virales utilizando un gradiente de cloruro de cesio se obtuvieron dos fracciones bien diferenciadas. Una de las fracciones contenía alta concentración de viriones del CymMV, mientras que la otra presentó gran cantidad de partículas correspondientes al ORSV. Sin embargo, en ambas bandas se observó la presencia de ambos virus, encontrándose uno de ellos en baja proporción.

A pesar de que las purificaciones virales inoculadas a los conejos contenían mayoritariamente uno de los dos virus, las reacciones de los anticuerpos de los conejos reconocieron a ambos virus como antígenos. Por ello, en la titulación y calibración de las técnicas serológicas se observaron reacciones positivas para ambos virus.

En la evaluación de los antisueros se observó un sucesivo incremento en las titulaciones con baja reacción contra proteínas normales de las plantas sanas, lo que hace suponer que podría haberse realizado una cuarta sangría.

Se desarrollaron reactivos para dos técnicas serológicas, el PTA-ELISA y el DAS-ELISA, sin embargo, los resultados obtenidos a partir de la evaluación de material vegetal infectado, mostraron que la técnica de DAS-ELISA presentó mayor sensibilidad, pudiendo de esta manera identificar plantas infectadas aún con bajas concentraciones del patógeno.

Durante el mes de agosto de 2018, se realizó un trabajo prospectivo donde se evaluaron, con los reactivos elaborados, un grupo de muestras provenientes de plantas de orquídeas colectadas en diferentes establecimientos comerciales de la ciudad de Córdoba y del Jardín Botánico de Córdoba. La mayoría de las muestras colectadas presentaban síntomas característicos de infección viral, pero sólo el 15.87% según la técnica de PTA-ELISA y el 17.46% en base a las pruebas de DAS-ELISA, resultaron positivas. Estos valores pueden haber resultado bajos debido a la época del muestreo, puesto que las bajas temperaturas no favorecen la multiplicación de los virus en plantas. Otro motivo puede atribuirse a que los síntomas estuviesen asociados a otros factores como deficiencias nutricionales, fitotoxicidad, nemátodos u otras enfermedades causadas por hongos o bacterias. Asimismo, las diferencias observadas en los resultados de las pruebas de DAS y PTA-ELISA podrían deberse a la distribución desigual de estos patógenos en los diferentes tejidos de la planta e incluso, dentro de un mismo tejido.

Igualmente, los resultados obtenidos en los análisis serológicos muestran una alta prevalencia de estos patógenos en los establecimientos relevados ya que en todos los puntos de comercialización fueron detectadas orquídeas infectadas con virus.

En uno de los establecimientos visitados las plantas de orquídeas procedían de Escobar (Buenos Aires), una de las principales zonas florícolas de Argentina. Este hecho indicaría una distribución de material vegetal infectado, favoreciendo de esta manera la dispersión de estos patógenos hacia otras zonas de multiplicación, producción y/o comercialización de orquídeas, pudiendo de esta manera corroborar la hipótesis planteada en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

Se desarrollaron reactivos serológicos para el diagnóstico de los dos virus más importantes que infectan plantas de la familia *Orchidaceae*, el CymMV y el ORSV. Estos reactivos pueden emplearse en las técnicas de PTA-ELISA y DAS-ELISA, siendo la segunda más sensible. Ambos kits serológicos, el antisuero para PTA-ELISA y las Ig + Ig conjugada para DAS-ELISA, reaccionan contra los dos virus. De este modo, los relevamientos pueden llevarse a cabo de manera más rápida y económica ya que una única prueba permite detectar plantas infectadas con CymMV, con ORSV, o plantas que se encuentran co-infectadas por ambos patógenos.

Los estudios prospectivos realizados en este trabajo permitieron detectar por primera vez, orquídeas infectadas con CymMV y ORSV en la provincia de Córdoba. A su vez, se pudo determinar que ambos patógenos infectan diversos géneros de orquídeas.

Se identificaron plantas enfermas provenientes de centros de multiplicación y producción de orquídeas ubicados en la provincia de Buenos Aires. Esto implica que actualmente se comercializa material vegetal infectado favoreciendo la dispersión de estos patógenos a diferentes regiones de nuestro país.

La obtención de estos antisueros nos permite identificar aquellas plantas que están afectadas por alguno de estos patógenos, lo que ayudará a promover la producción, multiplicación y/o comercialización de orquídeas libres de CymMV y ORSV, tanto en la provincia de Córdoba, como en el resto del territorio nacional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anthura. 2018. <https://www.anthura.nl/sobre-nosotros/plantulas/?lang=es>
2. Arditti, J.; Ernst R. 1993. Micropropagation of Orchids. John Wiley & Sons. New York. 682 pp.
3. Cánovas, S. E.; Ballari, M. C.; Nome, C. F. 23016. First report of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ring spot virus in Argentina. Australasian Plant Disease Notes 11: 2.
4. Elicriso. 2018. Enfermedades y curas de las orquídeas. <http://www.elicriso.it/es/orquideas/enfermedades/>.
5. Freuler, M. J. 2003. 100 Orquídeas argentinas. Editorial Albatros. 128 pp.
6. Freuler, M. J. 2007. Orquídeas. Editorial Albatros. 168 pp.
7. Hartmann, H. T.; Kester, D. E. 1991. Propagación de plantas: principios y prácticas. Editorial Continental. 1er Edición. México. 733 pp.
8. Hu, S.; Ferreira, S.; Wang, M.; Xu, M. Q. 1993. Detection of Cymbidium mosaic virus, Odontoglossum ringspot virus, Tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. Plant Disease 77: 464-468.
9. ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) Online (10th) Report. 2017. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/.
10. Kitajima, E. W. y Nome C. F. 1999. Microscopía electrónica en virología vegetal. En: Métodos para detectar patógenos sistémicos. Docampo D. M. y Lenardon S. L. (eds.). Primera Edición. IFFIVE-INTA-JICA. Córdoba, Argentina. pp. 59-87.
11. Mascarini, L.; Tissera, F. 2010. Caracterización del Sector Florícola. 72 pp.
12. Morisigue, D. E.; Mata, D. A.; Facciuto, G. y Bullrich, L. 2012. Floricultura. Pasado y presente de la Floricultura Argentina. Ediciones INTA – GESyC.
13. Muñoz, J. O. 2018. Virus. Producción de material libre de virus. Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. <http://agro.unc.edu.ar/~fito/teoricos/viruslibrevirus.pdf>
14. Orquídeas: enfermedades: virus parte 5. 2015. Obtenido de: <https://misorquideassb.wordpress.com/2015/04/22/orquideas-enfermedades-virus-parte-5/>.

15. 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.
16. Pradhan, S.; Regmi, T.; Ranjit, M.; Pant, B. 2016. Production of virus-free orchid *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. by various tissue culture techniques. *Heliyon* 2: e00176.
17. Rebeca Alicia Menchaca García. 2011. Manual para la propagación de orquídeas. Obtenido de: http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/manual_para_la_propagacion_de_orquideas.pdf.
18. Solís Juárez, R. 2009. El cultivo de la orquídea. *Red del campo*. Num. 483.
19. 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.
20. Tuma Borgonovo, M. A. 2017. *Guía Práctica de Floricultura*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.
21. - Salamanca, V. 2018. *Revista Chacra*. <http://www.revistachacra.com.ar/nota/6546/>.
22. -Zettler, F. W.; Ko, N. J.; Wisler, G. C.; Elliott, M. S.; Wong S. M. 1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Disease* 74: 621-626.

ANEXO 1

PROTOCOLOS DE TÉCNICAS SEROLÓGICAS

Y TAMPONES EMPLEADOS

Protocolo N° 1. NC-ELISA
(nitrocellulose-enzyme linked immunosorbent assay)

- 1.- Embeber la membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD, California, USA) en tampón tris salino.
- 2.- Macerar las muestras en tampón de extracción en una dilución 1:10 p/v y centrifugar las mismas 5 min a 5.000 rpm (Sakuma M150-IVD).
- 3.- Sembrar sobre la membrana 30 µl del sobrenadante de cada muestra usando vacío.
- 4.- Incubar la membrana en tampón de bloqueo toda la noche a T° ambiente, en agitación.
- 5.- Realizar 3 lavados de 10 min cada uno con tampón de lavado.
- 6.- Incubar la membrana con el As primario específico para el virus a estudiar, diluido 1:1.000 en tampón antisuero. Mantener la membrana en agitación por 2 h a T° ambiente.
- 7.- Realizar 3 lavados de 10 min cada uno con tampón de lavado
- 8.- Incubar la membrana con el As secundario IgG de cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (BIO-RAD, California, USA), diluido 1:3.000 en tampón antisuero. Mantener la membrana en agitación por 2 h a T° ambiente.
- 7.- Realizar 3 lavados de 10 min cada uno con tampón de lavado.
- 8.- Revelar la reacción inmunogénica utilizando 30 mg/ml de tetrazolium nitroazul (NBT) y 15 mg/ml de fosfato bromo cloro indolil (BCIP) en tampón sustrato, hasta que los controles positivos desarrollen un color púrpura bien definido.
- 9.- Sumergir la membrana en agua destilada para detener la reacción.

Tampones empleados en NC-ELISA:

Tampón tris salino (TBS pH 7,4): 0,02 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl.

Tampón de lavado (TBS-Tween): TBS + 0,05 % Tween 20.

Tampón de extracción: TBS + 0,05 % Tween 20 + 0,01 M DIECA + 0,02 % NaN₃.

Tampón de bloqueo: TBS + 5 % leche descremada + 2 % Triton X-100.

Tampón antisuero: TBS + 2 % leche descremada.

Tampón sustrato (pH 9,5): 0,1 M Tris; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl₂.

Protocolo N° 2. PTA-ELISA *(plate-trapped antigen-enzyme linked immunosorbent assay)*

Como soporte de la prueba se emplearon placas *Immunoplate MaxiSorp® (Nunc™ USA)* con 96 celdas de fondo plano.

- 1.- Macerar el tejido en tampón de sensibilización en relación 1/5 (p/v) y colocar en cada celdilla. Incubar a 37°C durante 30 min.
- 2.- Realizar 3 lavados de 3 minutos con tampón de lavado.
- 3.- Diluir el antisuero en tampón enzima y colocar en cada celdilla. Incubar a 37°C por 1h.
- 4.- Lavar la placa como en el paso 2.
- 5.- Ubicar en la placa la anti-IgG diluida 1:3000 en tampón enzima e incubar por 1 h a 37 °C.
- 6.- Lavar la placa como en el paso 2.
- 7.- Revelar la reacción mediante el agregado de 0.8 mg/ml en tampón sustrato de p-nitrofenilfosfato disódico (*Sigma Diagnostics*).
- 8.- Registrar las lecturas de absorbancia a 405nm de longitud de onda (A_{405}) con lector de ELISA.

Tampones empleados en PTA-ELISA:

Tampón fosfato salino (PBS pH 6,8): 1 mM KH_2PO_4 ; 8 mM Na_2HPO_4 ; 0,13 M NaCl; 3 mM KCl; + 0,02 % NaN_3 .

Tampón de cobertura (pH 9,6): 15 mM Na_2CO_3 ; 35 mM NaHCO_3 ; + 0,02 % NaN_3 .

Tampón de lavado (PBS-Tween): PBS + 0,05 % Tween 20.

Tampón de extracción: PBS-Tween + 2% polivinilpirrolidona (PVP)-40.000.

Tampón enzima: tampón de extracción + 0,2 % de ovoalbúmina.

Tampón sustrato (pH 9,7): 97 ml de dietanolamina; 800 ml de agua destilada; + 0,02 % NaN_3 .

Protocolo N° 3. DAS-ELISA

(double antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay)

Como soporte de la prueba se emplearon placas *Immunoplate MaxiSorp® (Nunc[™] USA)* con 96 celdas de fondo plano.

A continuación, se describen los pasos a seguir:

- 1.- Sensibilizar la placa con la IgG específica del virus a estudiar, diluida 1:200 en tampón de cobertura. Incubar por 4 h a 37 °C.
- 2.- Realizar 3 lavados de 5 min cada uno con tampón de lavado.
- 3.- Sembrar en la placa las muestras maceradas 1/5 (p/v) en tampón de extracción. Incubar toda la noche a 4° C.
- 4.- Realizar 3 lavados de 5 min cada uno con tampón de lavado.
- 5.- Ubicar en la placa la IgG específica del virus conjugada con la enzima fosfatasa alcalina, diluida 1:200 en tampón de conjugado (enzima). Incubar por 4 h a 37 °C.
- 6.- Realizar 3 lavados de 5 min cada uno con tampón de lavado.
- 7.- Revelar la reacción mediante el agregado de 0,8 mg/ml en tampón sustrato de p-nitrofenilfosfato disódico (*Sigma Diagnostics*).
- 8.- Registrar las lecturas de absorbancia a 405nm de longitud de onda (A_{405}) con lector de ELISA.

Tampones empleados en DAS-ELISA:

Tampón fosfato salino (PBS pH 6,8): 1 mM KH_2PO_4 ; 8 mM Na_2HPO_4 ; 0,13 M NaCl; 3 mM KCl; + 0,02 % NaN_3 .

Tampón de cobertura (pH 9,6): 15 mM Na_2CO_3 ; 35 mM NaHCO_3 ; + 0,02 % NaN_3 .

Tampón de lavado (PBS-Tween): PBS + 0,05 % Tween 20.

Tampón de extracción: PBS-Tween + 2% polivinilpirrolidona (PVP)-40.000.

Tampón de conjugado (enzima): tampón de extracción + 0,2 % de ovoalbúmina.

Tampón sustrato (pH 9,7): 97 ml de dietanolamina; 800 ml de agua destilada; + 0,02 % NaN_3 .

ANEXO 2

LECTURAS DE PLACAS DE CALIBRACION Y MUESTRO CON LAS TECNICAS PTA Y DAS-ELISA

Calibración de antisueros para PTA-ELISA

CymMV 5 ON 4C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0,003	-0,002	-0,005	-0,003	-0,005	-0,006	-0,007	-0,007	-0,007	-0,007	-0,008
B	0,768	0,388	0,152	0,101	0,079	0,066	0,038	0,049	0,039	0,023	0,029	-0,007
C	0,717	0,401	0,169	0,133	0,071	0,091	0,055	0,054	0,035	0,023	0,026	-0,008
D	0,362	0,244	0,196	0,148	0,099	0,157	0,104	0,105	0,074	0,052	0,044	-0,006
E	0,57	0,304	0,193	0,15	0,114	0,103	0,061	0,061	0,044	0,052	0,032	-0,007
F	0,505	0,232	0,174	0,137	0,124	0,082	0,037	0,03	0,028	0,049	0,039	-0,007
G	0,194	0,048	0,038	0,027	0,022	0,014	0,006	0,005	0,003	0,01	0,007	-0,007
H	0,093	0,033	0,026	0,014	0,015	0,009	0,005	0,005	0,004	0,005	0,006	-0,006

orsV 5 ON 4C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0,002	-0,006	0,017	-0,011	-0,011	-0,006	-0,009	-0,012	-0,012	-0,013	-0,014
B	0,056	0,189	0,116	0,108	0,112	0,076	0,066	0,002	0,042	0,012	0,035	-0,013
C	0,092	0,158	0,041	0,124	0,198	0,147	0,117	0,007	0,053	0,025	0,059	-0,013
D	0,258	1,506	1,535	1,761	1,563	1,434	1,215	0,128	0,62	0,677	0,562	-0,009
E	0,266	0,558	0,504	0,451	0,379	0,297	0,254	0,05	0,114	0,157	0,123	-0,013
F	0,275	0,4	0,077	0,465	0,382	0,319	0,227	0,069	0,209	0,166	0,131	-0,009
G	0,234	0,181	0,333	0,249	0,237	0,144	0,152	0,074	0,018	0,071	0,045	-0,01
H	0,414	0,5	0,338	0,268	0,257	0,18	0,049	0,105	0,013	0,065	0,04	-0,014

Lecturas de calibración de Antisueros para **PTA-ELISA**. Arriba: antisuero para CymMV no evidenciando ninguna reacción específica para controles. Abajo: antisuero para ORSV mostrando reacción diferencial entre plantas sanas y controles.

Calibración de antiseros para DAS-ELISA

CYMMV 3º LECTURA	lg 1/500			lg 1/1000			lg 1/1500			lg 1/2000		
Conj 1/500	0	0,1	0,071	0,129	0,12	0,082	0,116	0,078	0,069	0,112	0,074	0,071
	0,08	0,154	0,15	0,09	0,157	0,145	0,088	0,133	0,082	0,093	0,125	0,117
Conj 1/1000	0,2	0,088	0,076	0,166	0,1	0,079	0,182	0,093	0,317	0,201	0,082	0,074
	0,363	0,229	0,203	0,096	0,525	0,204	0,101	0,176	0,163	0,105	0,137	0,311
Conj 1/1500	0,24	0,223	0,096	0,206	0,106	0,104	0,184	0,356	0,11	0,167	0,309	0,089
	0,166	0,262	0,243	0,113	0,251	0,206	0,117	0,211	0,232	0,117	0,169	0,153
Conj 1/2000	1,354	1,67	0,557	3,416	0,522	0,128	0,47	0,244	0,203	1,002	0,535	0,839
	0,267	1,506	1,621	0,303	0,908	0,551	0,637	1,342	1,539	0,159	0,368	0,351

ORSV 3º LECTURA	lg 1/500			lg 1/1000			lg 1/1500			lg 1/2000		
Conj 1/500	0	0,043	0,049	3,689	0,069	0,049	3,706	0,043	0,061	2,863	0,172	0,069
	0,167	3,243	?????	0,138	3,301	3,548	0,146	3,46	3,738	0,097	1,638	0,674
Conj 1/1000	2,548	0,026	0,037	2,006	0,026	0,033	2,011	0,026	0,043	1,225	0,08	0,057
	0,085	1,805	2,599	0,232	1,785	1,99	0,068	1,996	1,888	0,05	0,653	0,486
Conj 1/1500	1,986	0,018	0,032	1,66	0,041	0,027	1,548	0,029	0,023	0,887	0,046	0,062
	0,066	1,402	2,021	0,063	1,474	1,6	0,048	1,57	1,583	0,039	0,847	0,363
Conj 1/2000	1,506	0,03	0,037	1,152	0,053	0,04	1,274	0,055	0,116	0,651	0,05	0,087
	0,041	0,965	1,431	0,046	0,946	1,033	0,114	1,032	1,063	0,088	0,72	0,043

Lecturas de calibración de IgGs y conjugado para **DAS-ELISA**. Arriba: antisuero para CymMV marcando mejores las opciones de uso.
Abajo: antisuero para ORSV marcando las mejores opciones para su uso.

Muestreo de Orquídeas. Lecturas de DAS ELISA

Placa 1-33	1	2	3	4	5	6	7	9	9	10	11	12
A	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	S	10
B	11	S	12	13	14	15	16	17	18	S	19	20
C	B	22	S	23	24	25	26	27	S	28	29	30
D	31	32	33	S	E	1	2	S	4	3	5	6
E	7	8	9	10	S	11	S	12	13	14	15	16
F	17	18	19	20	B	S	22	23	24	25	E	26
G	27	28	29	30	31	32	33	5	6	7	8	14
H	E	15	16	17	18	23	26	30	31	5	6	7

Esquema de sembrado de muestras 1-33. **B**: tampón; **S**: testigos sanos; **E**: Purificación viral

1º lectura 1-33 1h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	-0,003	-0,001	-0,009	0,002	-0,003	-0,003	0,006	0,601	0,625	-0,001	0,001
B	-0,004	-0,006	0,001	-0,005	-0,007	-0,01	-0,008	-0,006	0,213	-0,007	-0,008	-0,009
C	0,047	-0,002	0,006	-0,005	-0,011	0,002	-0,01	-0,01	-0,005	-0,012	-0,006	-0,003
D	-0,004	0,026	0,001	-0,003	0,658	-0,01	-0,004	-0,006	-0,004	-0,008	-0,006	-0,007
E	0,009	0,669	0,659	0,013	-0,003	-0,001	-0,004	-0,004	-0,006	-0,005	-0,005	-0,001
F	0,014	0,287	-0,006	-0,009	-0,001	-0,002	-0,011	-0,002	-0,01	-0,008	0,716	-0,008
G	0	-0,008	0,001	0,003	-0,005	-0,002	-0,002	-0,004	-0,007	-0,003	0,622	-0,001
H	0,743	-0,001	0,003	0,003	0,262	0,008	-0,007	-0,001	-0,005	0,001	-0,002	0,002

Lecturas de DAS-ELISA de las muestras de orquídeas colectadas durante el muestreo realizado en la ciudad de Córdoba en agosto de 2018.

Placa 34-64	1	2	3	4	5	6	7	9	9	10	11	12
A	B	34	35	36	37	38	39	40a	40b	41	S	42
B	43	S	44	45	46	27	48	49	50	S	51	52
C	53	54	S	55	56	57	58	59	S	60	61	62
D	63	64	B	S	E	B	B	S	34	35	36	37
E	38	39	40a	40b	S	41	S	42	43	44	45	46
F	47	48	49	50	51	S	52	53	54	55	E	56
G	57	58	59	60	61	62	63	64	50	51	52	53
H	E	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64

Esquema de sembrado de muestras 34-64. **B**: tampón; **S**: testigos sanos; **E**: Purificación viral

1º lectura 34-65 1h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	-0,009	0,011	0,004	-0,023	0,232	-0,026	-0,023	0,668	-0,027	-0,029	-0,027
B	0,499	-0,032	-0,03	0,213	-0,029	-0,032	-0,025	-0,03	-0,025	-0,031	-0,021	-0,024
C	-0,03	-0,031	-0,017	-0,03	-0,003	-0,03	-0,032	-0,021	-0,033	-0,034	-0,035	-0,03
D	-0,028	0,271	-0,033	-0,027	0,676	-0,033	-0,021	-0,037	-0,035	-0,037	-0,036	-0,028
E	0,224	-0,03	-0,032	0,485	-0,031	-0,036	-0,035	-0,035	0,308	-0,032	0,206	-0,026
F	-0,018	-0,028	-0,035	-0,031	-0,026	-0,024	-0,036	-0,037	-0,039	-0,034	0,693	-0,009
G	-0,022	-0,022	-0,031	-0,029	-0,03	-0,028	-0,027	0,251	-0,032	-0,032	-0,028	-0,029
H	0,756	-0,03	-0,029	-0,031	-0,031	-0,029	-0,032	-0,027	-0,031	-0,024	-0,026	0,212

Lecturas de DAS-ELISA de las muestras de orquídeas colectadas durante el muestreo realizado en la ciudad de Córdoba en agosto de 2018.

