



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**“IDENTIFICACIÓN DE *Botrytis sp* POR MEDIO DE LA
TÉCNICA DE ELISA (ENZIME LINKED INMUNOSORBENT
ASSAY)”**

“TESIS DE GRADO PREVIA A
LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERÍA
AGROPECUARIA”

AUTORA:

Karina de los Ángeles Samaniego Palacios

DIERCTORA DE TESIS:

Ing. Jacqueline Elizabeth Rojas Rojas

LOJA – ECUADOR

2009

CESIÓN DE DERECHOS EN TESIS DE GRADO

Yo, Karina de los Ángeles Samaniego Palacios declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Karina de los Ángeles Samaniego Palacios

AUTORA

CERTIFICACIÓN DE LA DIRECTORA DE TESIS

Ing. Jacqueline Rojas
DOCENTE INVESTIGADOR

CERTIFICA:

Que la tesis "Identificación de *Botrytis sp* por medio de la técnica de ELISA (Enzime Linked Inmunosorbent Assay)" de autoría de la Srta. Karina de los Ángeles Samaniego Palacios, se realizó bajo mi dirección y control personal, y autorizo para su publicación y defensa.

Loja,

Ing. Jacqueline Rojas
DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Yo, Karina de los Ángeles Samaniego Palacios declaro ser la autora del trabajo de tesis "Identificación de *Botrytis sp* por medio de la técnica de ELISA (Enzime Linked Inmunosorbent Assay)", que ha sido realizado en su integridad y que no se ha publicado anteriormente.

Karina de los Ángeles Samaniego Palacios
AUTORA

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a Dios, por ser la guía de mi vida, a mi Madre Magdalena ya que con su sacrificio, amor y sabios consejos me ha orientado por el camino del éxito, a mi Padre José Luis por sus enseñanzas y consejos que me hacen ser mejor persona, y a mis hermanos por su apoyo y aliento en todo momento quienes son la mejor bendición que Dios me dio.

AGRADECIMIENTO

Mi sincero agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja, a todos quienes conforman la Escuela de Ingeniería Agropecuaria y de manera especial al personal que labora en el Laboratorio de Servicios Agropecuarios (LABSA).

A mi directora de Tesis Ing. Jacqueline Rojas, por su gran calidad humana, orientación y apoyo a la culminación de este proyecto.

A la Dra. Lucía Guzmán, por su orientación, apoyo y consejos.

Al Dr. Luis Rodrigo Saa, por su orientación y colaboración en la realización de este trabajo.

A la Dra. Marisela Hernández por su asesoría, colaboración y orientación.

Al Dr. Rubén Carrera, por su orientación y colaboración.

Al Sr. Luis Mendoza propietario del orquideario de Vilcabamba, y a los propietarios de Ecuagenera, por facilitar el acceso para la toma de muestras.

A Diego Jara, Daniel Sotomayor, Rosa Sinchire y Vivian Tapia por su valiosa ayuda y buena disponibilidad.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii

Índice de Contenidos.....	iii
Índice de Tablas.....	vi
Índice de Figuras.....	vii
Resumen.....	vii
I. Introducción.....	1
II. Objetivos.....	2
2.1 Objetivo general.....	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
III. Marco Teórico.....	3
3.1 Las Orquídeas.....	3
3.1.1. Generalidades.....	3
3.1.2. Morfología de las orquídeas.....	3
3.1.2.1. Raíz.....	3
3.1.2.2. Tallo.....	3
3.1.2.3. Hoja.....	3
3.1.2.4. Flor.....	4
3.1.2.5. Polen.....	4
3.1.2.6. Fruto.....	4
3.1.2.7. Semilla.....	4
3.2. <i>Botrytis sp.</i>	5
3.2.1. Clasificación Taxonómica.....	5
3.2.2. Descripción.....	6
3.2.3. Síntomas.....	6
3.2.4. Ciclo de vida del Hongo.....	7
3.2.5. Control.....	7

3.2.6.	Control biológico.....	8
3.3.	Técnicas Serológicas (ELISA).....	8
3.3.1.	Fundamento.....	8
3.3.1.2.	Antígeno.....	9
3.3.1.3.	Inmunización y preparación del antígeno.....	9
3.3.1.4.	Anticuerpos.....	9
3.3.1.5.	Anticuerpos policlonales.....	10
3.3.1.6.	Especificidad y reacción cruzada.....	10
3.3.2.	Pasos generales de un ELISA.....	11
3.3.3.	Tipos de ensayos ELISA.....	11
3.3.3.1.	ELISA – Directo (Ensayo simple de dos capas).....	12
3.3.3.2.	ELISA – Indirecto.....	12
3.3.3.3.	ELISA – Sandwich (Anticuerpo – antígeno – anticuerpo).....	13
3.3.3.4.	ELISA - Sandiwch“Hadas”.....	13
3.3.3.5.	Método Competitivo.....	14
3.3.4.	Factores que afectan los resultados en ELISA.....	15
IV.	Materiales y Métodos.....	16
4.1.	Zona de Estudio.....	16
4.2.	Fase de Campo.....	16
4.3.	Fase de Laboratorio.....	16
4.3.1.	Obtención de <i>Botrytis sp</i> a partir de material vegetal...	16
4.3.2.	Obtención de anticuerpos para la identificación de <i>Botrytis sp</i>	17
4.3.2.1.	Inmunización.....	17
4.3.2.1.1.	Preparación del antígeno.....	17

4.3.2.1.2.	Protocolo de Inmunización.....	18
4.3.2.1.3.	Determinación de anticuerpos policlonales anti – <i>Botrytis</i> en suero de conejo.....	19
4.3.3.	Identificación de <i>Botrytis sp</i> por la técnica de ELISA.....	21
4.3.3.1.	Extracto de plantas en estudio.....	21
4.3.3.2.	ELISA – Sandwich para la detección de antígenos.....	21
4.3.3.3.	Sensibilidad y Especificidad de la técnica.....	25
V.	Resultados y Discusión	26
5.1.	Diagnóstico de las muestras obtenidas.....	26
5.2.	Descripción de las lesiones en los pétalos causadas por <i>Botrytis sp</i>	27
5.2.1.	Características macroscópicas de <i>Botrytis sp</i>	28
5.2.2.	Características microscópicas de <i>Botrytis sp</i>	28
5.3.	Técnica ELISA – Indirecto.....	29
5.4.	Técnica ELISA – Sandwich.....	30
5.4.1.	Sensibilidad y Especificidad.....	30
VI.	Conclusiones	33
VII.	Recomendaciones	34
VIII.	Bibliografía	35
IX.	Anexos	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
--------------	---------------

1	Protocolos de Inmunización.....	18
2	Dilución del suero 1:100.....	20
3	Dilución del suero 1:200.....	20
4	Placa de ELISA – Sandwich.....	23
5	Determinación de la Sensibilidad y Especificidad de la técnica.....	24
6	Diagnóstico de las especies.....	25
7	Resultados de la Sensibilidad y Especificidad.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página	
1	Lesiones en flor de <i>Catleya sp</i> causadas por <i>Botrytis sp</i>	26

2	Morfología de la colonia de <i>Botrytis sp.</i>	27
3	Morfología de micelio y conidios de <i>Botrytis sp.</i>	27
4	Método de ELISA – Indirecto para la detección de anticuerpos policlonales.....	28
5	Método de ELISA – Indirecto.....	29
6	Método de ELISA – Sandwich para la detección de antígenos.....	30
7	Comparación para la detección de <i>Botrytis sp</i> por medio de la técnica ELISA – Sandwich y el Kit Comercial.....	32

RESUMEN

Las enfermedades causadas por hongos parásitos provocan grandes pérdidas tanto en cultivos como en plantas ornamentales, especialmente en orquídeas. Una de las enfermedades importantes producida por hongos es *Botrytis sp*, cuyo agente causal está ampliamente distribuido a nivel mundial, responsable de pérdidas significativas especialmente en la producción de flores.

Existen muchas técnicas para la identificación de enfermedades una de ellas es la técnica de ELISA - Indirecto que permite la detección de anticuerpos policlonales en suero de conejo, para la cual fue necesario obtener la masa micelial en medio de cultivo específico de *Botrytis*, a partir de ella se preparó tres inmunizaciones que se aplicaron en conejos, vía subcutánea e intramuscular. Los antisueros se titularon mediante esta técnica, observándose que antes y después de inmunizados hay la presencia de anticuerpos anti - *Botrytis*. En la técnica de ELISA – Sandwich, para la detección de *Botrytis sp* se realizaron extractos del hongo y otros patógenos. En los resultados obtenidos de las diferentes especies se pudo observar que el antisuero producido en los conejos inmunizados no sólo reconoce a esta enfermedad sino también a otros patógenos fúngicos, habiendo una

reacción cruzada. La sensibilidad y especificidad de la técnica se analizaron en el programa Win Episcopo 2.0 determinándose un 70.00% y 70.58% respectivamente.

I. INTRODUCCIÓN:

Los problemas fitosanitarios han provocado grandes pérdidas en los cultivos, estos pueden ser de origen biótico debido a que afectan a plantas y sus productos, causando que los productores sufran grandes pérdidas económicas.

Una de las enfermedades más importantes producidas por hongos y distribuida a nivel mundial es *Botrytis sp*, la cual presenta una inusual variabilidad, encontrándola en etapa Anamorfa y Telemorfa con lo que infecta a más de 200 especies vegetales distintas, el patógeno puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo y parte de la planta como en producción y post-cosecha, así como también en orquídeas sembradas comercialmente. (Infoagro, Dordrecht 2004).

Hay métodos antiguos y modernos para la identificación de *Botrytis sp* uno de los métodos modernos es la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) conocida también como Serológica “que estudia las propiedades inmunológicas de estos patógenos, a través de antisueros obtenidos en ciertos animales infectados con soluciones purificadas de tales microorganismos”, la misma que consta de varios métodos uno es ELISA – DAS (Sándwich de doble anticuerpo), la cual es

muy utilizada para realizar análisis Fitopatógenos en plantas como: virus, bacterias y hongos. (Cabezas 2004)

La técnica ELISA es importante porque se puede realizar un diagnóstico de diferentes enfermedades animales y vegetales de forma rápida y precisa ya que se caracteriza por ser sensible, específica, de fácil manejo, de bajo costo, y se puede realizar varias muestras de una sola lectura. Hoy en día la técnica de ELISA se aplica en la mayoría de laboratorios, constituyendo uno de los métodos de diagnóstico más extensamente utilizados en análisis rutinarios así como en investigación. (Cultek)

La presente investigación servirá para conocer la morfología y comportamiento fenotípico del hongo, obteniendo cultivos puros con el fin de obtener anticuerpos policlonales para la realización de la técnica de ELISA.

II. OBJETIVOS:

2.1. GENERAL:

- Desarrollar la técnica para la identificación de *Botrytis sp* en orquídeas sembradas bajo invernadero utilizando la técnica de ELISA.

2.2. ESPECÍFICOS:

- Obtener *Botrytis sp* a partir de material vegetal.
- Obtener anticuerpos para la identificación de *Botrytis sp*.
- Identificar *Botrytis sp* por la técnica de ELISA.

III. MARCO TEÓRICO:

3.1. LAS ORQUÍDEAS:

3.1.1. Generalidades:

Las orquídeas son plantas herbáceas perennes de la familia Orchidaceae, clase Liliopsida (monocotiledóneas), conforman la familia más extensa del Reino vegetal, con alrededor de 30000 especies divididas en unos 1800 géneros distribuidos por todo el mundo, a excepción de las zonas polares y los desiertos arenosos más secos (Ciencia Net; Orquídeas ibéricas s.f.)

Son las plantas más evolucionadas y especializadas, su capacidad para adaptarse es notable, pueden crecer tanto a nivel del mar como en los elevados páramos, muchas viven sobre los árboles (epífitas), otras lo hacen sobre las rocas (litófitas), otras sobre la tierra y algunas especies se desarrollan incluso en ambientes subterráneos (Ecuador Mall, 2005).

3.1.2. Morfología de las orquídeas:

3.1.2.1. Raíz:

Las raíces tienen una doble función, son las estructuras que se encargan de captar los nutrientes que la planta necesita y funcionan como elementos de fijación (Enciclopedia Libre Universal en Español, 2008).

3.1.2.2. Tallo:

Los tallos pueden tener uno o más entrenudos abultados (pseudobulbo), tienen crecimiento vertical y terminan en la inflorescencia, con haces vasculares dispersos en el seno de un tejido parenquimático rico en agua, puede ser hueco o macizo (Orquídeas ibéricas s.f., Larson 1996).

3.1.2.3. Hoja:

Las hojas con venas paralelas, ya sean gruesas y correosas o delgadas, suaves y plegadas tienen formas ovaladas o lanceoladas, varios nervios que nacen desde la base y pueden disponerse en roseta basal o a lo largo del tallo. En algunos géneros pueden tener manchas oscuras (máculas) tanto por el haz como por el envés (Orquídeas ibéricas s.f., Larson 1996).

3.1.2.4. Flor:

Las orquídeas se caracterizan por poseer flores muy vistosas, son zigomorfas (con un solo plano de simetría) y hermafroditas (ambos sexos en la misma flor), trímeras (3 sépalos y 3 pétalos) y una columna central que sustenta las estructuras reproductivas masculinas (anteras) y femeninas (pistilo) llamada ginostemo (Enciclopedia Libre Universal en Español, 2008; Orquídeas ibéricas s.f.).

3.1.2.5. Polen:

El polen se encuentra aglomerado, formando una masa llamada polinio el que tiene un extremo con un ensanchamiento glandular, pegajoso, que sirve para que el polinio se adhiera al cuerpo del insecto polinizador. El número de polinios por flor varía en los diferentes géneros de 2 a 8 (Ciencia Net s.f., Larson 1996).

3.1.2.6. Fruto:

El ovario es tricarpelar e ínfero. El fruto es seco. Se trata de un tipo especial de cápsula fisuricida. La abertura es longitudinal mediante grietas a lo largo de los carpelos (Orquídeas ibéricas s.f.).

3.1.2.7. Semilla:

Las semillas varían desde filiforme a fusiforme o mazuda, su tamaño oscila desde pocas micras hasta aproximadamente unos 5 milímetros, y su peso varía de 1 a 22 microgramos. La estructura de la semilla consta exclusivamente de una testa, con sus correspondientes polos micropilar y calazal, y un embrión, en algunos géneros se observan apéndices semejantes a alas o protuberancias, cuya función está relacionada con la dispersión (Orquídeas ibéricas s.f.)

Las enfermedades son alteraciones en la normal fisiología de una planta, producidas por la acción persistente de agentes bióticos o abióticos (Latorre 1999).

En los inicios de una enfermedad las alteraciones son mínimas y no necesariamente se traducen en modificaciones visibles, pero a medida que el proceso infectivo o patogénesis progresa, se intensifican los desórdenes fisiológicos apareciendo las primeras manifestaciones de la enfermedad, generalmente derivan en modificaciones morfológicas visibles, apenas perceptibles y la muerte de una planta. (Latorre 1999).

Según Latorre (1999). Los agentes causales de las enfermedades de las plantas corresponden a dos grandes grupos:

- **Agentes no infectivos:** generalmente corresponden a los factores ambientales altamente desfavorables para el normal desarrollo de una planta y no son transmisibles desde plantas enfermas a sanas.
- **Agentes Infectivos:** son los agentes causales bióticos (hongos, bacterias, micoplasmas, virus, viroides, nematodos, plantas parásitas, protozoos) capaces de penetrar y de establecer una directa y compleja relación parasitaria con la planta hospedera,

son agentes transmisibles desde una planta enferma a una sana, como es el caso de *Botrytis sp.*

3.2. *Botrytis sp.*

3.2.1. Clasificación Taxonómica.

Reino: Fungi
Grupo: Ascomycetes
Phylum: Ascomycota
Clase: Deuteromycetes
Orden: Moniliales
Familia: Moniliaceae
Género: *Botrytis*
Especie: sp.

3.2.2. Descripción:

Botrytis es la enfermedad más común y ampliamente distribuida, es un saprofito nato capaz de provocar grandes daños en numerosos cultivos como: hortalizas, plantas ornamentales (orquídeas), frutales, etc. Son las enfermedades más comunes de las plantas cultivadas en los invernaderos (Agrios 2002, Infoagro s.f.)

El patógeno *Botrytis sp.* produce abundante micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris. Los conidióforos y los racimos de conidios se semejan a un racimo de uvas. El hongo libera fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego éstos son diseminados por el viento. El hongo a menudo produce esclerocios irregulares, planos, duros y de color negro. Algunas especies de *Botrytis* producen a veces una fase perfecta de Sclerotinia, en la que las ascosporas se forman en un apotecio (Agrios 2002, Infoagro s.f.).

3.2.3. Síntomas:

El hongo se establece en los pétalos de la flor, los cuales son particularmente susceptibles cuando comienzan a envejecer y ahí produce micelio abundante (Agrios 2002).

El hongo ocasiona la pudrición basal del fruto (verde o maduro) la cual avanza y puede destruir una parte o todo el fruto, la epidermis se rompe y el hongo produce numerosos cuerpos fructíferos. Los tejidos entonces se arrugan y deshidratan produciendo esclerocios aplanados de color negro sobre la superficie o hundidos en el tejido. También se observa un tenue anillo de 5 a 10 mm de diámetro blanquecino sobre el fruto (Agrios 2002, Infoagro s.f.).

Botrytis produce manchas foliares en sus hospedantes, son pequeñas y amarillentas al principio, pero posteriormente se extienden, adquieren un color canela o gris blanquizco, se hunden, coalescen y a menudo cubren toda la hoja (Agrios 2002).

Las lesiones del tallo aparecen en tallos suculentos y pueden ser lesiones hundidas, alargadas y de color oscuro con un contorno bien definido, o bien pueden extenderse sobre el tallo y hacer que éste se debilite y quiebre a nivel de la zona de infección (Agrios 2002).

La infección de los órganos subterráneos de las plantas, tales como bulbos, cornos, tubérculos, raíces etc., las lesiones aparecen en la corona o en la base, los tejidos infectados son blandos y aguanosos al principio, pero conforme avanza la infección, dichas áreas se extienden, cambian de un color canela a pardo y por último adquieren un color café oscuro y se hacen esponjosas o corchosas, lo cual hace que se aligere su peso (Agrios 2002).

3.2.4. Ciclo de vida del Hongo.

Botrytis inverna en el suelo en forma de esclerocios o de micelio, el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición. Al parecer este hongo no infecta a las semillas, pero puede propagarse con las semillas contaminadas mediante esclerocios del tamaño de esas semillas o sobre restos de plantas a los que ha infectado. Las etapas de invernación también se propagan mediante cualquier cosa que mueva el suelo o los restos vegetales que pudieran portar esclerocios o micelio del hongo. Este último requiere de un clima húmedo y moderadamente frío (18 a 23°C) para que se desarrolle adecuadamente, esporule, libere y germine sus esporas y para que produzca infección (Agrios 2002).

3.2.5. Control:

- El control de las enfermedades por *Botrytis* se logra mediante la eliminación (del terreno de cultivo y de los almacenes) de restos de plantas infestados e infectados y proporcionando las condiciones para que haya una ventilación adecuada y una rápida desecación tanto de las plantas como de sus productos.
- En los invernaderos, el nivel de humedad debe reducirse mediante ventilación, calefacción.
- Es importante evitar las siembras demasiado densas en condiciones de baja luminosidad.
- Desinfección de semillas.
- La solarización es efectiva para el control de esclerocios.
- Hacer podas y deshojados a ras del tallo para no dejar tocones que sirvan al desarrollo del parásito. Aplicación de una pasta fúngica en las heridas.
- Controlar los niveles de nitrógeno en el suelo, ya que niveles elevados favorecen el desarrollo de la enfermedad.
- Aplicación de cubiertas plásticas de invernadero con absorción de luz ultravioleta ya que reducen la esporulación y la tasa de colonización epidermal (Agrios 2002).

3.2.6. Control biológico.

Se han descrito diversos hongos (*Trichoderma spp.*, *Coniothyrium spp.*, *Gliocladium sp*, *Mucor sp*, *Penicillium sp*, *Verticillium sp*), bacterias y nematodos como antagonistas de *B. cinerea*, citando a los primeros como los más importantes en los cultivos hortícolas. Para el control biológico del moho gris de las manzanas se ha descrito el hongo antagonístico *Trichoderma harzianum* (Agrios 2002).

3.3. TÉCNICAS SEROLÓGICAS (ELISA)

3.3.1. Fundamento:

La técnica ELISA (Enzyme Linked Inmunoabsorbent Assay) es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático, se caracteriza por su

elevada sensibilidad, especificidad, rapidez y economía, su gran importancia de aplicación sobre todo en Patología Animal y Vegetal, gracias a ésta técnica se pueden estudiar grandes poblaciones en un corto plazo y de manera sencilla, rutinaria y sin instalaciones costosas. (Cultek 2006, Laboratorio Geminis 2004).

El ELISA procede a la fijación de uno de los componentes de la reacción inmunológica (antígeno Ag o anticuerpo Ac) a un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario. El complejo inmunológico formado es enfrentado luego a las moléculas capaces de reconocer a su componente más superficial, marcadas con una enzima (peroxidasa de rábano picante); agregándose posteriormente un sustrato cromogénico de la enzima marcadora. La existencia de una reacción inmunológica se demuestra y se cuantifica midiendo espectrofotométricamente la cantidad de producto enzimático resultante (Laboratorios Geminis, 2004).

3.3.1.2. Antígeno:

Es toda sustancia capaz de inducir en un organismo vivo la formación de anticuerpos y de combinarse específicamente con ellos (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación s.f.).

Se pueden diferenciar dos características primordiales en un antígeno: la inmunogenicidad o capacidad que presenta una molécula para generar una respuesta inmune en un organismo dado y la antigenicidad o particularidad del antígeno que hace que éste sea reconocido por un determinado anticuerpo. Ambas propiedades pueden o no estar presentes en un determinado antígeno (Reina 2003).

A la región del antígeno reconocida por un anticuerpo se le denomina epítipo o determinante antigénico. Un antígeno puede presentar un número variable de epítipos de estructura única o repetitiva (Reina 2003).

3.3.1.3. Inmunización y preparación del antígeno

El proceso de inmunización es aquel en el que se inyecta al animal el antígeno en condiciones adecuadas de cantidad, sustancias acompañantes, y número de veces que sean necesarias para conseguir una buena respuesta inmune (Reina 2003).

Se divide en dos fases:

Inmunización primaria, en la cual se administra una determinada cantidad de antígeno en presencia de adyuvante, e inmunización de recuerdo ('booster'), en la que el antígeno es administrado en forma soluble o bien con adyuvante. Existen numerosos protocolos de inmunización, con una duración variable (Reina 2003).

La cantidad de antígeno dependerá del animal empleado. Los más comúnmente empleados son ratón, rata, conejo, cabra y gallina (Reina 2003).

3.3.1.4. Anticuerpos:

Los anticuerpos son proteínas que son producidas por el sistema inmunológico en respuesta a moléculas externas que entran en el cuerpo, estas moléculas externas son los llamados antígenos (Cultek 2006).

3.3.1.5. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales son obtenidos del suero de un animal inmunizado con un antígeno que presenta uno o varios sitios antigénicos, y consisten en una población de anticuerpos que reaccionan o reconocen más de un epítotope (Rangel 2006).

3.3.1.6. Especificidad y reacción cruzada

La relación entre un antisuero o anticuerpo determinado y el antígeno que ha dado lugar a su producción se conoce como interacción específica (Reina 2003).

Los aspectos que de manera distinta afectan la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo son diversos. Uno de ellos es el grado de pureza del antígeno utilizado en la inmunización. Además la naturaleza del antígeno juega un papel importante en las reacciones no específicas o cruzadas (Reina 2003).

Se habla de reacción cruzada o reacciones no específicas, cuando el antisuero da reacción positiva con otros antígenos, relacionados o no con el utilizado en la inmunización; o también cuando los anticuerpos policlonales obtenidos contra un antígeno purificado, eventualmente

pueden reaccionar contra componentes de la planta, debido a que restos del antígeno contaminante permanecen en el extracto purificado (Rangel 2006, Reina 2003)).

Así, aquellos más o menos semejantes, pero no idénticos, pueden ser reconocidos en mayor o menor grado como tales, en cuyo caso no se produce una reacción positiva falsa o inespecífica, sino una reacción genérica que revela relaciones genéticas entre el organismo detectado y el que sirvió como antígeno para la producción de los anticuerpos que se usan en el ensayo de ELISA (Rangel 2006).

En la naturaleza, un individuo (e.g. mamífero) puede producir más de 10 millones de anticuerpos diferentes, cada uno frente a un antígeno distinto (Rangel 2006).

En todo planteamiento experimental en el que se utilicen anticuerpos como marcadores es necesario establecer unos estrictos controles de "autenticidad" de los resultados obtenidos (Reina 2003).

En estos casos es donde más exigentes deben ser las condiciones del ensayo y los controles utilizados (Reina 2003).

3.3.2. Pasos generales de un ELISA:

- Tapizado del pocillo con el antígeno o anticuerpo.
- Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos o anticuerpos.
- Unión del antígeno o anticuerpo específico al anticuerpo o antígeno tapizado en el pocillo.
- Lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido.
- Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima.
- Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo.
- Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida.
- Adición del sustrato.
- Unión del sustrato a la enzima.
- Desarrollo del color.

3.3.3. Tipos de ensayos ELISA: Según Cultek (2006)

Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución (por ej. en el clonaje de anticuerpos monoclonales), o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo. A continuación se describen:

Anticuerpos marcados:

- ELISA Directo
- ELISA Indirecto
- ELISA Sándwich
 - Doble (DAS)
 - Heterólogo (HADAS)

Antígeno marcado:

- ELISA Competitivo

3.3.3.1. ELISA - Directo (Ensayo simple de dos capas):

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble (tapizado) de antígenos específicos. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición de anticuerpos marcados (conjugados) con una enzima; si los anticuerpos reaccionan con los antígenos, el complejo quedará solubilizado.
- Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas (sangre, orina) pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado, o bien se le ha añadido) (Cultek 2006, Laboratorio Geminis 2004).

3.3.3.2. ELISA - Indirecto.

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio.
- Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición del suero problema, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte.
- Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos.
- Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno, y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario.

3.3.3.3. ELISA – Sandwich (Anticuerpo-antígeno-anticuerpo):

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar.
- Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición de la muestra problema (extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), de tal forma que si esta presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte.
- Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.
- Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han

tapizado el soporte) conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos.

- Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo (Cultek 2006, Laboratorios Geminis c.a., 2004)

3.3.3.4. ELISA Sandwich “HADAS”

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar.
- Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición de la muestra problema (extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), de tal forma que si esta presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte.
- Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.
- Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte), los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos.
- Lavado para eliminar los anticuerpos que no hayan reaccionado.
- Adición de anticuerpos conjugados con una enzima anti-anticuerpos empleados en el paso anterior.
- Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

3.3.3.5. Método Competitivo:

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar.
- Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición en concentración conocida de una mezcla de antígenos del anticuerpo utilizado en el paso anterior, marcados con una enzima y antígenos desconocidos objeto de estudio. Paralelamente añadir únicamente antígenos del anticuerpo usado en el paso anterior, marcados con una enzima.
- Lavar para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado.
- Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado de ambas pruebas y comparar los resultados. Si las lecturas de ambas pruebas son análogas, el antígeno a estudio no tienen nada que ver con los anticuerpos empleados para tapizar el soporte. Si hay diferencia en las lecturas de ambos pocillos, el antígeno objeto de estudio, está relacionado serológicamente con el anticuerpo empleado para tapizar el soporte y la diferencia de densidad óptica, es proporcional a la concentración del antígeno problema en la muestra.

3.3.4. Factores que afectan los resultados en ELISA. Según Rangel (2006):

Algunas de las causas más comunes para la ocurrencia de señal inespecífica:

- Elevada variabilidad de absorbancia entre los pozos de una placa. Actualmente es poco frecuente debido a que cada vez se controla mejor este factor, incluso algunos fabricantes ofrecen un certificado de análisis con un coeficiente de variación estadísticamente verificable.

- Anticuerpos (policlonales) obtenidos a partir de virus purificado parcialmente que conservó antígenos de la planta y que por lo tanto también reaccionan contra antígenos de planta sana.
- Uso de una concentración elevada de reactivos (particularmente del conjugado).
- Sustrato degradado por enzimas exógenas (p.ej.: la grasa y el sudor de las manos contienen cantidades reactivas de fosfatasa alcalina que pueden degradar el sustrato y conducir a falsos positivos).
- Sustrato almacenado por tiempo prolongado y parcialmente ya degradado.
- Ejecución deficiente de la técnica (escasa destreza, adición errática de los reactivos por el uso de instrumentos no ajustados, la dilución de los reactivos está en el rango en que la reacción enzimática no es lineal, etc.)

IV. MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1. ZONA DE ESTUDIO.

La zona de estudio está ubicada en el extremo Sur del Ecuador en las Provincias de Loja y Azuay.

En la provincia de Loja, la toma de muestras se las realizó en los orquidearios de la Universidad Técnica Particular de Loja y en un invernadero particular en la Parroquia de Vilcabamba.

En la provincia del Azuay el muestreo se realizó en el orquideario de Ecuagenera ubicado en el Cantón de Gualaceo.

4.2. FASE DE CAMPO:

Para el desarrollo de la presente investigación en cada uno de los muestreos que se realizaron en los invernaderos visitados se seleccionaron hojas y flores que presentaban los síntomas de la

enfermedad *Botrytis*. En los orquidearios de Vilcabamba y de la Universidad Técnica Particular de Loja se realizaron dos muestreos, y en el orquideario de Ecuagenera tres muestreos.

4.3 FASE DE LABORATORIO.

4.3.1 Obtención de *Botrytis* a partir del material vegetal:

Se realizó medio de cultivo específico de *Botrytis* para esporulación el cual fue colocado en cajas petri y esterilizado, este medio contiene los siguientes reactivos:

- Nitrato férrico
- Ácido bórico
- Sulfato de zinc
- Extracto de malta
- Extracto de levadura
- Agar

Para el aislamiento del hongo se tomó las hojas y se cortó de 35 mm x 15 mm tomando parte sana y enferma se desinfectó, flameó y luego se cortó en trozos pequeños para colocar en cajas petri, y se incubaron a 27°C.

Para el aislamiento del hongo presente en las flores con ayuda de una aguja estéril se recolectaron las esporas colocándolas en Medio de *Botrytis* Para Esporulación, se incubaron a 20°C, luego se sacó las placas para dejarlas al ambiente y obtener esporulación.

4.3.2. Obtención de anticuerpos para la identificación de *Botrytis sp.*

Se realizó a través de la inmunización de 2 conejos mediante el aislado puro de *Botrytis sp.* A los conejos se los tomó como parte de este ensayo por la facilidad del manejo, posibilidad de obtener un volumen considerado de sangre sin necesidad de sacrificar al animal, la raza escogida es Californiana.

Posterior a la fase de inmunización se procedió a realizar la aplicación de la técnica de ELISA – Indirecto para determinar los niveles de anticuerpos anti-*Botrytis sp* en el suero de conejo.

4.3.2.1. Inmunización:

Antes de realizar las inmunizaciones a los conejos se tomó en consideración la edad de estos que oscila entre 1 a 3 años, los animales para el experimento tenían la edad de 1,4 años; el peso de 2 a 3kg (Conejo 1 2.78 Kg, Conejo 2 3.12 Kg.), temperatura y las condiciones del lugar.

4.3.2.1.1. Preparación del antígeno:

Del aislado de *Botrytis sp*, se recogió dos cajas petri con micelio (hifas y conidios), se diluyó en 400 ul de PBS, se colocó en el tanque de nitrógeno por espacio de 10, 15 y 20 minutos para luego ponerlas en agua caliente, con esto se logró la desintegración del micelio.

4.3.2.1.2. Protocolo de Inmunización:

Se aplicó dos protocolos de inmunización en los conejos, una por vía intramuscular y la otra subcutánea.

En los dos protocolos aplicados se realizó toma de muestras de sangre a los conejos antes de realizar cada una de las inmunizaciones y 14 días después de la última inmunización; se consideró además el peso y la temperatura.

Primera Inmunización: A 100 ul de antígeno (*Botrytis sp*) se adicionó 500 ul de agua bidestilada y 0,5 ml de adyuvante completo de Freund, se homogenizó con la ayuda de un vortex. El preparado obtenido se administró a través de una jeringuilla de insulina al conejo 1 por vía intramuscular.

Para el conejo 2 se realizó el mismo procedimiento a diferencia de la vía de administración que fue subcutánea.

Segunda Inmunización de los Conejos: Se siguió el mismo procedimiento de la primera inmunización, con 600 ul de agua bidestilada y el adyuvante incompleto de Freund. En el conejo 1 la vía de administración fue intramuscular y del conejo 2 la vía subcutánea. Esta inmunización se realizó 10 días posteriores a la primera inmunización.

Tercera Inmunización de los Conejos: Se siguió el mismo procedimiento de la segunda inmunización, en el conejo 1 y 2 la vía de administración fue subcutánea. Esta inmunización se realizó 10 días posteriores a la segunda inmunización.

A continuación se detalla el resumen de los protocolos de inmunización en la tabla 1.

Tabla 1. Protocolos de Inmunización:

Número Inmunizaciones	CONEJO 1			CONEJO 2		
	1	2	3	1	2	3
Vía Administración	IM	IM	SC	SC	SC	SC
Días	0	10	20	0	10	20

IM: Intramuscular **SC:** Subcutánea

4.3.2.1.3. Determinación de anticuerpos policlonales anti-*Botrytis* en suero de conejo:

Para determinar la presencia de anticuerpos policlonales anti-*Botrytis* se aplicó la técnica de ELISA – Indirecto con el siguiente protocolo:

1. **Sensibilización:** Muestra Antígeno de *Botrytis sp* stock (fecha: 21/07/08) en buffer de carbonatos pH: 9.5 (3.75 ul de antígeno en 10 ml de buffer). Tiempo: 12h. Temperatura: 4°C.
2. Lavar con 4 X con PBS – Tween: 0.3%
3. Suero problema: **Suero de conejo**
Dilución del suero **OPTIMIZADA 1:100** en PBS-BSA 1% Tween 0.3%

Cantidad/pozo: 100 ul/pozo Tiempo: 30 min.
Temperatura: 37 °C.

4. Lavar con 4 X con PBS – Tween 0.3 %.
5. Conjugado: **Anti-IgG Rabbit – HRP** (Peroxidasa) producida en cabra (Nota: Zymed No. Cat 81-6120 dilución. Recomendada 1: 5,000 a 1:20,000)
Dilución optimizada para usar **1: 10.000** en PBS – BSA 1% Tween 0.3%

Cantidad/pozo: 100 ul/pozo Tiempo: 30 min Temperatura: 37°C.

6. Lavar con 4 X con PBS – Tween: 0.3 %

7. Sustrato: **TMB**

Cantidad/pozo: 100 ul/pozo Tiempo: 15-20 min.
Temperatura: 4°C

8. Detener la reacción con H₂SO₄ 0.2M

Cantidad/pozo: 100 ul/pozo

9. Lectura a 450 nm en el Lector de ELISA.

Las soluciones para la aplicación de la técnica de ELISA-Indirecto fueron realizadas en el Laboratorio de Servicios Agropecuarios (Anexo 1).

Se analizaron las muestras del suero obtenido en diluciones de 1:100 y de 1:200, como se explica en las siguientes tablas:

Tabla 2. Dilución del suero 1:100.

PLACA DE ELISA - INDIRECTO				
	1	2	3	4
A	B	B	C1.F	C1.F
B	C1A	C1A	C2.1	C2.1
C	C2A	C2A	C2.2	C2.2
D	C1E	C1E	C2.3	C2.3
E	C2E	C2E	C2.F	C2.F
F	C1.1	C1.1	N1	N1
G	C1.2	C1.2	N2	N2
H	C1.3	C1.3	C1A	C1A

Tabla 3. Dilución del suero 1:200.

PLACA DE ELISA - INDIRECTO				
	1	2	3	4
A	B	B	C1.F	C1.F
B	C1A	C1A	C2.1	C2.1
C	C2A	C2A	C2.2	C2.2
D	C1E	C1E	C2.3	C2.3
E	C2E	C2E	C2.F	C2.F
F	C1.1	C1.1	N1	N1
G	C1.2	C1.2	N2	N2
H	C1.3	C1.3	D	D

B: Blanco

C1A: Conejo 1 antes de inmunizar o suero preinmune.

C2A: Conejo 2 antes de inmunizar o suero preinmune.

C1E: Conejo 1 seis meses antes de inmunizar

C2E: Conejo 2 seis meses antes de inmunizar.

C1.1: Conejo 1 primera inmunización.

C1.2: Conejo 1 segunda inmunización.

C1.3: Conejo 1 tercera inmunización.

Anexo 4 (fotografía)

C1.F: Conejo 1 después de 14 días de la última inmunización.

C2.1: Conejo 2 primera inmunización.

C2.2: Conejo 2 segunda inmunización.

C2.3: Conejo 2 tercera inmunización.

C2.F: Conejo 2 después de 14 días de la última inmunización.

N1: Control negativo 1.

N2: Control negativo 2.

D: Suero humano.

4.3.3. Identificación de *Botrytis sp* por la técnica de ELISA:

Para la identificación de *Botrytis sp* en orquídeas se procedió en primer lugar a obtener el extracto de plantas enfermas y sanas diagnosticadas previamente por técnicas macro y microscópicas

(Anexo 2) y posteriormente se aplicó la técnica de ELISA – Sandwich.

4.3.3.1. Extracto de plantas en estudio

Se elaboraron macerados de 44 muestras de hojas o flores enfermas y sanas. Para lo cual se siguió el siguiente procedimiento: se tomó las muestras en tamaño de 50 mm x 20 mm, se las desinfectó flameándolas para posteriormente proceder a macerarlas colocándolas en el mortero con 3000 ul de agua destilada estéril. Esta preparación se colocó en tubos de ensayos debidamente identificados, se centrifugó por el lapso de media hora y se almacenó en refrigeración el sobrenadante obtenido.

4.3.3.2. ELISA – Sandwich para la detección de antígenos.

Con los macerados obtenidos se procedió a aplicar la técnica de ELISA - Sandwich utilizándose soluciones comerciales (Anexo 3) a través del siguiente protocolo:

- 1. Sensibilización:** Muestra Anticuerpos policlonales anti - *Botrytis sp* en solución de suero 01 (1 ul de anticuerpo policlonal anti - *Botrytis sp* en 100 ul de solución 01). Tiempo: 24h. Temperatura: 25 °C.
- 2.** Lavar con 5 X con solución de lavado.
- 3. Extracto problema: **Extracto de *Botrytis sp* y otros patógenos****
Dilución del extracto optimizada **1:100** en solución 01
Cantidad/pozo: 100 ul. Tiempo: 30 min. Temperatura: 37 °C.
- 4.** Lavar con 6 X con solución de lavado.

- 5. Conjugado: Anti-IgG Rabbit - HRP** (Peroxidasa) producida en cabra (Nota: Zymed No. Cat 81-6120 dil. Recomendada 1: 5,000 a 1:20,000)
Dilución **1: 10.000** en solución 08.

Cantidad/pozo: 100 ul/pozo en toda la placa menos en la columna 1 que es blanco. Tiempo: 30 min. Temperatura: 37 °C.

- 6. Lavar con 6 X con solución de lavado.**

- 7. Sustrato: TMB**

Cantidad/pozo: 100 ul/pozo en toda la placa incluyendo los blancos. Tiempo: 15-20 min. Temperatura: ambiente.

- 8. Detener la reacción con la solución de Stop.**

Cantidad/pozo: 100 ul/pozo

- 9. Lectura a 405 nm en el Lector de ELISA.**

Se analizaron las muestras en placas sensibilizadas con el suero de conejo inmunizado en dilución 1:12000 y de los extractos en 1:1600, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 4. Placa de ELISA – Sandwich.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	A35	A46	A47	A48	A50	C1	C2	C3	A51	A52	A53
B	B	A35	A46	A47	A48	A50	C1	C2	C3	A51	A52	A53
C	B	A43	Ag	A6	L41	L82	L106	L77	L91	L81	L83	L63
D	B	A43	Ag	A6	L41	L82	L106	L77	L91	L81	L83	L63
E	B	A39	L 45	L76	L69	L61	L93	L42	L95	A34	A8	A31
F	B	A39	L45	L76	L69	L61	L93	L42	L95	A34	A8	A31
G	B	A3	A42	A30	A7	A5	A3	A2	A1	A33	A32	A32

H	B	A3	A42	A30	A7	A5	A3	A2	A1	A33	A32	A32
----------	---	----	-----	-----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----

B: Blanco	A39: Sana
A35: <i>Botrytis</i>	L45
A46: <i>Botrytis</i>	L76
A47: <i>Botrytis</i>	L69
A48: <i>Botrytis</i>	L61
A50: <i>Botrytis</i>	L93
C1: <i>Botrytis</i>	L42
C2: <i>Botrytis</i>	L95
C3: <i>Botrytis</i>	A34
A51: <i>Botrytis</i>	A8
A52: <i>Botrytis</i>	A31
A53: <i>Botrytis</i>	A3
A43: Sana	A42
Ag: <i>Botrytis</i> diluido	A30
A6: Sin identificación	A7
L41: Sin identificación	A5
L82: <i>Cladosporium</i>	A3
L106: <i>Cladosporium</i>	A2
L77: <i>Cladosporium</i>	A1

L91: Colletotrichum	A33
L81: Sin identificación	A32
L83: Colletotrichum	A32

4.3.3.3. Sensibilidad y Especificidad de la técnica.

Los resultados obtenidos en la técnica de ELISA – Sandwich se analizaron en el programa Win Episcopo 2.0 los cuales se presentan en la siguiente tabla, con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 5. Determinación de la Sensibilidad y Especificidad de la prueba.

		ENFERMOS		
		SI	NO	TOTAL
TEST	+	VP	FP	a + b
	-	FN	VN	c + d
	TOTAL	a + c	b + d	n

a = número de verdaderos positivos (VP)

b = número de falsos positivos (FP)

c = número de falsos negativos (FN)

d = número de verdaderos negativos (VN)

a + c = número de individuos realmente enfermos

b + d = número de individuos realmente no enfermos

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

5.1 Diagnóstico de las muestras obtenidas.

A partir de la observación macro y microscópicas de las lesiones presentes en las muestras, se observó la presencia de *Botrytis sp*, *Cladosporium sp*, *Colletotrichum sp*, *Phoma sp* como se resume en la siguiente tabla:

Tabla 6. Diagnóstico de las especies

Especie	Nro Individuos	Órgano analizado	Diagnóstico
<i>Pragmipedium besseae</i>	1	Hoja	Sana
<i>Gongora sp</i>	1	Hoja	Sana
<i>Stanopea sp</i>	2	Hoja	Sana
<i>Catleya maxima</i>	4	Flor	<i>Botrytis</i>
<i>Odontioda hibrida</i>	1	Flor	<i>Botrytis</i>
<i>Catleya sp</i>	3	Flor	<i>Botrytis</i>
<i>Miltoniopsis roezlii</i>	2	Flor	<i>Botrytis</i>
<i>Botrytis diluido</i>	1	Flor	<i>Botrytis</i>
<i>Epidendrum sp</i>	1	Hoja	Sin Identificar
<i>Masdevallia melanoglossa</i>	1	Hoja	Sin Identificar
<i>Oncidium pardothirsus</i>	1	Hoja	<i>Cladosporium</i>
<i>Cyrtoglossum shirley dunkelber</i>	1	Hoja	<i>Cladosporium</i>
<i>Acineta superba</i>	1	Hoja	<i>Cladosporium</i>
<i>Maxillaria fractoflexa</i>	1	Hoja	<i>Colletotrichum</i>
<i>Ada aurantiaca</i>	1	Hoja	Sin Identificar
<i>Acineta superba</i>	1	Hoja	<i>Colletotrichum</i>
<i>Lepanthes aristata</i>	1	Hoja	<i>Phoma</i>
<i>Masdevallia lilacina</i>	1	Hoja	Sin Identificar
<i>Dracula gigas</i>	1	Hoja	<i>Phoma</i>
<i>Dracula bella</i>	1	Hoja	Sin Identificar
<i>Masdevallia cucullata</i>	1	Hoja	<i>Colletotrichum</i>
<i>Acronia adeliae</i>	1	Hoja	<i>Botrytis</i>
<i>Restrepia mendozae</i>	1	Hoja	<i>Colletotrichum</i>
<i>Odontioda marie noel velano</i>	1	Hoja	Sin Identificar
<i>Gongora quinquinerius</i>	1	Hoja	Sin Identificar
<i>Gongora sp</i>	1	Hoja	Sin Identificar
<i>Pleurothallis secunda</i>	1	Hoja	<i>Botrytis</i>
<i>Dendrobium nobile</i>	2	Hoja	Sin Identificar

<i>Cryptocentrum latifolium</i>	1	Hoja	Sin Identificar
<i>Elleanthus sp</i>	1	Hoja	Sin Identificar
<i>Peristeria sp</i>	1	Hoja	Sin Identificar
<i>Stanopea sp</i>	3	Hoja	Sin Identificar
<i>Miltonia spectabilis</i>	2	Hoja	Sin Identificar

5.2 Descripción de las lesiones en los pétalos causadas por *Botrytis sp.*

Las lesiones en los pétalos de la flor causadas por *Botrytis sp.*, se mostraron como manchas circulares de color café oscuro, como también de color café claro. También si se las conserva por largo tiempo se ve la formación de esclerocios los cuales son duros y negros (Figura 1).

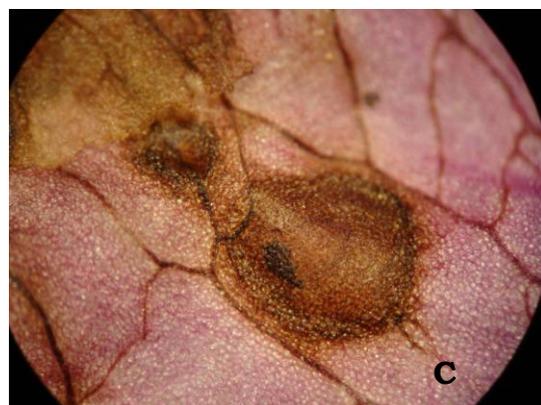
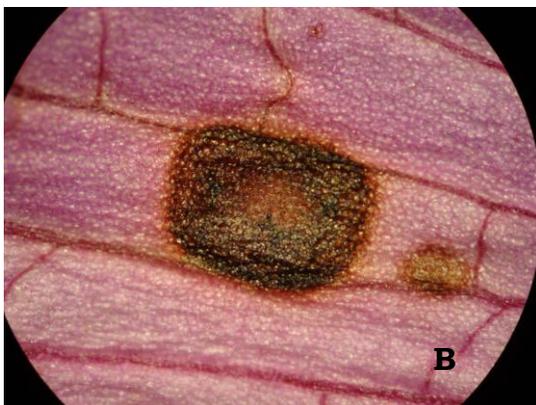


Figura 1. Lesiones en flor de *Catleya* causadas por *Botrytis sp* (A) flor con lesiones, (B, C) ampliación de las lesiones, mancha circular de color café oscuro y también de de color café claro.

5.2.1. Características macroscópicas de *Botrytis sp*.

En los cultivos de *Botrytis sp* en su fase inicial se presentaron como colonias algodonosas de color blanco que al transcurrir del tiempo cambiaron a una coloración café oscuro, en esta etapa de desarrollo se observaron la presencia de esporas (conidios), y posteriormente esclerocios. (Figura 2).

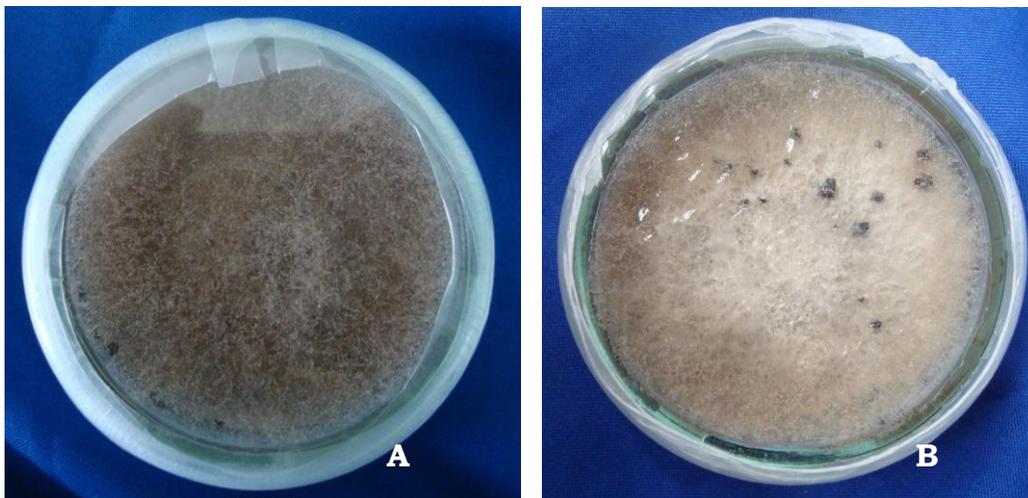


Figura 2. Morfología de la colonia de *Botrytis sp*. En (A) micelio; (B) micelio con esclerocios.

5.2.2. Características microscópicas de *Botrytis sp*.

Las características del micelio observadas fueron; hifas y conidios translucidos de color claro, redondeados y células conidiógenas. En la figura 3.

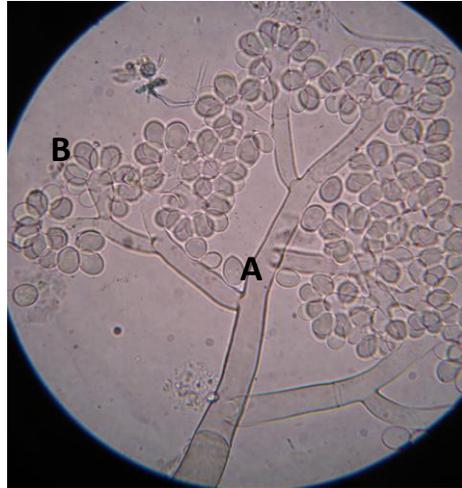


Figura 3. Morfología de micelio y conidios de *Botrytis sp.*(A) Hifa, (B) conidios.

5.3. Técnica ELISA - Indirecto

La técnica de ELISA – Indirecto realizado para la detección de anticuerpos anti – *Botrytis sp* en suero de conejo demostró la presencia de estos antes y después de las inmunizaciones, como se puede observar en los figuras 4 y 5, reacción que podría deberse a la alimentación de los conejos basada en alfalfa la misma que tiene numerosas enfermedades y que podría generar anticuerpos policlonales.

De los métodos de inmunización utilizados por vía subcutanea e intramuscular se realizaron diluciones de 1:100 y 1:200 determinando que el suero obtenido de la inmunización por vía intramuscular en dilución 1:200 es la adecuada para aplicar en la prueba de ELISA-Sandwich.

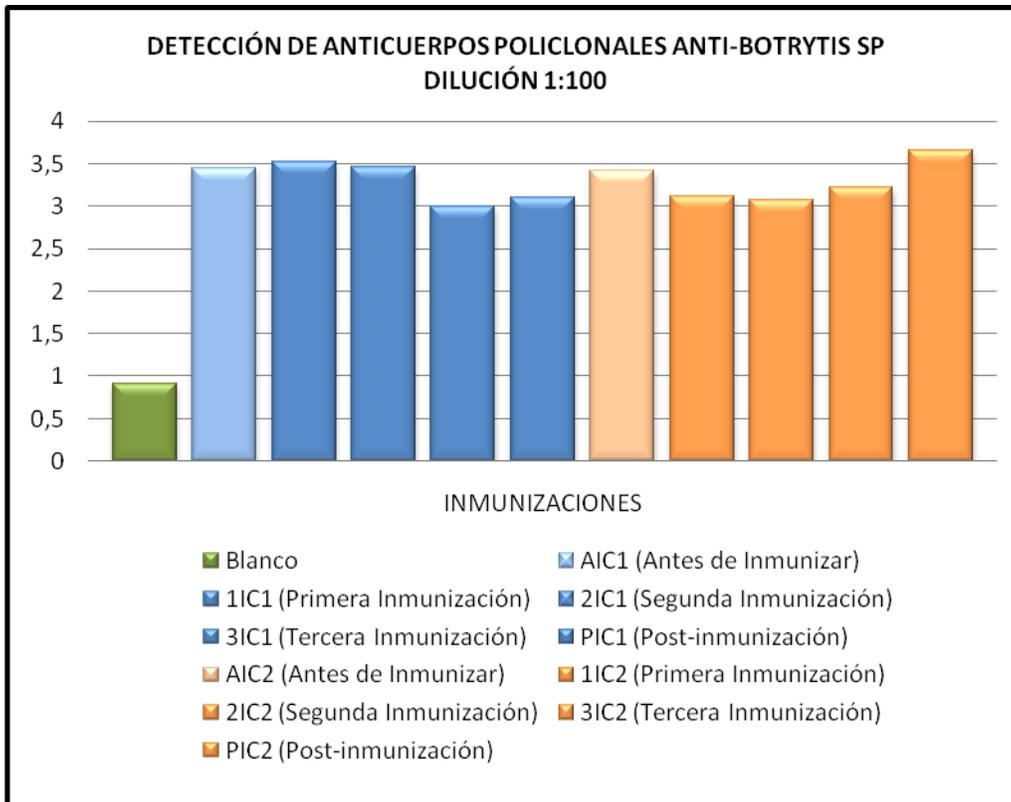


Figura 4. Método de ELISA – Indirecto para la detección de anticuerpos policlonales.

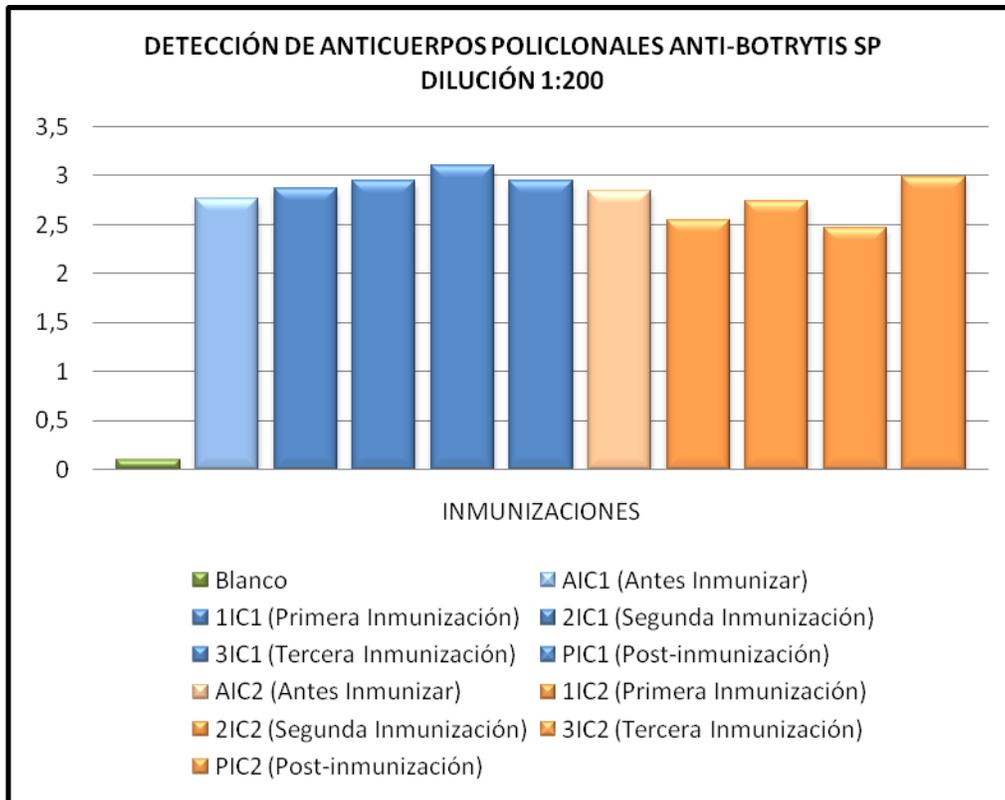


Figura 5. Método de ELISA – Indirecto.

En el conejo 1 (C1) al cual se le realizaron las inmunizaciones vía intramuscular, se observa títulos altos de anticuerpos posterior a la primera inmunización mientras que al final baja la concentración de los mismos.

En el conejo 2 (C2) inmunizado por vía subcutánea, se observó bajos títulos de anticuerpos al inicio de las inmunizaciones, manteniéndose en las semanas posteriores, a los 14 días de la última inmunización el título de anticuerpos sube. Figura 5.

Los resultados obtenidos demuestran que la técnica realizada tiene una Sensibilidad del 70.00 % y Especificidad: 70.58% como se observa en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados de la Sensibilidad y Especificidad.

The screenshot shows the 'Evaluación de Test Diagnósticos #1' window. It contains the following data:

Introduzca los DATOS:

Test	Enfermos		Total
	Si	No	
+	7	10	17
-	3	24	27
Total	10	34	44

Nivel de Confianza:

- 90 %
- 95 %
- 97.5 %
- 99 %
- 99.5 %

RESULTADOS :

	%	Lim. Inf.	Lim. Sup.
Sensibilidad	70,000	41,597	98,403
Especificidad	70,588	55,272	85,904
Prevalencia Verdadera	22,727	10,345	35,110
Prevalencia Aparente	38,636	24,249	53,024
Valor Predictivo +	41,176	17,781	64,572
Valor Predictivo -	88,889	77,035	100,000
J de Youden	0,4059	0,0832	0,7286

Buttons:

El ELISA constituye por su naturaleza una eficiente herramienta de detección inmunológica, considerada una de las metodologías más sensibles a la hora de determinar uniones antígeno - anticuerpo a muy bajas concentraciones (antígeno - anticuerpo). Para efectos de uso de la técnica, la dilución del antisuero fue de 1:12000 pudiendo determinar que

a medida que se diluyó el antisuero, las reacciones cruzadas disminuyeron y por lo tanto aumentó la especificidad del antisuero para *Botrytis sp.* Estos resultados muestran una marcada diferencia con relación a los obtenidos por (Font C.sf) para el diagnóstico de *Phytophthora infestans* en el cual se trabajó con diluciones del antisuero 1:1000.

Se comparó los resultados obtenidos en la técnica de ELISA con un Kit comercial para detección de *Botrytis cinerea* en uva, obteniéndose el siguiente resultado:

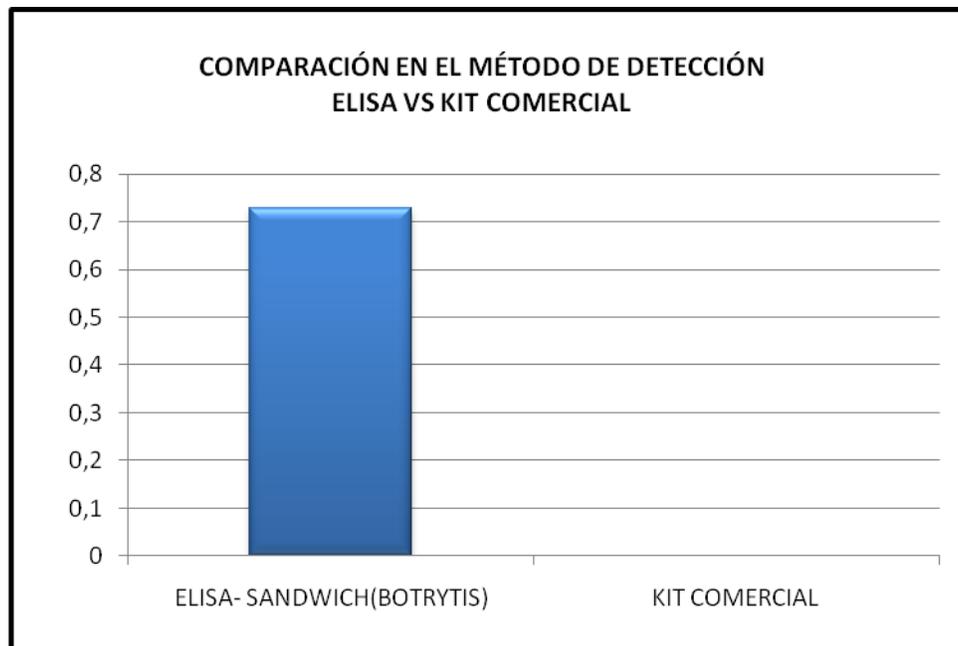


Figura 7. Comparación para la detección de *Botrytis sp* por medio de la técnica ELISA – Sandwich y el Kit Comercial Loewefast Test Kit for *Botrytis cinerea*.

Como se observa en la figura 7 los resultados obtenidos con la técnica de ELISA – Sandwich con relación al kit comercial Loewefast Test Kit for *Botrytis cinerea* fueron positivos frente a la reacción negativa del Kit comercial.

Loewefast Test Kit for *Botrytis cinerea* es una prueba inmunocromática cuya lectura positiva o negativa está determinada por el tiempo de reacción: de 1 a 2 min. positiva; 10 min sin reacción es negativa.

El resultado negativo obtenido con el Kit se podría explicar por la especificidad de la muestra requerida que en este caso es extracto de uva o condiciones inadecuadas del kit ya que el extracto utilizado es de *Botrytis sp.* el mismo que debería reaccionar con la *Botrytis cinerea* del kit.

VI CONCLUSIONES:

- La obtención de aislados puros de *Botrytis sp* se basa en medio de cultivo ricos en extractos de levaduras con una temperatura de 20 °C.
- El medio PDA (Potatoe Dextrosa Agar) no es apto para el desarrollo y aislamiento de *Botrytis sp.*
- Temperaturas superiores a 20° C. retardan el crecimiento del hongo.
- Se comprobó la presencia de anticuerpos policlonales en los sueros de los conejos antes y después de la inmunización.
- La cantidad de impurezas en el extracto provoca reacciones cruzadas en las técnicas de ELISA.
- Las inmunizaciones por vía subcutánea e intramuscular no causaron reacciones adversas en los animales de experimentación.
- No se encontró una diferencia significativa en la detección de antígenos para *Botrytis sp*, con la técnica de ELISA – Sandwich como lo demuestra la sensibilidad y especificidad de la prueba, 70 y 70.58% respectivamente.

- La técnica de ELISA en plantas para el diagnóstico de enfermedades producidas por hongos es útil en el análisis de muestras numerosas por su rapidez y costo.

VII. RECOMENDACIONES:

- Para realizar trabajos de inmunización es recomendable que se trabaje con animales pequeños y criados bajo condiciones adecuadas de alimentación y manejo.
- Para la realización de pruebas inmunológicas es necesario contar con el equipo adecuado que nos permitirá disminuir el margen de error en los resultados de las técnicas aplicadas.
- Estandarizar un protocolo de purificación de los anticuerpos que se ajuste a la infraestructura y equipamiento del laboratorio en el cual se ejecutan las pruebas.
- Estandarizar un protocolo de purificación de extractos para evitar fenómenos de prozona.
- Identificar el género de los hongos encontrados en las muestras que dieron reacción positiva a *Botrytis sp.*
- Continuar con el estudio de pruebas de diagnóstico de enfermedades producidas por hongos en base a inmunoensayos ligados a enzimas. (ELISA).

VIII. BIBLIOGRAFÍA:

- Agrios, G.N. 2002. Fitopatología. Segunda Edición. México, D.F. Editorial Limusa. 419, 420, 422 p.
- Dordrecht. 2004. Botrytis: Biology, Pathology and Control. Editorial Kluwer Academic Publishers. Boston/London. 29 p.
- Larson, R. 1996. Introducción a la Floricultura. Segunda Edición. México. Editorial A.G.T. 550p.
- Latorre, B. 1999. Enfermedades de las Plantas Cultivadas. Quinta Edición. México. Editorial Grupo Alfaomega S.A. 19, 20 p.
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. (s.f.). Manual de Laboratorio Diagnóstico de Hongos, Bacterias y Nematodos Fitopatógenos. Editorial Paseo de la Infanta Isabel. Madrid. 314 p.
- Cabezas, O. 2004. Curso Taller Diagnóstico y Evaluación de Plagas. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). Universidad

Nacional Agraria de la Selva. Facultad de Agronomía. Perú. Consultado 12 de diciembre del 2008. Disponible en http://www.senasa.gob.pe/servicios/intranet/capacitacion/cursos/curso_tingo_maria/diagnostico_evaluacion_plagas_0.pdf.

- Ciencia Net. Orquídeas. (s.f.). Ubi Dubium, Ibi Libertas. Consultado 04 de septiembre del 2008. Disponible en <http://www.ciencia.net/VerArticulo/Orquídeas?idArticulo=dsfjuol71gibrief7uzc1lp>.
- Cultek. 2006. Anticuerpos. Consultado 12 de diciembre del 2008. Disponible en http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_anticuerpos&opc=introduccion
- Cultek. 2006. Fundamentos y Tipos de ELISAs. Protocolo y Técnicas. Consultado 10 de febrero 2008. Disponible en <http://www.cultek.com/link/link.asp?link=/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-Protocolos.pdf>
- Enciclopedia Libre Universal en Español. 2008. Orquídea. Consultado 04 de septiembre del 2008. Disponible en <http://www.file:///C:/Users/HP/Desktop/Angeles/Orquideas/Orqu%C3%ADdea.htm>.
- Ecuador Mall. 2005. Generalidades. Consultado 04 de septiembre del 2008. Disponible en <http://www.file:///C:/Users/HP/Desktop/Orquideas/021005-generalidades.php.htm>.
- Font, C. (s.f.). Detección de *Phytophthora infestans* mediante la técnica ELISA. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de la Habana. CP 11600. Consultado el 10 de septiembre del 2008. Disponible en <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1031/cuf0002s.pdf>
- Infoagro. (s.f.). Técnicas para el Control de *Botrytis*. Consultado 20 de septiembre del 2008. Disponible en <http://www.infoagro.com/abonos/botrytis.htm>

- Laboratorio Geminis C.A. 2004. La Técnica ELISA. Consultado 20 de septiembre del 2008. Disponible en http://www.labgeminis.com/publicidad/la_tecnica_elisa.htm
- Orquídeas ibéricas, (s.f.). Características Generales. Consultado 04 de septiembre del 2008. Disponible en <http://www.orquideasibericas.info/caracteristicas.htm>.
- Rangel, E.; Schmidt, A. y Centeno, F. 2006. Implementación de la Técnica de ELISA para la detección de virus y otros patógenos en plantas en Venezuela. INIA – CENIAP. Unidad de Protección Vegetal. Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela. Consultado 10 de febrero del 2008. Disponible en http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy3/articulos/n10/arti/rangel_e/arti/rangel_e.htm.
- Reina, M. 2003. Tema 1: Anticuerpos y su Producción. Conceptos de Inmunocitoquímica. Consultado 20 de febrero del 2008. Disponible en <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/anticuerpos.htm#Anticuerpos>.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Soluciones de ELISA - Indirecto para la detección de anticuerpos policlonales.

- **PBS:**

- Cloruro de Sodio (NaCl) – 10.11 gr
- Cloruro de Potasio (KCl) – 0.362 gr
- Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4) – 0.362 gr
- Fosfato de Sodio dibásico (Na_2HPO_4) – 1.499 gr

Disolver todo para un litro de agua destilada estéril y medir el pH (7.3), (bajar Acido Clorhídrico, subir Hidróxido de Sodio).

- **BUFFER DE CARBONATOS (0.2 Molar):**

- Disolver:
 - Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) – 1.68 gr/100 ml agua
 - Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3) – 2.12 gr/100 ml agua
- Mezclar:
 - 60 ml de NaHCO_3
 - 40 ml de Na_2CO_3
- Revisar:
 - pH 9.5 a 9.6

- **PBS – TWEEN 0.3%**

- 900 ml Agua destilada
- 100 ml PBS
- 3 ml Tween

- **PBS – BSA 1%**

- 400 ml Agua destilada
- 50 ml PBS
- 1.5 ml PBS – Tween
- 5 gr Albúmina Bovina

- **SOLUCIÓN STOP (0.2 M):**

- Ácido Sulfúrico (H_2SO_4)

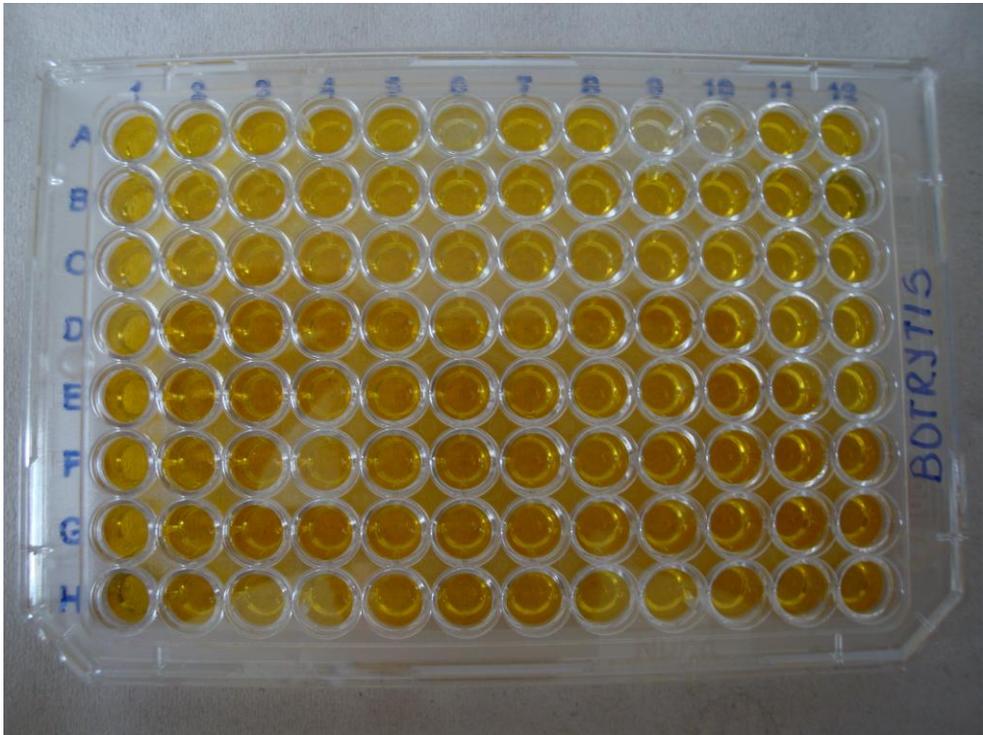
Anexo 2: Técnicas Macro y Microscópicas

MACROSCÓPICAS	MICROSCÓPICAS
Observación directa en el estéreo microscopio	Identificación en el microscopio
Cortes Histológicos	
Medios de cultivo	

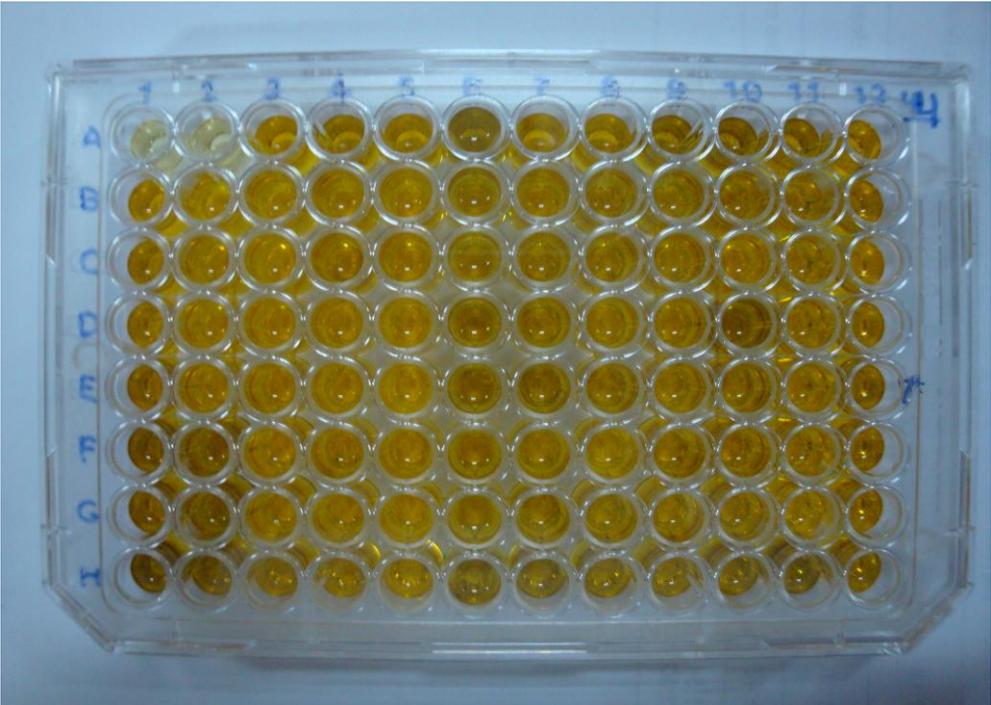
Anexo 3. Soluciones de ELISA - Sandwich para la detección de antígenos fueron comerciales como:

- Solución de suero 01
- Solución de lavado (40 ml de solución en 960 ml de agua destilada)
- Solución de conjugado 08
- Sustrato o TMB
- Solución de Stop

Anexo 4. Placa de ELISA – Indirecto



Anexo 5. Placa de ELISA – Sandwich.



Anexo 6. Materiales para la inmunización a los conejos.



Anexo 7. Materiales para preparar los macerados.



Anexo 8. Cuadro de resultados de ELISA – Sandwich, leídos a 405 nm en el Lector de ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,053	0,739	0,803	0,796	0,777	0,739	0,761	0,727	0,753	0,714	0,714	0,755
B	0,052	0,694	0,747	0,718	0,699	0,672	0,695	0,67	0,708	0,732	0,715	0,709
C	0,051	0,703	0,745	0,707	0,697	0,651	0,669	0,677	0,707	0,691	0,635	0,677
D	0,064	0,693	0,714	0,694	0,652	0,64	0,696	0,645	0,697	0,638	0,601	0,696
E	0,049	0,726	0,754	0,725	0,712	0,644	0,664	0,674	0,704	0,723	0,558	0,74
F	0,056	0,694	0,753	0,712	0,726	0,66	0,668	0,661	0,722	0,681	0,585	0,695
G	0,05	0,67	0,729	0,721	0,744	0,672	0,699	0,619	0,722	0,722	0,488	0,703
H	0,057	0,744	0,805	0,796	0,79	0,682	0,69	0,548	0,774	0,781	0,721	0,737