



Revista Mexicana de Fitopatología

ISSN: 0185-3309

mrlegarreta@prodigy.net.mx

Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.

México

Labrín, Natalia; Rangel, Ezequiel; Schmidt, Alexandra; Centeno, Fernando; Campos, Arístides
Virus del mosaico del Cymbidium y de la mancha anillada del Odontoglossum identificado en un
híbrido de Cattleya proveniente del municipio Revenga, Estado Aragua, Venezuela
Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 23, núm. 1, enero-junio, 2005, pp. 57-61
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.
Texcoco, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61223108>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Virus del Mosaico del *Cymbidium* y de la Mancha Anillada del *Odontoglossum* Identificado en un Híbrido de *Cattleya* proveniente del Municipio Revenga, Estado Aragua, Venezuela

Natalia Labrín, Ezequiel Rangel, Alexandra Schmidt, Fernando Centeno, Centro Nacional de Investigaciones Agrícolas, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Laboratorio de Virología Vegetal, Apdo. Postal 4653, Maracay 2101-Aragua, Venezuela; y Arístides Campos, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Estación Experimental Montalbán, Apdo. Postal 4379, Estado Carabobo, Venezuela CP 2101. Correspondencia: erangel@inia.gov.ve

(Recibido: Noviembre 19, 2004 Aceptado: Febrero 8, 2005)

Labrín, N., Rangel, E., Schmidt, A., Centeno, F. y Campos, A. 2005. Virus del mosaico del cymbidium y de la mancha anillada del odontoglossum identificado en un híbrido de *Cattleya* proveniente del Municipio Revenga, estado Aragua, Venezuela. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:57-61.

Resumen. Las orquídeas constantemente son infectadas con agentes patogénicos que desmejoran su atractivo y calidad. Más de 50 virus han sido identificados en estas especies, de los cuales el Tobamovirus *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) y el Potexvirus *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) son los de mayor prevalencia e importancia económica en el mundo. En el laboratorio de virología vegetal del INIA-CENIAP, Maracay, se recibió un híbrido de *Cattleya* proveniente del Municipio Revenga, estado Aragua, Venezuela, con síntomas virales aparentes, consistentes en anillos cloróticos a necróticos y estriado color negruzco en la superficie foliar. Como objetivo principal se planteó la identificación del agente causal de la sintomatología, usando plantas indicadoras, observación de inclusiones virales en el microscopio compuesto, observación de partículas virales en el microscopio electrónico de transmisión y serología. Mediante microscopía y ELISA, usando anticuerpos para ORSV y CymMV, se evidenció la presencia de una infección mixta ocasionada por ambos virus. Plantas indicadoras diferenciales permitieron aislar el CymMV del ORSV, el primero causó lesiones locales necróticas (LLn) en *Cassia occidentalis* mientras que el segundo produjo LLn en *Beta vulgaris* 'cicla'. Los resultados obtenidos fueron consistentes y coincidieron con lo señalado en la literatura mundial.

Palabras clave adicionales: *Cattleya*, ORSV, CymMV, ELISA, MESE, inclusiones.

Abstract. Orchids are constantly infected with pathogenic agents that decrease their attractiveness and quality. More than 50 virus have been identified on these species, from which the Tobamovirus *Odontoglossum ringspot virus*

(ORSV) and the Potexvirus *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) are the of most prevalent and economically important in the world. A *Cattleya* hybrid from the Revenga provinces, Aragua state, Venezuela, was received in the INIA-CENIAP laboratory of plant virology in Maracay, with apparent viral symptoms: chlorotic to necrotic ringspots and dark streaks on the foliage. The main objective was to identify the causal agent of the symptomatology, by the use of indicator plants, observation of viral inclusions by light microscopy, observation of viral particles by the transmission electron microscope and serology. Through microscopy and ELISA, using antibodies for ORSV and CymMV, the presence of a mixed infection caused by both viruses was diagnosed. Differential indicator plants allowed the isolation of CymMV from ORSV; the first caused necrotic local lesions (LLn) on *Cassia occidentalis*, while the second produced LLn on *Beta vulgaris* 'cicla'. The results obtained were consistent and coincide with those indicated in the literature.

Additional keywords: *Cattleya*, ORSV, CymMV, ELISA, MESE, inclusions.

La familia de las Orchidaceae representa una de las de mayor diversidad genética en el mundo, con 900 géneros y 25,000 especies aproximadamente, además de un gran número de híbridos. Su importancia económica está justificada, entre otras razones, por la gran demanda de sus flores; los géneros de mayor importancia son: *Cattleya*, *Arachnis*, *Aranda*, *Asocentrum*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Laelia*, *Oncidium*, *Paphiopedilum*, *Phalaenopsis*, *Renanthera* y *Vanda* (Eun y Wong, 1999). La orquídea *Cattleya mossiae* Hooker es la flor nacional de Venezuela, aspecto que unido a su belleza, le confiere un gran valor simbólico. En 1995 las importaciones de orquídeas en el mundo alcanzaron 55.8 millones de Francos Suizos, que representa 9.5% del total de las importaciones de flores (International Labour Organization, 2000). Actualmente, en Venezuela no se consiguen datos

actualizados acerca de la producción, importación o exportación de este rubro, pero en 1980 la importación de plantas vivas y en productos de floricultura fue de 1,541,506 kg, con una inversión de 1,140,329.00 dólares (García, 1985). Además, de su importancia económica, este es un mercado que genera fuentes de empleo directos e indirectos, debido a que requieren mano de obra constante para las labores inherentes al mantenimiento del cultivo y la continua necesidad de insumos (Moreira *et al.*, 1999). Más de 50 virus han sido identificados afectando a estas especies y sus híbridos (Ajjikuttira *et al.*, 2002), siendo el CymMV (*Cymbidium mosaic virus*) y el ORSV (*Odontoglossum ringspot virus*) los más importantes desde el punto de vista económico y de prevalencia en el mundo (Eun y Wong, 1999). Entre los síntomas característicos inducidos en orquídeas se encuentran necrosis floral y foliar, manchas o mosaico, estriado cloróticos y/o necróticos, desuniformidad del color en flores y/o estriado de color marrón en sépalos y pétalos (Wisler, 1989). Además, estas infecciones impiden el libre tránsito de orquídeas en el mundo, por no cumplir con las especificaciones de los programas de certificación sanitaria (Moreira *et al.*, 1999). Tanto CymMV como ORSV sólo son transmitidos por inoculación mecánica mediante la manipulación y propagación a partir de material infectado, el uso de herramientas, potes y estacas contaminadas (Eun y Wong, 1999). Ambos son de distribución mundial y únicamente han sido reportados en colecciones (Elliot *et al.*, 1996). La ausencia de síntomas no es indicativo de que las plantas estén libres de virus, ya que éstas pueden ser asintomáticas, por lo tanto se requiere de más de una técnica para identificarlos (Zettler *et al.*, 1990). En Venezuela, García (1985), detectó la presencia del CymMV en plantas de *Cattleya warscewiczii* Reichenbach f. usando plantas indicadoras y propiedades físicas del jugo infectivo. A pesar de que se sospecha la presencia de otros virus afectando estas especies en el país, no se han realizado estudios más detallados de su identificación. El objetivo principal de esta investigación, fue la identificación del agente causal de los síntomas aparentemente virales, consistentes en mosaico suave, anillos cloróticos y en algunos casos necróticos con estriado de color negruzco en la superficie foliar; presentes un híbrido de *C. warscewiczii* proveniente de una empresa privada ubicada en Tasajeras, municipio Revenga, estado Aragua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Siembra y mantenimiento de plantas indicadoras. Para el establecimiento de los semilleros de las plantas indicadoras se utilizaron potes de 1.3 L, con sustrato estéril canadiense y arena (2:1). El sustrato fue regado con una solución de fertilizante 15-15-15 al 0.5%. El trasplante se realizó cuando las plantas tenían aproximadamente dos hojas verdaderas y se mantuvieron en un cuarto a prueba de insectos, en condiciones controladas de temperatura y luz (25°C y 14 h/día). Debido a la similitud de los síntomas observados con los descritos para ORSV y CymMV, se utilizaron las plantas

indicadoras *Chenopodium quinoa* Wild, *Chenopodium amaranticolor* Coste y Reyn, *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana tabacum* L., ('Burley' y 'Virginia'), *Nicotiana glutinosa* L., *Cassia occidentalis* L., *Datura stramonium* L., *Beta vulgaris* L. ('cicla' y 'crassa'), *Phaseolus vulgaris* L., y *Lycopersicon esculentum* Mill. Algunas de estas plantas son hospederas diferenciales, por lo que se usaron posteriormente para aislar biológicamente los virus presentes en las muestras.

Inoculación mecánica. El jugo infectivo se obtuvo del tejido enfermo, al macerar con mazo y mortero fríos y estériles, con tampón fosfato 0.05 M a pH 7.0, en la proporción 1:5 (p:v). El extracto se filtró con gasa estéril y se aplicó con el dedo impregnado sobre las plantas indicadoras, previamente espolvoreadas con Carborundum 600 mesh. Posteriormente, se mantuvieron en un cuarto a prueba de insectos en condiciones controladas de temperatura y luz (25°C y 14 h/día). Se inocularon tres repeticiones (plantas) por cada planta indicadora. En la inoculación se incluyeron testigos negativos.

Observación de inclusiones virales en el microscopio compuesto. Se tomó tejido epidérmico de plantas sanas e infectadas, las que se procesaron según el protocolo descrito por Christie y Edwarson (1994). Las muestras se observaron a 100X, en un microscopio Leica, modelo DMLS.

Microscopia electrónica serológicamente específica (MESE). Rejillas cubiertas con colodión y carbón evaporado, se sensibilizaron por 30 min con anticuerpos para CymMV y ORSV (Agdia Inc.) por separado en un tampón Tris 0.05 M pH 8.0, en la proporción 1:200. Éstas se lavaron ligeramente con una gota de tampón Tris 0.05 M pH 8.0. Luego, se colocaron sobre una gota del antígeno, por 30 min, la que se obtuvo al macerar tejido infectado con Tris 0.05 M pH 8.0 en proporción 1:2 (p:v). Se enjuagaron con lavados seriados de Tris 0.05 M pH 8.0 y agua destilada y se colocaron sobre una gota de acetato de uranilo al 2% en tampón fosfato 0.05 M pH. 7, por 2 min. El excedente de tinción se retiró mojando la rejilla 15 a 20 veces en etanol 95% (Ronald Brlansky, comunicación personal). Finalmente, se secaron al aire y se realizaron las observaciones a 15000X, en un microscopio electrónico de transmisión (MET), marca Hitachi, modelo H300. Las dimensiones de las partículas observadas son el resultado del promedio de más de 30 partículas.

Inmunoensayos enzimáticos (ELISA). Se utilizaron estuches comerciales (Agdia Inc.), específicos para CymMV y para ORSV, diseñados para inmunoensayos directos con doble capa de anticuerpos policlonales. En ambos casos, el anticuerpo de detección es conjugado con fosfatasa alcalina. Para su aplicación se siguieron las recomendaciones efectuadas por el fabricante. En la prueba se incluyeron testigos negativos (sólo tampón de extracción), sanos (suministrados con el estuche), sanos internos (tejido sano del laboratorio), y testigos positivos (suministrados con el estuche). Las lecturas se realizaron con un lector automático de placas Multiskan EX, Labssystem, usando una longitud de onda de 405 nm, para medir absorbancia. Como referencia del punto de corte se utilizó el doble del valor del promedio

de absorbancia del control sano.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inoculación mecánica. Las plantas indicadoras inoculadas con extractos de la planta problema mostraron los síntomas

Cuadro 1. Reacción de plantas indicadoras inoculadas mecánicamente con extractos provenientes de un híbrido de *Cattleya warscewiczii* de Aragua, Venezuela, para diferenciar el virus de la mancha anillada del odontoglossum y el del mosaico del cymbidium.

Plantas indicadoras	Resultados ^z
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LLc
<i>Chenopodium quinoa</i>	LLc - LLn 5 ddi
<i>Cassia occidentalis</i>	LLn 5 ddi
<i>Beta vulgaris</i> 'cicla'	LLc - LLn 6 ddi
<i>Beta vulgaris</i> 'crassa'	LLn 6 ddi
<i>Gomphrena globosa</i>	LLn 8 ddi
<i>Datura stramonium</i>	Asintomático
<i>Nicotiana tabacum</i> 'virginia'	Negativo
<i>Nicotiana tabacum</i> 'burley'	Negativo
<i>Nicotiana glutinosa</i>	Negativo
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Negativo
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Negativo

^zLLc = Lesiones locales cloróticas; LLn = Lesiones locales necróticas; ddi = Días después de la inoculación.

que se describen en el Cuadro 1. Sólo se observaron lesiones locales en las plantas indicadoras *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *B. vulgaris* cv. 'cicla' y 'crassa' (Fig. 1A), *G. globosa* y *C. occidentalis* (Fig. 1B). La literatura señala a *C. occidentalis* como indicadora para CymMV (Vejaratpimol et al., 1999); mientras que para ORSV, son *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *G. globosa* y *B. vulgaris* cv. 'cicla' (Description of plant virus, 2004; Wisler, 1989).

Observación de inclusiones virales en el microscopio compuesto. Las muestras procesadas a partir de tejido de la

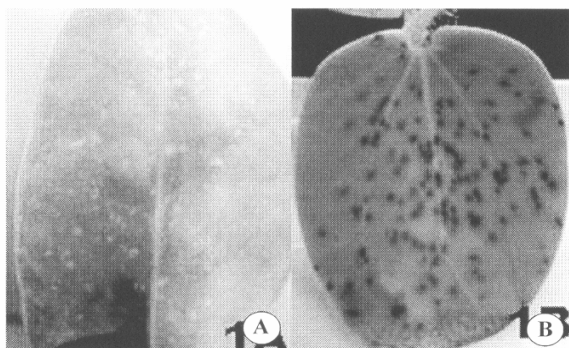


Fig. 1. A) Lesiones locales necróticas en *Beta vulgaris* 'cicla' 6 días después de la inoculación (ddi). B) Lesiones locales necróticas en *Cassia occidentalis* 5 ddi.

planta problema, presentaron inclusiones en forma de cristales rectangulares (Fig. 2A) y de cuerpos bandeado (Fig. 2B); mientras que en el tejido sano no se encontró ningún tipo de inclusión. La literatura señala que el genero Potexvirus produce inclusiones en bandas, provocadas por agregados de viriones, mientras que para el género Tobamovirus, las inclusiones típicas son los cristales, hexagonales o rectangulares. Ambos tipos de inclusiones han sido observadas en CymMV y ORSV (Christie y Edwardson, 1994). Todo ello ratifica la infección de la muestra problema con virus de los géneros mencionados.

MESE. En rejillas sensibilizadas para ORSV, se observaron partículas rígidas de, aproximadamente, 304 nm de largo y 18 nm de ancho (Fig. 3A), mientras que partículas flexibles de aproximadamente 485 nm de largo y 13 nm de ancho (Fig. 3B) se observaron en rejillas sensibilizadas con anticuerpo para CymMV. Diversos trabajos indican que las partículas

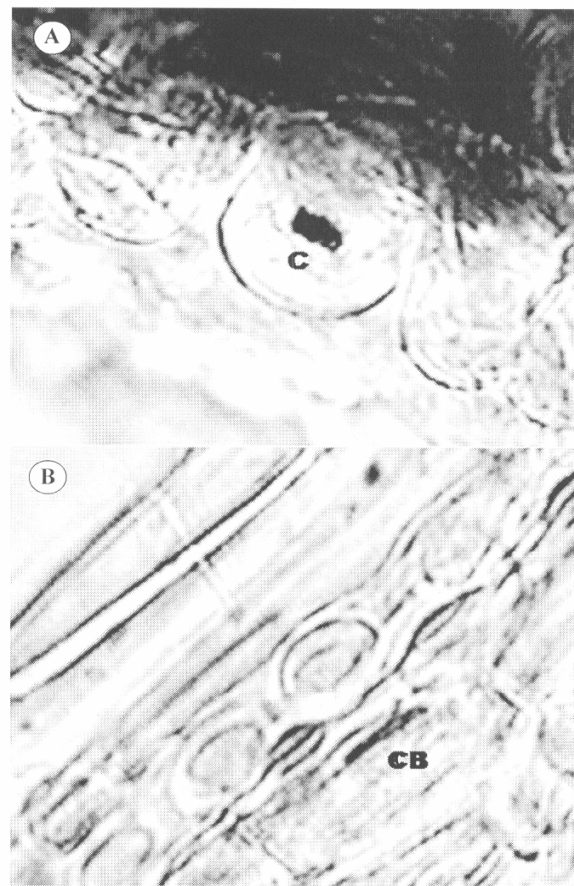


Fig. 2. A) Cristal rectangular (C) en células de la epidermis de orquídea (*Cattleya mossiae*). B) Cuerpo bandeado (CB) observado en células de la epidermis de orquídea. Ambas teñidas con Azure A (100X).

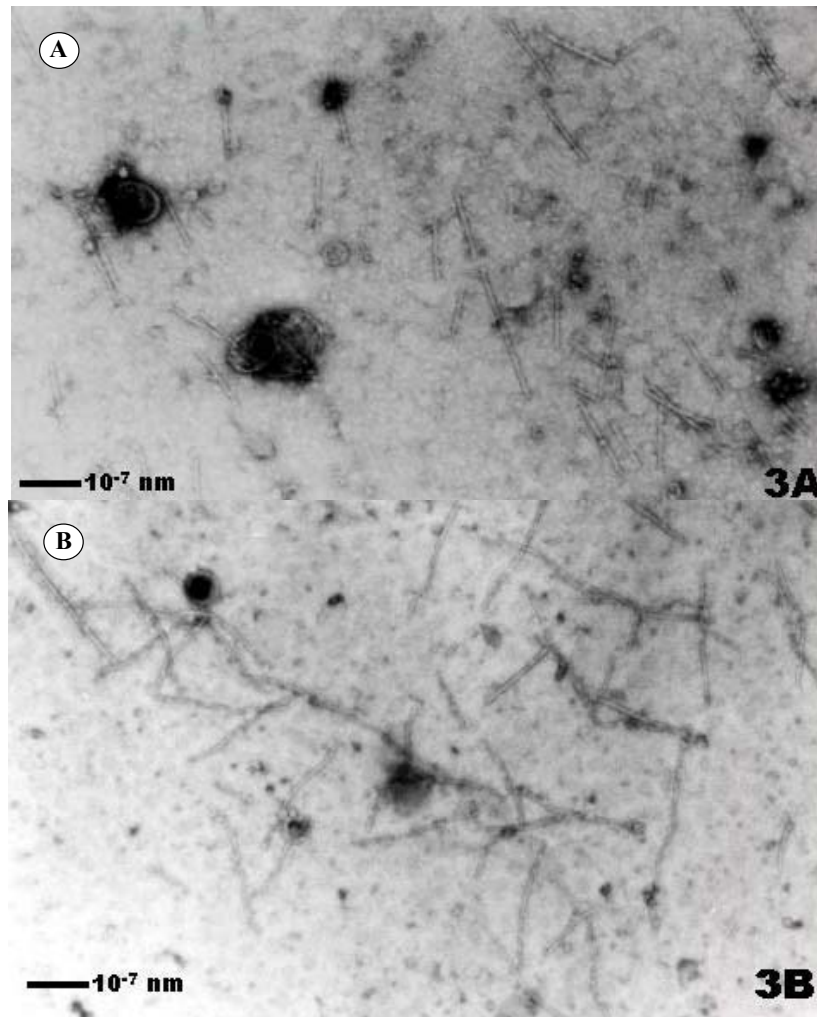


Fig. 3. A) Partículas tubulares rígidas observadas en rejillas sensibilizadas con anticuerpo para el virus de la mancha anillada del odontoglossum (ORSV) (15000X). B) Partículas tubulares flexibles observadas en rejillas sensibilizadas con anticuerpo para el Potexvirus del mosaico del cymbidium (CymMV) (15.000X).

virales de CymMV son tubulares flexibles, de aproximadamente 475-490 nm de largo y 13 nm de ancho, monoparticuladas (Vejaratpimol *et al.*, 1999), mientras que ORSV posee partículas tubulares rígidas de dimensiones cercanas a los 300 nm de largo y 18 nm de ancho, monoparticuladas con un canal axial (Description of plant virus, 2004). Las dimensiones de las partículas observadas al MET en la muestra problema, son consistentes con lo citado por la literatura para la infección con CymMV y ORSV.

ELISA. Los valores obtenidos en esta prueba indicaron la presencia de CymMV y ORSV en las muestras problemas, así como en extractos de *D. stramonium* y *B. vulgaris* cv. 'cicla', que han sido señaladas como plantas indicadoras diferenciales para los virus antes mencionados (Cuadro 2). La prueba aplicada también detectó una infección mixta en el 4to pase de *C. quinoa*, lo que ratifica la importancia del

uso de plantas indicadoras diferenciales para el aislamiento de los virus. Tomando en cuenta que este método ha sido adaptado para diagnosticar CymMV y ORSV con un 95% de seguridad (Wisler, 1989), aunado al hecho de que en ambos virus se ha demostrado bajos niveles de variabilidad genética (Ajjikuttira *et al.*, 2002), se considera que el método es altamente confiable para el diagnóstico rápido de ambos virus.

CONCLUSIONES

Basados en los resultados de las plantas indicadoras diferenciales (*C. occidentalis* para CymMV y *B. vulgaris* cv. cicla para ORSV), la observación de inclusiones virales típicas de CymMV y ORSV, la observación de partículas virales típicas de los virus antes mencionados y los resultados de las pruebas de ELISA, se concluye que los síntomas observados en las plantas de orquídea provenientes del estado Aragón,

Cuadro 2. Reacciones obtenidas en la prueba de ELISA para la detección de el virus de la mancha anillada del odontoglossum (ORSV) y el del mosaico del cymbidium (CymMV), tomando como punto de corte el doble del valor promedio de absorbancia del testigo negativo.

Muestra	Absorbancia ORSV	Pto. de corte (ORSV)**	Condición (ORSV)	Absorbancia Cym(MV)	Pto. de corte (CymMV)**	Condición CymMV
Blanco	0.097		-	0.097		-
Blanco	0.100		-	0.100		-
Testigo sano	0.0985	0.197	-	0.0995	0.199	-
Testigo positivo	0.317		+	2.978		+
1a Orquídea enferma de empresa privada	0.371		+	3.001		+
2a Orquídea enferma de empresa privada	0.363		+	0.106		-
3a Orquídea enferma de empresa privada	0.282		+	0.11		-
Orquídea sana de empresa privada	0.106		-	0.109		-
Orquídea sana de empresa privada	0.101		-	0.107		-
Orquídea sana de empresa privada	0.098		-	0.105		-
Orquídea sana de empresa privada	0.098		-	0.101		-
Orquídea sana de empresa privada	0.103		-	0.111		-
<i>Beta vulgaris</i> 'cicla' 4to pase	0.342		+	0.109		-
<i>Cassia occidentalis</i> 3er pase	0.100		-	0.107		-
<i>Datura stramonium</i> inoculada con 2do pase de <i>C. occidentalis</i> .	0.105		-	2.259		+
<i>Chenopodium quinoa</i> 4to pase	0.369		+	2.888		+
<i>Nicotiana tabacum</i> 'burley'	0.120		-	0.109		-
<i>Nicotiana tabacum</i> 'virginia'	0.097		-	0.109		-

fueron producidos por una infección mixta de ORSV y CymMV. Este es el segundo reporte en el país de CymMV, ya que García en el año 1985, diagnosticó plantas de orquídea afectadas por éste, solo usando plantas indicadoras y propiedades físicas del jugo infectivo. Para el caso de ORSV, este sería el primer señalamiento de este virus afectando orquídeas en Venezuela.

Agradecimientos. Al Dr. Ronald H. Brlansky, Profesor del Departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Florida, por la ayuda técnica y económica aportada.

LITERATURA CITADA

Ajjikuttira, P.A., Lim, C.L., Won, M.H., Ryu, K.H., Chang, C.A., Loh, C.S., and Wong, S.M. 2002. Genetic variability in the coat protein genes of two orchid viruses: Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus. Archives of Virology 147:1943-1954.

Christie, R.G., and Edwardson, J.R. 1994. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Experiment stations monograph series. University of Florida. Gainesville, Florida, USA. 165 p.

Description of Plant Viruses. 2004. Odontoglossum ringspot virus. <http://www.dpvweb.net/dpv>. Consulta diciembre 15, 2004.

Elliot, M.S., Zettler, F.W., Zimmerman, M.T., Barnett, O.W., and Legrande, M.D. 1996. Problems with interpretation of serological assays in a virus survey of orchid species from Puerto Rico, Ecuador, and Florida. Plant Disease 80:1160-1164.

Eun, J.A., and Wong, S.M. 1999. Detection of Cymbidium mosaic Potexvirus and Odontoglossum ringspot Tobamovirus using immuno-capillary zone electrophoresis. Phytopathology 89:522-528.

García, A.O. 1985. Identificación de Enfermedades Virales Presentes en *Anthurium andreannum*, *Cattleya warcewiczii* y *Euphorbia pulcherrima*. Tesis de grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay, Venezuela. 95 p.

International Labour Organization. 2000. The world of cut flower: Trends and prospects. <http://www.ilo.org/public/english/dialogue/sector/papers/ctflower/>. Consulta enero 15, 2001.

Moreira, L., Villalobos, W., Rodríguez-Cerezo, E., y Rivera, C. 1999. Infección de la orquídea terrestre *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae) con el Potexvirus del mosaico del cymbidium (CymMV) en Costa Rica. Revista de Biología Tropical 47:281-286.

VejaratpimoL, R., Channuntapipat, C., Pewnim, T., Ito, K., Iizuka, M., and Minamiura, N. 1999. Detection and serological relationships of Cymbidium mosaic potexvirus isolates. Journal of Bioscience and Bioengineering 87:161-168.

Wisler, G.C. 1989. How to Control Orchid Viruses. The Complete Guidebook. Maupin House Publishers. Gainesville, Florida. USA. 119 p.

Zettler, F.W., Ko, N., Wisler, G.C., Elliot, M., and Wong, S.M. 1990. Viruses of orchid and their control. Plant Disease 74:621-626.