

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

**Verificación de los tipos con algunas especies nuevas en los  
tipos del Valle Central de Costa Rica**

Trabajo sometido a la consideración de la Facultad de Ciencias Escuela de  
Biología para optar por el grado de Licenciado en Biología

José Guillermo Chacón Jiménez

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2002

## RESUMEN

En dos viveros del Valle Central (Costa Rica) se seleccionó un total de 197 plantas de orquídeas, 180 de ellas correspondientes a 150 especies nativas de 50 géneros, y 17 plantas de especies no nativas. Estas plantas fueron seleccionadas por presentar síntomas foliares, similares a los causados por virus, principalmente mosaicos cloróticos, necrosis, engrosamiento de venas y deformación foliar. Muestras de hojas de cada planta se analizaron mediante la técnica de ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay") utilizando anticuerpos específicos contra los principales virus que afectan orquídeas en el mundo: *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV), *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV), *Tobacco rattle tobnavirus* (TRV), *Cymbidium ringspot tombusvirus* (CymRSV), *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV), *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV), y el género *Potyvirus*. Todos los virus analizados se encontraron en infecciones simples o mixtas en al menos uno de los dos viveros analizados.

De las 32 plantas de especies nativas analizadas en el vivero denominado A, el 68.8% fueron positivas para al menos uno de los virus ensayados. El 37.5% presentó infecciones mixtas de dos a cuatro virus, y el 31.5 % presentó infecciones simples. De las 148 plantas de especies nativas analizadas en el vivero B, el 59.5% fueron positivas para al menos uno de los virus ensayados, pues presentaban infecciones mixtas de dos a cinco virus en el 25% del total de plantas. En total se hallaron 26 combinaciones diferentes de virus que producen infecciones mixtas.

El virus CymMV fue el encontrado con mayor frecuencia en ambos viveros. Este virus se presentó en el 37.9% de las plantas analizadas; seguido por el género *Potyvirus*, encontrado en el 13.6% de las muestras. El resto de los virus presentes en ambos viveros se halló en porcentajes menores.

De acuerdo con la literatura disponible, se encontró en total 137 infecciones virales en especies de orquídeas nativas no informadas previamente, distribuidas en las seis especies virales y el género *Potyvirus*. Se incluyen 76 informes nuevos a nivel de género y especie, 15 a nivel de género, y 46 sólo a nivel de especie. -

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Identificación de los virus que afectan orquídeas nativas en dos  
viveros del Valle Central de Costa Rica**

**Tesis sometida a la consideración de la Facultad de Ciencias, Escuela de  
Biología para optar por el grado de Licenciado en Biología**

**José Guillermo Chacón Jiménez**

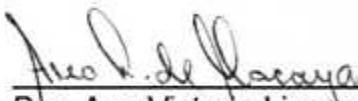
**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica**

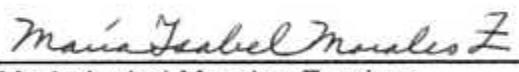
**2002**

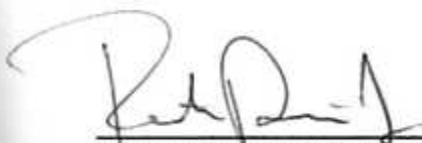
Esta tesis fue aceptada por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciado en Biología.

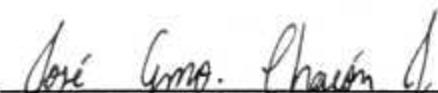
  
\_\_\_\_\_  
M.Sc. Lisela Moreira Carmona  
Directora de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
M.Sc. Carmen Rivera Herrero  
Miembro del tribunal

  
\_\_\_\_\_  
Dña. Ana Victoria Lizano Umaña  
Miembro del tribunal

  
\_\_\_\_\_  
Marie Isabel Morales Zurcher  
Miembro del tribunal

  
\_\_\_\_\_  
M.Sc. Daniel Briceño Lobo  
Director de la Escuela de Biología

  
\_\_\_\_\_  
José Guillermo Chacón Jiménez  
Postulante

## DEDICATORIA

*A mis padres, por su incalculable amor,  
sus múltiples sacrificios y su gran paciencia.*

## AGRADECIMIENTOS

Mi más grande agradecimiento es para el Creador, quien me dio la inteligencia, la fuerza y el coraje para completar el reto. Doy gracias a Él por mis padres, quienes han luchado y soportado muchas dificultades por mantenerme estudiando.

Agradezco a Franco Pupulin, Mario Blanco y Jorge Warner por sus consejos y guía en la identificación de muchos ejemplares de plantas, confirmación de listas de especies de orquídeas nativas y los consejos que me brindaron.

Agradezco a todo el personal de los viveros estudiados, por su amplia colaboración.

Este proyecto fue realizado gracias al financiamiento del Fondo de Incentivos MICIT-CONICIT proyecto 008-99, la Vicerrectoría de Investigación proyecto 801-99-537 y del PCDV-CIBCM.

Por último, pero no menos importante, externo mi agradecimiento al personal del Programa de Caracterización y Diagnóstico de Virus, Viroides y Fitoplasmas en Cultivos de Interés Económico y Alimentario (PCDV) en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica (UCR), especialmente a Lisela Moreira, por su guía y constante colaboración como tutora para llegar a buen término en la elaboración de esta tesis.

## ÍNDICE GENERAL

Apartado	Página
Hoja de aprobación	ii
Dedicatoria	iii
Reconocimientos	iv
Índice general	v
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	x
Lista de abreviaturas	xi
Resumen	xiv
1. Introducción	1
2. Objetivos	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. Marco teórico	5
3.1 Virus que infectan orquídeas	5
3.2 Detección de virus	11
3.3 Virus de orquídeas en Costa Rica	14
4. Metodología	15
4.1 Descripción de las áreas de muestreo	15
4.2 Análisis de síntomas	16
4.3 Recolección y análisis de muestras mediante ELISA directo e indirecto	16

<b>Apartado</b>	<b>Página</b>
4.4 Análisis de muestras por microscopia de luz	20
4.4.1 Inclusiones virales	20
4.4.2 Estructuras fúngicas	20
5. Resultados	24
5.1 Infecciones virales detectadas por ELISA en el vivero A	24
5.2 Infecciones virales detectadas por ELISA en el vivero B	26
5.3 Comparación entre viveros	26
5.4 Síntomas observados en algunas especies con infección viral simple	29
5.5 Nuevos géneros y especies de orquídeas informados como hospederas de los virus en estudio	34
5.6 Microscopia de luz	40
5.6.1 Estructuras fúngicas detectadas	40
5.6.2 Inclusiones virales observadas	41
6. Discusión y conclusiones	46
7. Bibliografía	57
<b>Apartado</b>	<b>Página</b>
<b>Apéndices</b>	63
I: Virus en estudio	63
II: Evaluación de orquídeas	68

III: Fórmulas de soluciones amortiguadoras	72
IV: Lista de plantas evaluadas por mediante ELISA en el vivero A	74
V: Lista de plantas evaluadas por mediante ELISA en el vivero B	75
VI: Lista de plantas analizadas para inclusiones virales por microscopia de luz.	79

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
Cuadro 1.	Virus de orquídeas, medio de transmisión, distribución geográfica y síntomas informados.	8
Cuadro 2.	Número de plantas analizadas por área.	23
Cuadro 3.	Frecuencia de aparición de cada uno de los virus detectados en cada vivero y en total.	24
Cuadro 4.	Porcentaje de infecciones simples y mixtas en plantas nativas evaluadas.	25
Cuadro 5.	Combinaciones virales encontradas en los viveros A y B.	28
Cuadro 6.	Síntomas observados en las plantas con infección simple de CymMV.	30
Cuadro 7.	Síntomas observados en las plantas con infección simple de ORSV.	31
Cuadro 8.	Síntomas observados en las plantas con infección simple de TRV.	32
Cuadro 9.	Síntomas observados en las plantas con infección simple de TSWV.	32
Cuadro 10.	Síntomas observados en las plantas con infección de potyvirus.	33
Cuadro 11.	Síntomas observados en las plantas con infección simple de CMV.	33
Cuadro 12.	Número de informes nuevos para cada virus estudiado.	34
Cuadro 13.	Géneros y especies de orquídeas nativas: nuevos informes para el virus CymMV.	35
Cuadro 14.	Géneros y especies de orquídeas nativas: nuevos informes de infección de ORSV	36

<b>Cuadro</b>	<b>INDICE DE CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
<b>Cuadro 15.</b>	Géneros y especies de orquídeas nativas: nuevos informes de infección de TRV	37
<b>Cuadro 16.</b>	Géneros y especies de orquídeas nativas: nuevos informes de infección de CymRSV.	37
<b>Cuadro 17.</b>	Géneros y especies de orquídeas nativas: nuevos informes de infección de TSWV.	38
<b>Cuadro 18.</b>	Géneros y especies de orquídeas nativas: nuevos informes de infección de CMV.	38
<b>Cuadro 19.</b>	Géneros y especies de orquídeas nativas: nuevos informes de infección con potyvirus.	39
<b>Cuadro 20.</b>	Plantas infectadas con hongos analizadas por microscopía de luz.	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1.	Número de plantas nativas en el vivero A según la cantidad de especies virales detectadas por ELISA y el área donde se encontraron.	25
Figura 2.	Número de plantas nativas en el vivero B según la cantidad de especies virales detectadas por ELISA y el área donde se encontraron.	26
Figura 3.	Número de plantas detectadas con infección viral simple por vivero.	27
Figura 4.	Diferentes síntomas observados en infección simple de CymMV en orquídeas de especies nativas de Costa Rica.	42
Figura 5.	Síntomas inducidos por infecciones virales simples de ORSV (A y B), TRV (C y D) y TSWV (E y F) en algunas orquídeas de especies nativas.	43
Figura 6.	Síntomas inducidos por infecciones virales simples de CymRSV (A), potyvirus (B, C y D) y CMV (E y F) en algunas orquídeas de especies nativas.	44
Figura 7.	Inclusiones virales observadas en <i>Pleurothallis fulgens</i> por microscopia de luz a 1000 X. A) inclusiones en mesófilo; B) inclusiones en epidermis.	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcIV	Aclaramiento de venas
Acu	Acucharamiento
Am	Amarillamiento
Amp	Ampollamiento
Anccl	Anillos cloróticos
Arr	Arrugamiento
Bcl	Bandeado clorótico
BSA	Albúmina sérica bovina
BYMV	<i>Bean yellow mosaic potyvirus</i>
C.	Género <i>Cattleya</i>
CF	Cyripedium filamentous potyvirus
CIBCM	Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular
CITES	Convención sobre el Comercio Internacional de Fauna y Flora Silvestre
CMV	<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i>
CymMV	<i>Cymbidium mosaic potexvirus</i>
CymRSV	<i>Cymbidium ringspot tombusvirus</i>
CYVC-C	<i>Clover yellow vein potyvirus</i>
DAS-ELISA	ELISA "double antibody sandwich"
Dism.	Disminuida
DL	Disminución de la lámina foliar

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
DRV	<i>Dendrobium rhabdovirus</i>
DVN	<i>Dendrobium vein necrosis closterovirus</i>
E	Especie
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
G	Género
GBV	Grammatophyllum bacilliform virus
IC-RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con inmunocaptura y transcriptasa reversa
ICTV	Comité Internacional en Taxonomía de Virus
INSV	<i>Impatiens necrotic spot tospovirus</i>
ISEM	Immunosorbent electron microscopy
LRLSV	<i>Laelia red leafspot rhabdovirus</i>
mchab	Manchas blancas
mcham	Manchas moradas
MIRENEM	Ministerio de Recursos Naturales, Energía y Minas
Ms	Mosaico
Mt	Moteado
N	Necrosis
OFV	<i>Orchid fleck rhabdovirus</i>
O-G	Tinción de anaranjado de calcomina con verde brillante de Luxol.
ORSV	<i>Odontoglossum ringspot tobamovirus</i>
PBST	Amortiguador 1X de fosfato sodio-potasio 0.1 M, pH 7.4 con 0.05% de Tween 20®

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<b>PCDV</b>	Programa de Caracterización y Diagnóstico de Virus, Viroides y Fitoplasmas en Cultivos de Interés Económico y Alimentario
<b>PROCOMER</b>	Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>RIPA</b>	Rapid immunofilter paper assay
<b>RV</b>	Rhabdovirus de orquídeas
<b>sp.</b>	Indica especie no identificada
<b>spp.</b>	Indica género con varias especies
<b>Taisuco</b>	Taiwan Sugar Corporation
<b>TAS-ELISA</b>	ELISA "triple antibody sandwich"
<b>TBIA</b>	Tissue-blot immunoassay
<b>TI</b>	<i>Trichopilia isometric virus</i>
<b>TRV</b>	<i>Tobacco rattle virus</i>
<b>TSWV</b>	<i>Tomato spotted wilt tospovirus</i>
<b>Veng</b>	Venas engrosadas

## RESUMEN

En dos viveros del Valle Central (Costa Rica) se seleccionó un total de 197 plantas de orquídeas, 180 de ellas correspondientes a 150 especies nativas de 50 géneros, y 17 plantas de especies no nativas. Estas plantas fueron seleccionadas por presentar síntomas foliares, similares a los causados por virus, principalmente mosaicos cloróticos, necrosis, engrosamiento de venas y deformación foliar. Muestras de hojas de cada planta se analizaron mediante la técnica de ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay") utilizando anticuerpos específicos contra los principales virus que afectan orquídeas en el mundo: *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV), *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV), *Tobacco rattle tobavirus* (TRV), *Cymbidium ringspot tombusvirus* (CymRSV), *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV), *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV), y el género *Potyvirus*. Todos los virus analizados se encontraron en infecciones simples o mixtas en al menos uno de los dos viveros analizados.

De las 32 plantas de especies nativas analizadas en el vivero denominado A, el 68.8% fueron positivas para al menos uno de los virus ensayados. El 37.5% presentó infecciones mixtas de dos a cuatro virus, y el 31.5 % presentó infecciones simples. De las 148 plantas de especies nativas analizadas en el vivero B, el 59.5% fueron positivas para al menos uno de los virus ensayados, pues presentaban infecciones mixtas de dos a cinco virus en el 25% del total de plantas. En total se hallaron 26 combinaciones diferentes de virus que producen infecciones mixtas.

El virus CymMV fue el encontrado con mayor frecuencia en ambos viveros. Este virus se presentó en el 37.9% de las plantas analizadas; seguido por el género *Potyvirus*, encontrado en el 13.6% de las muestras. El resto de los virus presentes en ambos viveros se halló en porcentajes menores.

De acuerdo con la literatura disponible, se encontró en total 137 infecciones virales en especies de orquídeas nativas no informadas previamente, distribuidas en las seis especies virales y el género *Potyvirus*. Se incluyen 76 informes nuevos a nivel de género y especie, 15 a nivel de género, y 46 sólo a nivel de especie.

## 1. Introducción

Las orquídeas han despertado el interés del ser humano debido a sus flores variadas en forma, color y tamaño, y en algunos casos con exquisitas fragancias. Los primeros datos que se conocen sobre el interés en estudiarlas se remontan a 2600 A.C, cuando el emperador chino Shen Nung describió la especie *Bletilla hyacinthina* y una especie de *Dendrobium* (Anónimo 1973). El cultivo y estudio moderno de las orquídeas, como curiosidades botánicas, se inició en Europa entre los siglos XVI y XVII. En el siglo XVIII se iniciaron los intentos por cultivarlas fuera de su hábitat natural. La recolección y el cultivo intensivo de orquídeas por parte de comercializadoras inició en Brasil, después del redescubrimiento de las catleas (*Cattleya* spp.). Desde entonces, el cultivo ha crecido y se ha convertido en una importante actividad hortícola (Anónimo 1973, Rittershausen & Rittershausen 2001).

En general, la floricultura es una de las actividades hortícolas que más se ha desarrollado durante la segunda mitad del siglo XX. Como parte de ella, la producción de orquídeas ha tenido auge, no sólo en las formas tradicionales de los cultivadores privados, sino también en el ámbito horticultural. Por ejemplo, a inicios de la década de 1990, el género *Cymbidium* se colocó en el octavo puesto de las ventas de flores cortadas en Holanda; sin embargo, este género no era importante en el mercado a mediados del siglo XX. Esto es notable, si se considera que Holanda es actualmente el productor de flores número uno en el mundo, con el 59% de las exportaciones mundiales (Malter 1995). Muchos otros países han dado importancia al cultivo comercial de orquídeas, principalmente Estados Unidos de América (EUA, especialmente en Hawaii) (Hu *et al.* 1993) y Asia oriental (Lawson y Hsu 1995). Entre los principales productores están los países del Pacífico asiático; el más importante es Tailandia, que en 1994 exportó 32 millones de dólares en orquídeas, en su mayor parte al mercado japonés (Hew 1989, Tanaka *et al.* 1997).

Costa Rica, debido a sus condiciones geográficas, tiene una de las floras más ricas del mundo. Con respecto a las orquídeas, se han informado con certeza 180 géneros, que incluyen 1,364 especies (Pupulin 2002). El cultivo tradicional de orquídeas en invernaderos privados y casas particulares en nuestro país, constituye un mercado interno relativamente pequeño, que se abastece en principio de plantas traídas directamente de los bosques. Este saqueo constante sumado a la destrucción y fragmentación del hábitat, ha contribuido a que varias especies se encuentren en vías de extinción. El Reglamento de la Ley de Conservación de Vida Silvestre (No. 22454-MIRENEM) para ratificar las regulaciones de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES) ha declarado en peligro de extinción las orquídeas: guaria Turrialba (*Cattleya dowiana*), mariposa (*Oncidium kramerianum*) y tricopilia (*Tricophilia suavis*), dejando el resto de las especies de la familia Orchidaceae incluidas en la categoría de especies de flora con poblaciones reducidas. El comercio local o internacional de todas las especies de la familia Orchidaceae está restringido, con excepción en el país de las plantas producidas por técnicas de cultivo *in vitro*, flores cortadas, los híbridos artificiales o los productos obtenidos de la vainilla cultivada (CITES 1997, J. Warner com. pers. 2000). Como medida de control, para la exportación de orquídeas se requiere de la aprobación del permiso del CITES por medio del Jardín Botánico Lankester de la Universidad de Costa Rica.

Aunque Costa Rica cuenta con el clima ideal para la reproducción de orquídeas para exportación y producción de flor, aún no hay una industria establecida, como las presentes en Florida, Colombia o Brasil, entre otros. En 1998 las empresas exportadoras de orquídeas en Costa Rica eran diez, y se estimaba que existían buenas posibilidades de incrementar la producción y las exportaciones, pues no se satisfacía la demanda del mercado internacional (Herrera-Villalobos 1998). En el 2001 operaron sólo nueve exportadoras en el país. Según la información suministrada por el centro de documentación de la Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER), durante el año

2001 las exportaciones de flor cortada y plántulas *in vitro* de orquídeas rindieron alrededor de \$331 000,00 en Costa Rica. Esta suma puede considerarse muy baja, si se compara con otros productos del sector agrícola, pero es uno de los productos no tradicionales que se abre paso, y se espera que este valor aumente con las inversiones de Taisuco (Taiwan Sugar Corporation) de Costa Rica SA. Por otra parte, en Costa Rica se han establecido algunas plantaciones de vainilla, pero aún su cultivo es muy reducido, tan solo cinco hectáreas entre las regiones de Parrita, Aguirre y Río Blanco, en el Pacífico Central, según datos del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG).

Uno de los problemas de la propagación vegetativa de plantas es la introducción y dispersión de enfermedades virales, lo cual ocurre también en el cultivo de orquídeas, cuyo valor comercial y de colección podría reducirse considerablemente por esta causa. Desde finales de la década de los años 1940 se reconoce que este tipo de enfermedades afecta a las orquídeas.

El trasiego internacional de plantas y las infecciones asintomáticas han generado la dispersión alrededor del mundo de muchos de los virus que las afectan. El desarrollo de investigaciones para determinar cuáles virus afectan orquídeas en el país apenas inicia, y no todos los productores y coleccionistas privados reconocen la importancia de determinar si estos patógenos se encuentran en sus colecciones, para poder limpiarlas de ellos. Por otra parte, el sistema de Protección Fitosanitaria del país debe conocer este tipo de información para que las importaciones y exportaciones se efectúen de acuerdo con las políticas de transparencia internacional y protección mutua.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Determinar la presencia de seis virus y un género viral que infectan orquídeas, en las especies de orquídeas nativas cultivadas en dos viveros del Valle Central de Costa Rica.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar mediante la técnica de ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) la presencia de los virus: *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV), *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV), *Tobacco rattle tobavirus* (TRV), *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV), *Cymbidium ringspot tombusvirus* (CymRSV), *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV) y el género *Potyvirus*, en orquídeas nativas de dos viveros del Valle Central.
- Describir los síntomas relacionados con las infecciones virales en especies de orquídeas nativas de Costa Rica.
- Determinar los tipos de infección viral que son nuevos, para las especies de orquídeas incluidas en el estudio.
- Evaluar, por medio de la técnica de microscopia de luz, la presencia de inclusiones virales, en las plantas sintomáticas que resultaron negativas mediante las pruebas serológicas para los virus mencionados en el primer objetivo específico.

### 3. Revisión de literatura

#### 3.1 Virus que infectan orquídeas

El desarrollo de las técnicas de micropropagación de mericlones (clones meristemáticos) y cultivo *in vitro* de semillas, redujeron considerablemente el precio de las orquídeas. Esto contribuyó a la popularización de su cultivo. La intensidad de la producción ha favorecido el intercambio de plantas, muchas veces sin los debidos cuidados, con el consiguiente aumento de los virus que las afectan, los cuales en muchas ocasiones no desarrollan síntomas visibles (Lawson & Hsu 1995).

El primer caso documentado de una orquídea infectada por virus data de 1900, cuando el padre de la orquideología moderna, Lucien Linden, publicó un dibujo de *Cattleya labiata*, que presentaba jaspeados en las flores, común en plantas infectadas por *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV). Llamó a esta especie *C. labiata* var. *alfrediana* (Schelpe 1983). Aunque Linden creyó encontrar una nueva variedad, lo más probable es que se tratara de una planta enferma, debido a que el síntoma que presentaba era muy similar a los jaspeados en tulipanes, que ya se conocían como una enfermedad viral importante en esa época.

Se considera, que los virus se encontraban en orquídeas silvestres, mucho antes de que el ser humano las cultivara (Kado 1964). Es probable que en algunos casos, las infecciones provinieran de otras especies portadoras o enfermas, que tuvieron contacto con las orquídeas en su hábitat natural o en cultivos. Sin embargo, son pocos los estudios publicados de virus en orquídeas silvestres. En algunas investigaciones realizadas en Florida (Zettler *et al.* 1978), Ecuador, Puerto Rico y Florida (Elliot *et al.* 1996), y en Polinesia Francesa (Wisler *et al.* 1987), los autores no han podido detectar virus en poblaciones naturales.

Sin embargo, en fechas recientes, Méndez *et al.* (2002) informaron que detectaron plantas silvestres infectadas por ORSV y *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV) en tres bosques de la Sierra de las Minas, Guatemala, sin hallar relación con la cercanía a cultivos. Por tanto, el origen de estas infecciones virales podría suponerse de carácter natural, aunque los estudios en otros ambientes naturales son deseables para confirmar esta posibilidad.

Los virus identificados que infectan a las orquídeas pertenecen a diferentes grupos taxonómicos (apéndice I). Los dos virus más conocidos y de distribución cosmopolita son el *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) y el ORSV (antes conocido como la raza del *Odontoglossum* del virus del mosaico del tabaco, TMV-O). Ambos virus fueron descritos en la década de los 1950 (Zettler *et al.* 1990, Lawson 1995). Aparte de éstos, se conocen al menos 28 virus más que pueden infectar orquídeas. De algunos de estos virus se cuenta con poca información, en especial sobre sintomatología y ámbito de hospederas en la familia Orchidaceae y en otras familias de plantas. En muchos casos, la presencia de algunas especies de virus en orquídeas, ha sido comunicada una sola vez, por lo que no se conoce su procedencia, ni sus vectores; o si pueden infectar otras especies de orquídeas distintas a la especie en que se determinó (Lawson & Hsu 1995). Incluso, en algunos de estos casos, el cuerpo vegetativo, las flores o ambas partes de la planta se observaron asintomáticos. También, es probable que haya aún virus sin determinar (Geraci 1996, Lawson 1995). El cuadro 1 resume información sobre los virus descritos que infectan orquídeas, su modo de transmisión, ámbito de distribución conocido y síntomas que inducen, según la literatura revisada.

El CymMV y el ORSV se consideran los virus más importantes, tanto por su amplia distribución, como por sus efectos en las orquídeas. En la literatura se ha informado que estos virus producen manchas cloróticas, necróticas o ambas en las hojas en especies e híbridos de *Cattleya*, *Coelogyne*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Laeliocattleya*, *Miltonia*, *Odontoglossum*, *Oncidium*, *Phalaenopsis*, *Spathoglottis*, *Vanda* y *Zigopetalum*. Sin embargo, los síntomas

varían en intensidad y forma entre géneros o especies de orquídeas (Jensen 1951, Jensen & Gold 1955, Murakishi 1958, Kado & Jensen 1964, Corbett 1967, Cybularz *et al.* 1997). Ambos virus pueden inducir jaspeados y deformación en las flores de *Cymbidium* y *Dendrobium*; e incluso manchas necróticas, que producen mala calidad de la flor en *Cattleya*, lo que afecta tanto a la producción comercial, como a los coleccionistas. En algunos casos, los dos virus se presentan en infección mixta, lo cual agrava los síntomas (Zettler *et al.* 1990, Hu *et al.* 1994, Lawson 1995, Tanaka *et al.* 1997).

Aunque la mayoría de la literatura existente se relaciona con CymMV y ORSV, existen algunos pocos informes que indican la presencia de otros virus en esta familia. Al menos ocho virus del género *Potyvirus* aceptados por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (por sus siglas en inglés ICTV) , se han relacionado con infecciones que afectan los géneros *Calanthe*, *Ceratobium*, *Cypripedium*, *Dendrobium*, *Masdevallia*, *Spiranthes*, *Vanilla*, *Dactylorhiza* (antes en *Orchis*) y *Orchis* (Zettler *et al.* 1990, Lawson 1995, Gara *et al.* 1998), (cuadro 1). Los síntomas informados son mosaicos cloróticos en *Dendrobium* producidos por un potyvirus no identificado (Hu *et al.* 1993); mosaico clorótico con deformación de la lámina foliar en *Vanilla*, producido por *Vanilla mosaic potyvirus* (Wisler *et al.* 1987); necrosis en la flor de *Calanthe* producida por *Dendrobium mosaic virus* (DeMV), (Lawson 1995). El DeMV, descubierto en Hawaii en 1952, induce clorosis, mosaico y deformaciones de las hojas, además de jaspeado y deformación en las flores de *Dendrobium superbum*; se conoce que infecta a otras especies del género *Dendrobium* y que es un miembro del sub-grupo *del Bean common mosaic potyvirus* (BCMV), (Hu *et al.* 1995). En general, se considera que los potyvirus son el género más grande e importante de virus en plantas (Jordan & Hammond 1991). Aunque los potyvirus que infectan orquídeas se han encontrado en pocas localidades, su distribución geográfica podría ser mayor. El potyvirus del mosaico de la *Vanilla* fue descrito en Polinesia Francesa, donde estas orquídeas se han cultivado desde 1848, para la extracción de esencia. Aunque que no se encontraron CymMV u ORSV en las plantaciones de *Vanilla*, estos virus sí

**Cuadro 1. Virus de orquídeas: medio de transmisión, distribución geográfica y síntomas informados.**

Virus	Transmisión	Distribución Geográfica	Síntomas Informados
<i>Cymbidium mosaic potexvirus</i> (CymMV)	Savia, macetas y agua de irrigación	Cosmopolita	Jaspeados en flores, necrosis y clorosis en hojas
<i>Odontoglossum ringspot tobamovirus</i> (ORSV, TMV-O)	Savia, agua de irrigación	Cosmopolita	Necrosis en flor, anillos cloróticos en hojas
<i>Bean yellow mosaic potyvirus</i> (BYMV)	Savia y áfidos	Japón, EUA y Alemania	Flores asintomáticas
<i>Dendrobium mosaic potyvirus</i> (DeMV)	Savia y áfidos	Japón y Hawaii	Jaspeados y deformación en flores, mosaicos, hojas malformadas
<i>Clover yellow vein potyvirus</i> (CYVC-C)	Savia y áfidos	Japón	Necrosis en flores
<i>Dendrobium vein necrosis closterovirus</i> (DVN)	(Áfidos)*	Alemania y EUA	Necrosis en las venas
<i>Cypripedium filamentous potyvirus</i> (CF)	(Áfidos)*	Alemania	Flores asintomáticas
<i>Turnip mosaic potyvirus</i> (TuMV)	Savia y áfidos	Alemania	Flores asintomáticas
<i>Tobacco rattle tobavirus</i> (TRV)	Savia, nematodos	Alemania	Deformación de las flores
<i>Vanilla mosaic potyvirus</i>	Áfidos	Polinesia	Mosaico y deformación de hojas
<i>Cymbidium ringspot tombusvirus</i> (CymRSV)	Savia, suelo, agua de regadío	Francia	Anillos cloróticos concéntricos en hojas
<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i> (CMV)	Savia y áfidos	Japón, Brasil	Mosaico en hojas, jaspeados suaves del color en la flor
<i>Cymbidium mild mosaic rhabdovirus</i> (CymMV)	Savia	Corea	Flores asintomáticas
<i>Trichopilia isometric virus</i> (TI)	Desconocido	Alemania	No especificados
<i>Masdevallia isometric virus</i>	Desconocido	Colombia	No especificados
<i>Tomato ringspot nepovirus</i> (ToRSV)	Savia, nematodos	EUA	No especificados
<i>Short orchid rhabdovirus</i>	Savia	Alemania y Dinamarca	No especificados
<i>Dendrobium bacilliform virus</i> (DV)	Desconocido	Nueva Guinea y Alemania	No especificados
<i>Orchids fleck rhabdovirus</i> (OFV)	Savia, ácaros	Japón, Brasil	No especificados
<i>Rhabdovirus de orquídeas</i> (RV)	Desconocido	Brasil	No especificados
<i>Grammatophyllum bacilliform virus</i> (GBV)	Desconocida	Maryland (EUA)	No especificados
<i>Dendrobium rhabdovirus</i> (DRV)	(Áfidos)*	Hawaii	No especificados
<i>Long orchid rhabdovirus</i> (LORV)	(Áfidos)*	Alemania	No especificados
<i>Laelia red leafspot rhabdovirus</i> (LRLSV)	(Áfidos)*	Alemania	No especificados
<i>Tomato spotted wilt tospovirus</i> (TSWV)	Savia y trips	California y Hawaii (EUA)	Anillos cloróticos y manchas necróticas
<i>Impatiens necrotic spot virus</i> (INSV)	Savia y trips	California (EUA)	No especificados
Virus baciliforme de <i>Phalaenopsis</i>	Desconocida	Alemania	No especificados
<i>Calanthe mosaic potyvirus</i>	Desconocido	Japón	Mosaico y hojas malformadas
<i>Ceratobium mosaic potyvirus</i>	(Áfidos)*	Australia	Mosaico y hojas malformadas

❖ **Nota:** los vectores entre paréntesis son hipótesis de Zettler *et al.* (1990), pero no se ha establecido con certeza un medio de transmisión para estos virus.

**Fuente:** modificado de Zettler *et al.* (1990) y Lawson (1995), con datos de Gara *et al.* (1998), Hu *et al.* (1994) y Mackenzie *et al.* (1998).

aparecieron en orquídeas ornamentales cultivadas en invernaderos de la misma zona (Wisler *et al.* 1987). Aparentemente, el potyvirus hallado en las plantas de *Vanilla* no es igual a otros que afectan orquídeas, ni está relacionado con el *Clover yellow vein potyvirus* o el *Bean yellow mosaic potyvirus*, con los cuales se comparó serológicamente. Queda la posibilidad de que haya sido introducido de Madagascar, con las variedades llevadas a Polinesia francesa y propagadas vegetativamente. Este potyvirus ha sido también informado en varias islas del Pacífico del Sur, así como otros potyvirus (Pearson *et al.* 1993). Además, estos mismo investigadores han encontrado un tercer potyvirus afectando *Vanilla* spp. en estas islas, y un rhabdovirus de 394 x 90 nm, por cuyas dimensiones se asume que es diferente al *Orchid fleck rhabdovirus* (150 x 40 nm). Gibbs *et al.* (2000) han informado de la presencia de siete diferentes potyvirus afectando 35 géneros de orquídeas en Australia. De estos siete, sólo BYMV es aceptado por el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV). Tres de los otros seis virus pertenecen al grupo del BCMV, pero diferentes al DeMV, y fueron designados tentativamente como *Ceratobium mosaic potyvirus*, *Sarcochilus virus* Y y *Diurius virus* Y.

El CMV es uno de los virus con mayor distribución a nivel mundial y con un amplio ámbito de especies vegetales hospederas. Se ha informado que en las orquídeas provoca mosaico foliar y jaspeado leve en las flores de *Calanthe*, *Dendrobium*, *Miltonia* y *Phalaenopsis* (Ko 1988, Lawson 1995, Lawson & Hsu 1995). Se conocen muy pocos géneros de orquídeas afectados por este virus; sin embargo, es probable que sea común en muchos otros géneros (Lawson & Hsu 1995). Por otra parte, el *Cymbidium ringspot tombusvirus* (CymRSV) debe su nombre a que desarrolla anillos cloróticos concéntricos en el tejido foliar de algunas especies de orquídeas. El CymRSV no parece estar muy disperso entre orquídeas, aunque es fácilmente transmitido por contacto foliar, manejo de plantas y sustrato contaminado (Hollings *et al.* 1977). Es un virus de muy amplio ámbito de hospederas (Zettler *et al.* 1990). Otros miembros del género *Tombusvirus* se han encontrado en ríos y lagos, por lo que se supone que se pueden transmitir por medio del agua de riego (Zettler *et al.* 1987).

No se conoce si algunas infecciones que se presentan en orquídeas son causadas por uno o más virus, ni las relaciones taxonómicas entre ellos. Tal es el caso de los hallazgos de partículas en forma de bala semejantes a rhabdovirus encontradas en muestras de los géneros *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, y *Laelia* en Europa, Japón y USA, y en especies de orquídeas silvestres de los géneros *Miltonia*, *Oncidium*, *Trigonidium*, *Brassia*, *Bifrenaria*, *Aspasia* y *Hormidium* en Brasil (Kitajima *et al.* 1974). Actualmente el *Orchid fleck rhabdovirus* (OFV) es considerado como el patógeno responsable de tales infecciones. Gibbs *et al.* (2000) mencionan que OFV es común en muchas colecciones en Australia y en al menos 14 géneros diferentes. Como se mencionó, Pearson *et al.* (1993) han encontrado otro rhabdovirus de dimensiones diferentes a las de OFV, afectando *Vanilla*. El OFR es transmitido por el ácaro *Brevipalpus californianus* (E. Kitajima *et al.* 2001).

El *Tobacco rattle tobnavirus* (TRV) es transmitido por nematodos, y es probable que tenga mayor importancia para orquídeas que se cultivan en tierra. El TRV posiblemente no se disemina en los cultivares de orquídeas epífitas, por tener poco medio por el cual puedan movilizarse los nematodos (Zettler *et al.* 1987), sin embargo, existe el peligro de propagarlo, por medio de instrumentos que se emplean en el corte, siembra y trasplante de plantas contaminadas con tierra. Se ha informado que TRV puede infectar los géneros *Cymbidium* y *Orchis*, provocando deformación en la flor de *Orchis* (Zettler *et al.* 1987, Lawson 1995) y mosaico foliar en *Orchis purpurea* (Lesemann & Vetten 1985).

El *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) es uno de los virus cosmopolitas con mayor ámbito de plantas hospederas, entre las que se incluyen algunas especies de orquídeas. Este virus ha sido detectado en *Phalaenopsis* (Sclar & Anisco 2001) y *Oncidium* en Hawaii, sembradas cerca de crisantemos infectados (Hu *et al.* 1993).

El modo de transmisión de los virus es uno de los puntos más importantes a estudiar, ya que los conocimientos en esta materia permiten desarrollar controles adecuados. Todos los virus de orquídeas se transmiten por medio de la propagación vegetativa (cuadro 1), (Zettler *et al.* 1987, Cho *et al.* 1989, Hu *et al.* 1994, Lawson 1995). La transmisión por medio de semillas no ha sido comunicada, a excepción de un caso de CymMV, en el que la contaminación de la semilla con tejido materno durante su transplante a medios de germinación, puede ser la causa de la infección (Yuen *et al.* 1979, Porter *et al.* 1996). Muchos de los virus son transmitidos por medio de las prácticas de manejo de los cultivos.

Es poco probable que los dos virus de orquídeas más importantes, CymMV y ORSV, sean transmitidos por artrópodos vectores. En especial para ORSV, y en ninguno de los virus pertenecientes al género *Tobamovirus*, se ha demostrado que se transmitan por artrópodos (Zettler *et al.* 1987). En el cuadro 1 se indica que algunos de los virus perteneciente a los géneros *Potyvirus*, *Cucumovirus* y *Closterovirus*, son transmitidos por áfidos, aunque no se conozca cuales especies los transmiten. El TSWV es transmitido por "trips" y puede convertirse en una plaga importante en las orquídeas, debido a la fácil propagación y difícil control de éstos, además, este virus posee uno de los ámbitos de plantas hospederos más grande entre los virus de vegetales (Cho *et al.* 1989, Mayhew *et al.* 1992, Hu *et al.* 1993).

Debido a la forma en que se transmiten los virus hacia los cultivos establecidos, lo más recomendable es controlar los vectores potenciales, como áfidos o "trips", eliminar las plantas enfermas, flamear las herramientas de corte con alcohol 95%, o esterilizarlas con una solución al 1% de hidróxido de sodio (NaOH 1%) (Zettler *et al.* 1990, Hu *et al.* 1994, Lawson 1995).

### 3.2 Detección de virus

Como ya se mencionó, los síntomas varían de una especie a otra, hay infecciones mixtas, e incluso infecciones asintomáticas. Además, algunas enfermedades fúngicas y bacterianas provocan síntomas similares, lo cual complica el diagnóstico a simple vista. Por tanto, la detección visual de síntomas no siempre es acertada o recomendable, por lo que se han desarrollado métodos más seguros y específicos. La detección pronta y segura de plantas infectadas, así como la eliminación de los vectores (cuando éstos se conocen), son prácticas imprescindibles para todos los cultivadores, a fin de evitar la diseminación de los virus.

Uno de los sistemas más comúnmente utilizados para la detección de los virus en orquídeas es el bioensayo, ya que no requiere equipos especiales, y puede realizarlo cualquier cultivador en su propio invernadero (Lawson 1995, Lawson & Hsu 1995). Sin embargo, se requiere contar con muchas especies de plantas indicadoras para diferentes virus, del espacio físico para mantenerlas y de tiempo para lograr observar los síntomas. En el caso de CymMV se utiliza como planta indicadora *Senna occidentalis* (= *Cassia occidentalis*, Fabaceae), en la que se desarrollan pequeñas manchas café en forma localizada; para ORSV se utiliza *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae), que desarrolla manchas anaranjado claro. En ambos casos los síntomas aparecen una semana después de la inoculación. En el caso de CymRSV se utiliza *Chenopodium quinoa* (Chenopodiaceae), que desarrolla manchas cloróticas y seminecróticas locales (Hollings *et al.* 1977). Existen otras plantas indicadoras que se pueden utilizar, pero las tres mencionadas anteriormente son las comúnmente usadas. También se pueden probar por este método otros virus que pueden transmitirse mecánicamente como ToRSV, OFV, DeMV y CMV.

La microscopía electrónica es otro método usado para la detección e identificación de virus, ya sea mediante la evaluación de secciones ultrafinas,

tinción negativa o mediante el método de la inmuno-electromicroscopia (en inglés "immunosorbent electron microscopy", ISEM), (Hsu *et al.* 1992, Lawson & Hsu 1995). Una de las ventajas del ISEM es que permite la observación directa del antígeno, mediante la combinación de tinción y detección inmunológica; no obstante, ésta es una técnica muy cara que no está disponible en todas partes. Además, requiere de mucho tiempo y de personal altamente calificado.

En la actualidad, uno de los métodos más utilizados para detectar virus en orquídeas, es la técnica de ELISA, debido a la especificidad de sus resultados, costo económico relativamente bajo, rapidez de las pruebas y a que permite analizar muchas muestras simultáneamente (Robertson 1992, Hu *et al.* 1993, Lawson 1995, Geraci 1996). En Estados Unidos, varias compañías venden servicios de evaluación de orquídeas para CymMV y ORSV, y son recomendadas aquellas que utilizan el método de ELISA, por la certeza de los resultados (Robertson 1992). Sin embargo, se considera que la interpretación de los datos obtenidos por ELISA no siempre es fácil. Se debe determinar el umbral de exclusión entre plantas positivas y negativas, por lo que se requiere de experiencia en el manejo de la técnica y el conocimiento del virus en estudio (Sutula *et al.* 1986).

Otras técnicas inmunológicas se han utilizado con éxito para CymMV y ORSV. El ensayo rápido de papel inmunofiltro ("rapid immunofilter paper assay". RIPA) ha sido utilizado para ambos virus y ha demostrado ser un método práctico y rápido, que se puede emplear en el campo (Tanaka *et al.* 1997). Otros dos métodos inmunológicos se han utilizado con CymMV: el inmuno-ensayo de manchas de tejido, TBIA ("tissue-blot immunoassay") y el inmuno-ensayo de manchas de punto, DBIA ("dot blot immunoassay"). Ambos han sido descritos con amplitud en la literatura, y se ha comprobado su efectividad y gran sensibilidad en casos dudosos con ELISA (Hsu *et al.* 1992).

Otra de las técnicas utilizadas para la detección de virus es la observación, por medio de microscopia de luz, de inclusiones citológicas inducidas por virus, las cuales son teñidas con colorantes especiales (Christie & Edwardson 1994). Esta técnica ha tenido amplio uso en el estudio del CymMV y el ORSV, y se ha mejorado por medio de la microscopia confocal de rastreo láser (Wong *et al.* 1995). Los resultados requieren de una interpretación cuidadosa, mucha práctica en el uso del microscopio y profundos conocimientos de la anatomía de las plantas en estudio, en especial de la apariencia de las células sanas. Las inclusiones y deformaciones citológicas normalmente son inducidas por un virus en forma relativamente constante sobre un amplio ámbito de plantas hospederas (Christie & Edwardson 1994). La detección de virus mediante este método es relativamente rápida y barata. Sin embargo, son pocos los casos en los cuales las inclusiones pueden utilizarse para identificar el virus a nivel de especie. En la mayoría de los casos las inclusiones se utilizan para la descripción de géneros virales, aunque existen algunos grupos que producen inclusiones muy similares, que son difíciles de distinguir entre sí (Christie & Edwardson 1994).

Para CymMV y ORSV se han utilizado varias técnicas moleculares, entre ellas las sondas de ADN marcadas con Digoxigenina<sup>®</sup> o radiactividad, que permiten identificar la presencia de los ARN virales o bien determinar el movimiento de las partículas virales en las plantas (Hu & Wong 1998). En algunos casos (CymMV y ORSV) se cuenta con imprimadores específicos para realizar el diagnóstico, empleando la técnica de IC-RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con inmunocaptura y transcripción reversa), (Barry *et al.* 1996, Eun & Wong 2000).

### 3.3 Virus de orquídeas en Costa Rica

En Costa Rica se han publicado dos estudios de virus de orquídeas (Velasco *et al.* 1986 y Moreira *et al.* 1999). Velasco *et al.* (1986) estudiaron

híbridos de *Cymbidium*, en los cuales encontraron CymMV y ORSV. Moreira *et al.* (1999) encontraron CymMV en *Phaius tankervilleae*, una especie de hábito terrestre. En ambos casos las plantas fueron obtenidas de viveros en el Valle Central.

Los resultados de estas investigaciones demuestran la presencia de virus que afectan las orquídeas en Costa Rica. Esta es una razón importante para investigar este campo, a fin de conocer cuáles otros virus se encuentran presentes en el país, cuál es la sintomatología y la gravedad de la infección en especies nativas de importancia para la conservación, comercialización o ambas en Costa Rica. Estos datos son necesarios para dar recomendaciones a los cultivadores para que mejoren sus prácticas fitosanitarias.

## 4. Metodología

Los análisis de las muestras se efectuaron en el laboratorio del Programa de Caracterización y Diagnóstico de Virus, Viroides y Fitoplasmas en Cultivos de Interés Económico y Alimentario (PCDV) en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica (UCR).

### 4.1 Descripción de áreas de muestreo

Las plantas utilizadas en esta investigación, se escogieron entre las mantenidas en dos viveros del Valle Central de Costa Rica, los que se denominarán A y B. En el vivero A, se definieron tres áreas de muestreo: fuera de invernaderos (código 00), invernadero principal (01) e invernadero de plantas madre (02). En el vivero B, se definieron cuatro áreas de muestreo: invernadero de miniaturas (código 03), invernadero de especies únicas (04), invernadero para exhibición (05) y senderos (06).

El vivero A mantenía pocas plantas nativas, por lo que se incluyeron algunas foráneas en los análisis. Las áreas 01 y 02 se encuentran rodeadas por edificios e invernaderos, separados en algunos casos por áreas verdes no muy extensas.

En el vivero B la población dominante es de plantas nativas, y se incluyó sólo una planta no nativa en los análisis serológicos. Las tres áreas se hallan en línea de este a oeste (03-04-05), y al norte, este y sur están rodeadas por áreas verdes con árboles y arbustos, muchos con orquídeas epífitas. Al oeste, el área 05 tiene una pequeña zona verde seguida de otro invernadero.

## 4.2 Análisis de síntomas

Se efectuaron visitas a los viveros en estudio, para tomar la información correspondiente a la sintomatología presentada por las plantas de orquídeas. Los síntomas se registraron en una hoja confeccionada para tal fin (apéndice II), en la que se incluyeron las manifestaciones más comunes en infecciones virales presentes en hojas, pseudobulbos, tallos o en la apariencia general de la planta.

Los síntomas considerados fueron: clorosis de distintos tipos, necrosis, aparición de anillos cloróticos y necróticos, deformaciones de los órganos, disminución de la lámina de la hoja, disminución del tamaño de los pseudobulbos. Además, se observó si los síntomas eran locales o sistémicos.

De cada planta evaluada se creó un registro fotográfico digital, tomado con una cámara Sony Mavica MVC-FD7.

Todas las plantas que se observaron y registraron fueron etiquetadas con el código designado.

## 4.3 Recolecta y análisis de muestras mediante ELISA directo e indirecto

Posteriormente al registro sintomatológico y fotográfico se procedió a la recolección del material vegetal para las pruebas.

En total se recolectaron 197 plantas, 48 en el vivero A y 149 en el B (listas en apéndices IV y V). En el Cuadro 2 se muestra el detalle y la ubicación de las muestras en ambos viveros.

Cuadro 2. Número de plantas analizadas por área.

Área	Vivero A		Vivero B	
	Nativas	No nativas	Nativas	No nativas
00	1			
01	29	2		
02	2	14		
03			83	
04			24	
05			30	1
06			11	
<b>Subtotal</b>	32	16	148	1
<b>Total</b>	48		149	

La mayoría de las muestras obtenidas de cada planta sintomática fueron trozos de hojas maduras, y en algunos casos flores. Cada muestra fue cortada con navajillas nuevas. Las muestras se transportaron en una hielera al laboratorio del PCDV- CIBCM.

Todas las muestras se analizaron para los virus CymMV, ORSV, TSWV, TRV, y CymRSV, mediante el método DAS-ELISA. Los potyvirus se analizaron por medio de ELISA indirecto. Para la evaluación de CMV de las muestras del vivero A se utilizó el método de ELISA indirecto, mientras que para las del vivero B se utilizó el método indirecto de "triple antibody sandwich" o TAS-ELISA. Para el análisis de todos los virus se utilizaron anticuerpos específicos de Agdia Co. (EUA), con excepción del CymMV, para el cual se usaron anticuerpos suministrados por el Dr. Hsu (EUA).

Las muestras se procesaron en el laboratorio para ELISA de la siguiente manera: se tomaron trozos de 0,2 g de cada planta sintomática y se maceraron con pistilo y mortero, o con macerador mecánico, según fuera el grosor de la lámina. Se utilizaron dos amortiguadores diferentes, uno para extracción general para la prueba DAS-ELISA (directo de doble sandwich de anticuerpo), y otro para

prueba ELISA indirecto (apéndice III), para obtener una dilución final de 1:5 p/v. Los macerados en el primer amortiguador se prepararon por triplicado, y en el segundo amortiguador por duplicado. Los amortiguadores se prepararon según lo recomendado por la casa comercial Agdia Inc.

Para DAS-ELISA se utilizó el protocolo descrito por Clark y Adams (1977), con las adaptaciones recomendadas por la compañía Agdia (EUA), como se describe a continuación.

Las placas de poliestireno (Immunolon 1, Dynex Technologies, EUA) se recubrieron con 100  $\mu$ l de anticuerpos específicos para cada uno de los virus, en amortiguador carbonato de sodio 0.01 M, pH 9.6 (apéndice III), a una concentración de 1:200 para los anticuerpos comerciales de Agdia, y 1:1000 para los anticuerpos de CymMV. Dos pocillos (A1 y A2) se dejaron sin recubrimiento, correspondientes a los blancos de la placa. Las placas se cubrieron con tapas plásticas o cinta adhesiva y se incubaron toda la noche a 4 °C en cámara húmeda.

Posterior a la incubación se realizaron cuatro lavados con amortiguador 1X de fosfato sodio-potasio 0.1 M, pH 7.4 con 0.05% de Tween 20<sup>®</sup> (Sigma Chemicals, EUA), (PBST), (apéndice III). A las placas se les retiró el exceso de líquido mediante golpes suaves en posición invertida sobre papel toalla.

Seguidamente se colocaron por duplicado cada una de las muestras (100  $\mu$ l por pocillo), más dos pocillos de control positivo para cada virus según se tratara, dos a cuatro de control negativo y dos de amortiguador de extracción. Las placas se dejaron incubar durante toda la noche, a 4 °C en una cámara húmeda. Los controles negativos utilizados fueron tejidos de *Cattleya* previamente verificados para todos los virus, y control negativo certificado de *Cymbidium* de la casa comercial Agdia. Los controles positivos usados para cada virus fueron los suministrados por Agdia.

El lavado se repitió y posteriormente se aplicaron 100  $\mu$ l del anticuerpo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina a los pocillos, diluido en una solución amortiguador para conjugado (apéndice III). Las concentraciones utilizadas fueron las mismas que para los anticuerpos de recubrimiento. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Después se realizó un último proceso de lavado.

Las placas se revelaron con el sustrato para-nitrofenilfosfato (PNP, Sigma Chemicals, EUA), a una concentración final de 1 mg/ml en amortiguador de dietanolamina (Sigma Chemicals, EUA) 1M, pH 9.8. En cada pocillo de la placa (inclusive los blancos) se colocaron 100  $\mu$ l del sustrato.

La absorbancia a 405 nm se midió en un lector para placas de ELISA modelo MRX (Dynex Technologies, EUA) una (para potyvirus) o dos horas después (los demás virus). Se consideraron como positivas todas aquellas muestras cuyo valor de absorbancia promedio fue igual o mayor a la media de los controles negativos más tres desviaciones estándar (Sutula *et al.* 1986).

Para el análisis de ELISA indirecto, las placas se recubrieron con 100  $\mu$ l por pocillo de las muestras maceradas en amortiguador para análisis indirecto, por duplicado, más los controles negativos y positivos. Se utilizaron placas Immunolon 2 HB de Dynex. Las muestras se incubaron en cámara húmeda, toda la noche a 4 °C. Después, se lavaron cuatro veces con amortiguador PBST por 5 minutos cada vez, y se realizó un post-recubrimiento con amortiguador de recubrimiento (apéndice III) con leche en polvo descremada al 3% y albúmina sérica bovina (BSA) al 2%. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente se lavaron de nuevo las placas con el procedimiento descrito anteriormente y se agregó el primer anticuerpo diluido en amortiguador PBST pH 7.4, con polivinilpirrolidona (PVP) al 2% y BSA 0.2%. Para potyvirus se utilizaron anticuerpos de Agdia en una dilución de 1:200, y para CMV los monoclonales producidos por el PCDV en la concentración de extracción, línea celular 9D11F3. Las placas se incubaron toda la noche a 4 °C. Luego, se lavaron las placas cuatro

veces, se añadió el anticuerpo específico conjugado con fosfatasa alcalina diluido en el mismo amortiguador, y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Para potyvirus se utilizó el conjugado con fosfatasa alcalina de Agdia a una dilución de 1:200, y para CMV se utilizó anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido a 1:1000. El sustrato fue el mismo utilizado en el DAS-ELISA.

En el método de TAS-ELISA se recubrieron las placas Immunolon 1 con anticuerpos para CMV de la casa comercial SANOFI (dilución 1:100), se incubó 4 horas a 37 °C; las placas, después de lavarlas cuatro veces con amortiguador PBST, se post-recubrieron 2 horas a 37 °C; las muestras se colocaron en las placas e incubaron toda la noche a 4 °C; como segundo anticuerpo se utilizó el monoclonal de la línea 9D11F3, y las placas se incubaron 4 horas a 37°C; y como tercer anticuerpo se usó un conjugado anti-ratón de Sigma, a la dilución 1:1000, y las placas se incubaron por 2 horas a 37 °C, y por último se aplicó el sustrato PNP, y se leyó dos horas después la absorbancia a 405 nm en el lector MRX. Entre cada paso se realizaron lavados con PBST.

Se aplicó el mismo criterio para determinar las muestras positivas.

#### **4.4 Análisis de muestra por microscopia de luz**

##### **4.4.1 Detección de estructuras fúngicas**

Con el fin de detectar la presencia de hifas y esporas de hongos, se recolectaron tejidos frescos de plantas del vivero B que presentaron comúnmente síntomas necróticos, y se montaron con KOH 1% y tinción de lactofenol azul, Debido a la abundancia de hongos en las plantas de éste vivero (A. V. Lizano

com. pers. 2000), se evitó analizar por ELISA las plantas que presentaron únicamente lesiones típicas de hongos.

#### 4.4.2 Detección de inclusiones virales

Se escogieron dos plantas sintomáticas del vivero A y 15 del vivero B, las cuales no fueron positivas en los ELISA para ninguno de los virus analizados, ni presentaban hongos, y se analizaron por microscopia de luz para inclusiones virales. Las muestras se prepararon según lo recomendado por Christie & Edwardson (1994). Se tomaron trozos de epidermis abaxial, adaxial o ambas, por desprendimiento con una aguja hipodérmica o por abrasión, retirando todo el tejido opuesto a la epidermis con una navajilla y luego con lija de grano 600. En el caso de hojas muy gruesas se hicieron cortes transversales gruesos. Todos los cortes gruesos y piezas de epidermis se conservaron por tres semanas en 2-metoxietanol para decolorar los plastidios, antes de la observación.

Para observar las inclusiones, los tejidos obtenidos se tiñeron con una combinación de anaranjado de calcomina (Calcomine Orange 2RS®, Luxol) y verde Brillante de Luxol (Luxol Brilliant Green BL®, Luxol), conocida como "orange-green" (O-G), que permite el teñido diferencial de las organelas de la planta y las inclusiones que contienen proteínas. También, se utilizó un tinte metacromático, Azure A, que tiñe ácidos nucleicos, ARN color rojo-violeta y ADN azul (Christie & Edwardson 1994).

La tinción O-G se preparó con ocho partes de una solución de 1 mg de Luxol Brilliant Green BL® en 100 ml de 2-metoxietanol, una parte de una solución de 1 mg Calcomine Orange 2RS® en 100ml de 2-metoxietanol y una parte de agua destilada. Con la tinción O-G se tiñó tejido tratado con Triton X-100® al 5% y tejido no tratado. Ambos se dejaron reposar en la solución de 10 a 15 minutos (Christie & Edwardson 1994).

Para la tinción con Azure A se realizó un preparado de 18 partes de una solución de 0.1 mg de Azure A en 100 ml de 2-metoxietanol, más dos partes de una solución de fosfato ácido de sodio hepta-hidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.2 M en agua destilada. Las muestras se tiñeron colocándolas por 15 segundos en microondas a máximo poder, más 5 minutos a temperatura ambiente (Christie & Edwardson 1994).

Las muestras teñidas con ambos tintes se lavaron en etanol 95%. En el caso de la tinción con Azure A el tejido se montó en la resina de montaje Euparal® normal, y para las muestras teñidas con O-G en Euparal "Vert"®. Las observaciones se realizaron en un microscopio de luz Zeiss 25 (Zeiss, Alemania), con lente de inmersión.

## 5. Resultados

Los ELISA realizados para la detección de virus demostraron la presencia de los seis virus analizados (CymMV, ORSV, TRV, CymRSV, TSWV y CMV) y el género viral *Potyvirus* en el vivero B, mientras en el vivero A no se detectaron el CymRSV ni el CMV (Fig. 3 y Cuadro 3). En ambos viveros se encontraron tanto infecciones simples como mixtas de los virus incluidos en la investigación.

Los virus CymMV, ORSV, TRV y así como el género *Potyvirus* fueron los que se detectaron con mayor prevalencia en el estudio en general, tanto en infecciones simples como mixtas (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Frecuencia de aparición de cada uno de los virus detectados en cada vivero y en total.**

Virus	A		B		Total	
	# Plantas	%	# Plantas	%	# Plantas	%
CymMV	12	31.6	57	36.5	69	35.6
Potyvirus	16	42.1	15	9.6	31	16.0
ORSV	3	7.9	20	12.8	23	11.9
TRV	3	7.9	20	12.8	23	11.9
CMV	0	-	18	11.5	18	9.3
TSWV	4	10.5	12	7.7	16	8.2
CymRSV	0	-	14	9.0	14	7.2
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>100.0</b>	<b>156</b>	<b>100.0</b>	<b>194</b>	<b>100.0</b>

### 5.1 Infecciones virales detectadas por ELISA en el vivero A

De las 32 plantas nativas analizadas en el vivero A, diez (31.3%) no presentaron reacción positiva en los ensayos de ELISA, diez resultaron positivas para un virus (31.3%) y 12 (37.4%) para dos o más virus (Fig. 1 y Cuadro 4), en total 68.8% de plantas positivas.

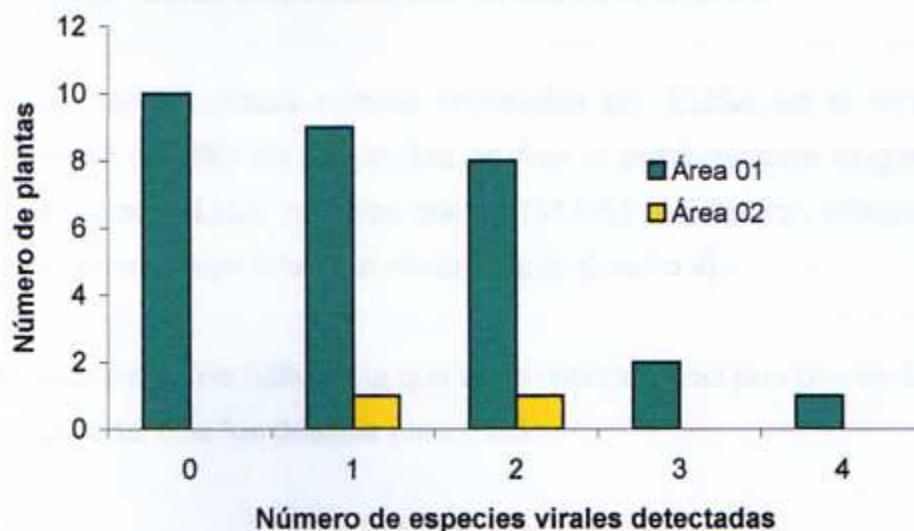


Figura 1. Número de plantas nativas en el vivero A según la cantidad de especies virales detectadas por ELISA y el área donde se encontraron.

De las 16 plantas no nativas, dos plantas del área 01 y 14 plantas de área 02, cuatro no fueron positivas para ninguno de los virus analizados por ELISA; seis presentaron infecciones simples de CymMV, y una con infección con potyvirus; cuatro presentaron infección mixta CymMV-ORSV, y una con infección mixta CymMV-ORSV-TRV.

**Cuadro 4. Porcentajes de infecciones simples y mixtas en plantas nativas evaluadas en ambos viveros.**

N° virus	Vivero A				Vivero B					
	01	02	plantas	%	03	04	05	06	plantas	%
0	10	-	10	31.3	42	7	10	1	60	40.5
1	9	1	10	31.3	20	10	16	5	51	34.5
2	8	1	9	28.1	8	5	2	3	18	12.2
3 ó más	3	-	3	9.4	13	2	2	2	19	12.8
<b>Totales</b>	<b>30</b>	<b>2</b>	<b>32</b>	<b>100</b>	<b>83</b>	<b>24</b>	<b>30</b>	<b>11</b>	<b>148</b>	<b>100.0</b>

## 5.2 Infecciones virales detectadas por ELISA en el vivero B

De las 148 orquídeas nativas analizadas por ELISA en el vivero B se encontró que 60 (40.5%) de las plantas no fueron positivas para ninguno de los virus analizados por ELISA, mientras que 51 (34.5%) presentaron infección simple y 37 (25.0%) presentaron infección mixta (Fig. 2, Cuadro 4).

La única planta no nativa a la que se le realizaron las pruebas de ELISA fue *Coelogyne dayana*, que fue positiva para ORSV.

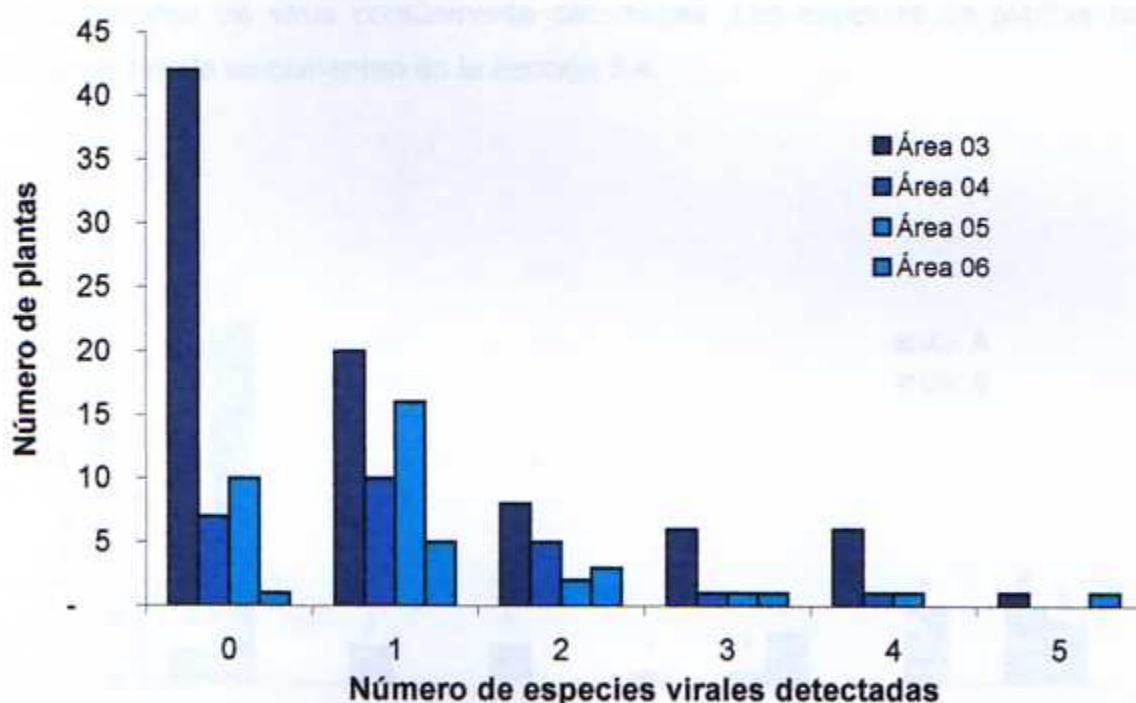


Figura 2. Número de plantas del vivero B según la cantidad de especies virales detectadas por ELISA y el área en donde se encontraron.

## 5.3 Comparación entre viveros

Al comparar las infecciones virales simples encontradas en cada uno de los viveros evaluados se determinó que:

- en el vivero B se encontraron todos los virus evaluados en este estudio,
- en el vivero A sólo se detectó al CymMV, el TSWV y los potyvirus,
- la infección simple más abundante en ambos viveros fue la causada por el CymMV, seguida por los potyvirus en el vivero A y por el CMV en el B.

En la figura 3 se compara el número de plantas encontradas con infección simple en ambos viveros para los diferentes virus, y el cuadro 5 muestra las combinaciones de virus comúnmente detectadas. Las especies de plantas con infección simple se comentan en la sección 5.4.

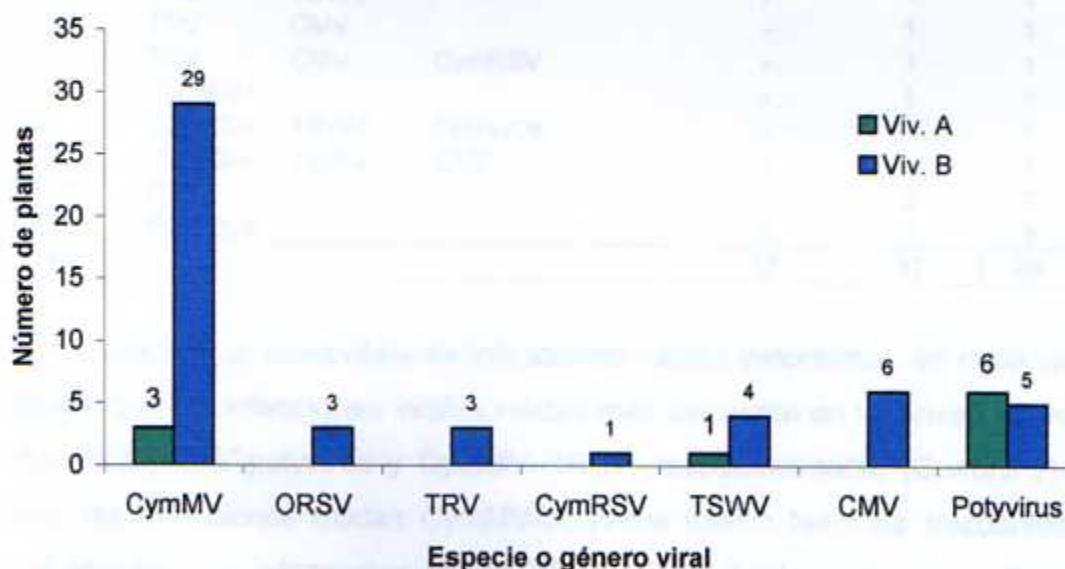


Figura 3. Número de plantas detectadas con infección viral simple por vivero.

En total, en este estudio se detectaron 49 infecciones virales mixtas, 24.5% de éstas en el vivero A. El porcentaje de infecciones mixtas respecto al total de infecciones detectadas en especies nativas para cada vivero fue de 54.5% para el A y 42.0% para el B. Los tipos de infección mixta se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Combinaciones virales encontradas en los viveros A y B.

Combinaciones encontradas				N° Plantas			
				Vivero A	Vivero B	Total	
CymMV	TRV			-	1	1	
CymMV	TSWV			1	-	1	
CymMV	Potyvirus			7	4	11	
CymMV	ORSV			-	6	10	
CymMV	ORSV	Potyvirus		-	2	2	
CymMV	ORSV	TRV		-	2	3	
CymMV	ORSV	TRV	Potyvirus	1	-	1	
CymMV	ORSV	TRV	TSWV	-	1	1	
CymMV	ORSV	TRV	CymRSV	-	2	2	
CymMV	ORSV	TRV	CymRSV	CMV	-	2	2
CymMV	CMV			-	2	2	
CymMV	CMV	TRV		-	1	1	
CymMV	CymRSV	TSWV		-	1	1	
CymMV	CymRSV	TRV		-	1	1	
CymMV	CymRSV	CMV		-	1	1	
CymMV	CymRSV	CMV	TRV	-	1	1	
CymMV	CymRSV	Potyvirus	TRV	-	1	1	
ORSV	TRV	Potyvirus		1	-	1	
ORSV	TRV	TSWV		1	-	1	
ORSV	TRV	CMV		-	1	1	
ORSV	TRV	CMV	CymRSV	-	1	1	
TRV	CymRSV			-	1	1	
TRV	CymRSV	TSWV	Potyvirus	-	1	1	
TRV	CymRSV	TSWV	CMV	-	1	1	
TSWV	CMV			-	2	2	
TSWV	Potyvirus			1	2	3	
<b>Total</b>				<b>12</b>	<b>37</b>	<b>49</b>	

Al comparar el porcentaje de infecciones mixtas detectadas, en cada vivero se obtiene que las infecciones virales mixtas más frecuente en los invernaderos A y B fueron CymMV-potyvirus y CymMV-ORSV, respectivamente (Cuadro 5). En general, las infecciones mixtas CymMV-potyvirus fueron las más frecuentes en todo el estudio. Las infecciones mixtas TSWV-CMV, TSWV-potyvirus y CymMV-CMV, se presentaron en dos ocasiones en el vivero B, y la última, en una oportunidad en el A. Las demás combinaciones dobles se presentaron sólo una vez en uno u otro vivero.

La infección triple más frecuente fue la combinación CymMV-ORSV-TRV, presente una vez en el vivero A y dos veces en el B. La combinación CymMV-

ORSV-potyvirus se encontró dos veces en el vivero B. Otras siete combinaciones de tres virus se detectaron en una sola ocasión, dos de ellas en el vivero A y cinco en el B (Cuadro 5).

Se detectaron ocho infecciones cuádruples; la única que sucedió en dos ocasiones fue la combinación CymMV-ORSV-TRV-CymRSV en el vivero B. La única combinación de cinco virus detectada es semejante a la anterior más el virus CMV, y se presentó en especímenes de *Pleurothallis tonduzii* y *Sobralia* cf. *bradeorum*, la primera en el área 03 y la segunda en la 06.

La ocurrencia de las combinaciones de CymMV-ORSV, más uno o dos virus extra, ocurrió en ocho ocasiones. CymMV-ORSV-TRV con otros virus se detectó en cuatro ocasiones. La combinación CymMV-CymRSV con otros virus se detectó en cinco oportunidades, y ORSV-TRV con otros virus se detectó cuatro veces.

#### 5.4 Síntomas observados en algunas especies con infección viral simple

Se observó que los síntomas más comunes en plantas nativas infectadas con alguno de los virus son el moteado, amarillamiento general o por zonas en las hojas, y el bandeo clorótico. Muy pocas plantas presentaron flores durante la época de recolección de datos y muestreo, y en ningún caso se observó síntomas de jaspeado, necrosis o marchitamiento precoz.

Los síntomas más frecuentes en plantas infectadas por CymMV fueron el moteado, el amarillamiento, el aclaramiento de venas y el bandeo clorótico (Cuadro 6, Fig. 4). En algunos casos se presentaron deformaciones de la lámina foliar, venas engrosadas o ampollado de la hoja. Las diferentes especies de *Pleurothallis* incluidas en el estudio presentaron principalmente moteado; sólo en

un caso se presentó venas engrosadas y en otro, hojas deformes. Sin embargo, algunas especies de este género presentaron otros síntomas, tales como amarillamiento y bandeo clorótico de la hojas, y aclaramiento de venas. En las especies del género *Encyclia* el síntoma común es el amarillamiento de las hojas,

**Cuadro 6. Síntomas observados en las plantas con infección simple de CymMV.**

Especie, variedad o híbrido	Área	Talla y Vigor	Síntoma foliar	Malformación
<i>Brassia gireoudiana</i>	01	Disminuida	Mt N	Acu DL
<i>Cattleya bowringiana</i>	05	Normal, Dism.	Mt Am N	no
<i>Cattleya</i> híbrida	01	Disminuida	Bcl	Veng Acu DL
<i>Chondrorhyncha reichenbachiana</i>	03	Disminuida	Mt Am	Arr
<i>Encyclia cocleatha</i>	05	Normal, Dism.	Mt Ms Am	no
<i>Encyclia</i> sp.	04	Normal, Dism.	Bcl Am Anccl	no
<i>Epidendrum ciliare</i>	01	Disminuida	Am N Bcl	no
<i>Epidendrum</i> sp.	05	Normal	Am mchab	manchas hundidas
<i>Epidendrum summerhayesii</i>	04	Normal	Bcl Mchab	no
<i>Gongora amparoana</i>	06	Normal	Mt Am	no
<i>Lycaste bradeorum</i>	04	Disminuida	Ms Am Bcl	no
<i>Masdevallia</i> sp.	04	Normal	AcIV	no
<i>Maxillaria rodrigueziana</i>	05	Normal	Mt Am N Bcl	Veng Amp
<i>Mesospinidium warszewiczii</i>	03	Normal	Mt N Bcl	Amp
<i>Oncidium inthmi</i>	06	Normal	Mt Am	no
<i>Oncidium klotzschianum</i>	06	Normal	Mt Am N	no
<i>Oncidium</i> sp.	05	Normal	Mt Ms Am	no
<i>Oncidium stenotis</i>	05	Normal	Mt Ms Am N	no
<i>Pleurothallis cardiothallis</i>	05	Normal	Mt Am AcIV Bcl	algunas deformes
<i>Pleurothallis floribunda</i>	05	Normal	Mt N Am AcIV	Acu
<i>Pleurothallis powellii</i>	05	Normal	Mt N AcIV	Veng
<i>Pleurothallis volcanica</i>	03	Disminuida	Mt N Bcl	no
<i>Prescottia</i> sp.	03	Normal, Dism.	Am Mt	borde deforme
<i>Prosthechea prismatocarpa</i>	04	Normal	Mt N Bcl Am	DL
<i>Scaphyglottis bifida</i>	05	Normal	Mt Bcl Am ápice	Veng
<i>Scaphyglottis imbricata</i>	06	Normal	Mt Am	no
<i>Scaphyglottis micrantha</i>	03	Normal	N Am	no
<i>Scaphyglottis</i> sp.	03	Normal	Mt	no
<i>Trichopilia marginata</i>	05	Normal	Am Bcl AcIV	Veng
<i>Zootrophion</i> sp.	03	Normal	Mt Mcham	no

**Nota:** AcIV = aclaramiento venas; Acu = acucharamiento; Am = amarillamiento; Amp = ampollado; Anccl = anillos cloróticos; Bcl = bandeo clorótico; DL = disminución de la lámina foliar; Dism. = disminuida; Mchab = manchas blancas; Mcham = manchas moradas; Ms = mosaico; Mt = moteado; N = necrosis; Veng = venas engrosadas.

acompañado de moteado y otros síntomas cloróticos. En las especies de *Epidendrum* se encontraron bandeados cloróticos, amarillamientos y algunas manchas blancas en las hojas. En todos los *Oncidium* sintomáticos se hallaron moteados, amarillamientos y mosaicos. En el género *Scaphyglottis* se observaron diferentes combinaciones de síntomas en cada especie evaluada. En general, cuando se presentaron deformaciones en la lámina foliar, los síntomas cloróticos fueron más severos, en especial en hojas jóvenes.

Las plantas infectadas con ORSV mostraron variación en la combinación de síntomas, que incluyen moteado, mosaico, bandedo clorótico, amarillamiento de las hojas y aclaramiento de venas (Cuadro 7, Fig. 5 A-B). *Coelogyne dayana* fue la única especie foránea muestreada en el vivero B, y la única planta en presentar arrugamiento en los bordes de algunas hojas, además del bandedo clorótico y el aclaramiento de las venas.

**Cuadro 7. Síntomas observados en las plantas con infección simple de ORSV.**

Especie, variedad o híbrido	Área	Talla y Vigor	Síntoma foliar	Malformación
<i>Coelogyne dayana</i>	05	Normal	Bcl AcIV	Arr bordes
<i>Encyclia alata</i>	04	Normal, Dism.	Mt Bcl	no
<i>Lycaste dowiana</i>	04	Normal, Dism.	Mt Am N	Amp
<i>Warszewiczella discolor</i>	05	Diminuida	Ms N Bcl	no

**Nota:** AcIV = aclaramiento venas; Am = amarillamiento; Amp = ampollado; Arr = arrugamiento; Bcl = bandedo clorótico; Ms = mosaico; Mt = moteado; N = necrosis.

En las plantas infectadas con TRV, el síntoma común fue el moteado, acompañado de amarillamiento en *Sobralia fragans* y *Pleurothallis eumecocaulon* (Cuadro 8, Fig. 5 C-D). En *S. fragans* también se observó deformación de la lámina foliar y bandedo clorótico.

**Cuadro 8. Síntomas observados en las plantas con infección simple de TRV.**

<b>Especie, variedad o híbrido</b>	<b>Área</b>	<b>Talla y Vigor</b>	<b>Síntoma foliar</b>	<b>Malformación</b>
<i>Maxillaria brunnea</i>	03	Normal, Dism.	Mt	no
<i>Pleurothallis eumecocaulon</i>	03	Normal	Mt Am N	no
<i>Sobralia fragans</i>	03	Disminuida	Mt N Am Bcl	Amp punta deforme

**Nota:** Am = amarillamiento; Amp = ampollado; Bcl = bandeado clorótico; Mt = moteado; N = necrosis.

Los síntomas más comunes observados en las plantas infectadas por TSWV fueron el moteado y el amarillamiento; en algunos casos también se observó bandeado clorótico (Cuadro 9, Fig. 5 E-F). Además, en cuatro de las cinco plantas infectadas por este virus se observaron venas engrosadas, y en un caso, acucharamiento de la hoja.

**Cuadro 9. Síntomas observados en las plantas con infección simple de TSWV.**

<b>Especie, variedad o híbrido</b>	<b>Área</b>	<b>Talla y Vigor</b>	<b>Síntoma foliar</b>	<b>Malformación</b>
<i>Brassia gireoudiana</i>	04	Normal	Mt mchab Am N	hojas dobladas
<i>Cattleya skinneri</i>	01	Normal, Dism.	Am general	Acu
<i>Cattleya sp.</i>	05	Normal, Dism.	Mt Am N	Veng DL
<i>Stelis sp.</i>	03	Normal	Mt Am Bcl	Veng
<i>Trichopilia sp.</i>	03	Normal, Dism.	Mt N Bcl	no

**Nota:** Mt = moteado; N = necrosis; Am = amarillamiento; Bcl = bandeado clorótico; mchab = manchas blancas; Veng = venas engrosadas; Acu = acucharamiento; DL = disminución de la lámina foliar.

Las plantas infectadas por potyvirus presentaron en su mayoría moteados, y algunas bandeados cloróticos (Cuadro 10, Fig. 6 B-D).

Cuadro 13, continuación.

Género o especie	Vivero	Informe nuevo
<i>Sobralia cf. bradeorum</i>	B	GE
<i>Stelis imraei</i>	B	E
<i>Trichopilia marginata</i>	B	E
<i>Zootrophion sp.</i>	B	G

Nota: \* = indica especie endémica para Costa Rica; E = especie; G = género.

Cuadro 14. Géneros y especies de orquídeas nativas: nuevos informes de infección de ORSV.

Género o especie	Vivero	Informe nuevo
<i>Arpophyllum giganteum</i>	B	E
<i>Encyclia alata</i>	B	E
<i>Epidendrum piliferum</i>	B	E
<i>Lycaste brevispatha</i>	B	E
<i>Lycaste dowiana</i>	B	E
<i>Lycaste macrophylla</i>	B	E
<i>Maxillaria brunnea</i>	B	E
<i>Maxillaria obscura</i>	B	E
<i>Maxillaria ringens</i>	B	E
<i>Mormodes sp.</i>	A	G
<i>Oncidium bracteatum</i>	B	E
<i>Pleurothallis bothros</i>	B	E
<i>Pleurothallis racemiflora</i>	B	E
<i>Pleurothallis tonduzii</i>	B	E
<i>Prosthechea ionocentra</i>	B	GE
<i>Scaphyglottis prolifera</i>	B	E
<i>Sobralia cf. bradeorum</i>	B	GE
<i>Sobralia sp.</i>	A	G

Nota: E = especie; G = género.

**Cuadro 15. Géneros y especies de orquídeas nativas: nuevos informes de infección de TRV.**

Género o especie	Vivero	Informe nuevo
<i>Elleanthus tonduzii</i>	B	GE
<i>Epidendrum piliferum</i>	B	GE
<i>Maxillaria brunnea</i>	B	GE
<i>Maxillaria ctenostachya</i>	B	GE
<i>Maxillaria obscura</i>	B	GE
<i>Mormodes</i> sp.	A	G
<i>Oncidium bracteatum</i>	B	GE
<i>Pleurothallis bothros</i>	B	GE
<i>Pleurothallis dentipetala</i>	B	GE
<i>Pleurothallis eumecocaulon</i>	B	GE
<i>Pleurothallis tonduzii</i>	B	GE
<i>Prosthechea ionocentra</i>	B	GE
<i>Sobralia</i> cf. <i>bradeorum</i>	B	GE
<i>Sobralia fragans</i>	B	GE
<i>Sobralia</i> sp.	A	G
<i>Stelis imraei</i>	B	GE

Nota: E = especie; G = género.

**Cuadro 16. Géneros y especies de orquídeas nativas: nuevos informes de infección de CymRSV.**

Género o especie	Vivero	Informe nuevo
<i>Elleanthus caricoides</i>	B	GE
<i>Elleanthus tonduzii</i>	B	GE
<i>Maxilaria brunnea</i>	B	GE
<i>Maxilaria ctenostachya</i>	B	GE
<i>Pleurothallis bothros</i>	B	GE
<i>Pleurothallis tonduzii</i>	B	GE
<i>Sobralia</i> cf. <i>bradeorum</i>	B	GE
<i>Stanhopea</i> sp.	B	G
<i>Stelis imraei</i>	B	GE
<i>Stenorrhinchos speciosum</i>	B	GE

Nota: E = especie; G = género.

**Cuadro 17. Géneros y especies de orquídeas nativas: nuevos informes de infección de TSWV.**

Género o especie	Vivero	Informe nuevo
<i>Brassia gireoudiana</i>	B	GE
<i>Elleanthus caricoides</i>	B	GE
<i>Maxillaria ringens</i>	B	GE
<i>Maxillaria</i> sp.	B	G
<i>Mormodes</i> sp.	A	G
<i>Pleurothallis loranthophylla</i>	B	GE
<i>Pleurothallis</i> sp.	B	G
<i>Scaphyglottis bidentata</i>	B	GE
<i>Stanhopea</i> sp.	B	G
<i>Stelis</i> sp.	B	G
<i>Trichopilia</i> sp.	B	G
<i>Trichosalpinx blaisdelli</i>	B	GE

Nota: E = especie; G = género.

**Cuadro 18. Géneros y especies de orquídeas nativas: nuevos informes de infección de potyvirus.**

Género o especie	Vivero	Informe nuevo
<i>Amparoa costarricensis</i>	B	GE
<i>Cattleya dowiana</i>	A	GE
<i>Cattleya</i> híbrida	A	GE
<i>Cattleya skinneri</i>	A	GE
<i>Elleanthus caricoides</i>	B	GE
<i>Elleanthus tonduzii</i>	B	GE
<i>Epidendrum firmum</i>	A	GE
<i>Epidendrum parkinsonianum</i>	A	GE
<i>Epidendrum stanfordianum</i>	B	GE
<i>Maxillaria ramonensis</i>	B	GE
<i>Octomeria valerioi</i>	B	GE
<i>Oerstedella centropetala</i>	B	GE
<i>Oncidium schroederianum</i>	B	GE
<i>Otoglossum globuliferum</i>	B	GE
<i>Prosthechea pygmaea</i>	B	GE
<i>Rhynchostele hortensiae</i>	B	GE
<i>Scaphyglottis prolifera</i>	B	GE
<i>Sobralia</i> sp.	B	GE
<i>Trichosalpinx blaisdellii</i>	B	GE

Nota: E = especie; G = género.

**Cuadro 19. Géneros y especies de orquídeas nativas: nuevos informes de infección de CMV.**

Género o especie	Vivero	Informe nuevo
<i>Brassia arcuigera</i>	B	GE
<i>Cattleya skinneri</i>	B	GE
<i>Maxillaria brunnea</i>	B	GE
<i>Maxillaria inaudita</i>	B	GE
<i>Pescatorea cerina</i>	B	GE
<i>Pleurothallis cardiotallis</i>	B	GE
<i>Pleurothallis dentipetala</i>	B	GE
<i>Pleurothallis loranthophylla</i>	B	GE
<i>Pleurothallis</i> sp.	B	G
<i>Pleurothallis tonduzii</i>	B	GE
<i>Prosthechea ionocentra</i>	B	GE
<i>Scaphyglottis bidentata</i>	B	GE
<i>Sobralia</i> cf. <i>bradeorum</i>	B	GE
<i>Stelis imraei</i>	B	GE
<i>Stelis spathulata</i>	B	GE
<i>Warscewiczella discolor</i>	B	GE

Nota: E = especie; G = género.

## 5.6 Resultados de microscopia de luz

### 5.6.1 Análisis para detección de estructuras fúngicas

En el Cuadro 19 se detallan las especies de orquídeas, el área de recolección, y una descripción breve de las lesiones encontradas en cada una de las plantas evaluadas. En todos los casos se observaron hifas y esporas al utilizar tinción de lactofenol azul y observar al microscopio a 1000 X. Las hifas se observaron incluso a 400 aumentos.

**Cuadro 20. Plantas infectadas con hongos analizadas por microscopia de luz.**

Especie de orquídea	Área	Descripción de necrosis
<i>Epidendrum stanfordianum</i>	05	Masiva, negro marrón.
<i>Masdevallia reinchebachiana</i>	03	Adaxiales y abaxiales pequeñas y abundantes, negras
<i>Oncidium bracteatum</i>	06	manchas negras en estrías
<i>Oncidium sp.</i>	03	Adaxiales grandes (>3 cm) e irregulares, hundidas entre negras y marrón, abaxiales pequeñas de aproximadamente 1 mm, negras.
<i>Pleurothallis bothros</i>	03	Pequeñas manchas negras en ambos lados de la hoja, relacionadas con manchas moradas
<i>Pleurothallis cardiothallis</i>	05	Adaxiales anulares hundidas marrón, abaxiales pequeñas y abundantes, negras.
<i>Pleurothallis floribunda</i>	05	Apice necrosado (negro) y seco
<i>Stelis imraei</i>	03	Abaxiales pequeñas (1 mm) redondeadas y negras, adaxiales irregulares profusas, negro-marrón.
<i>Stelis spathulata</i>	03	Abaxiales pequeñas, abundantes, negras
<i>Sthanopea sp.</i>	03	Adaxiales medianas negras

### 5.6.2 Detección de inclusiones virales

La única planta en la que se identificó claramente la presencia de inclusiones virales fue una *Pleurothallis fulgens*, encontrada en el área 03 (vivero B). En ésta se observaron inclusiones tipo cristales agregados teñidas con Azure A de color morado oscuro en cortes transversales de mesófilo y epidermis (Fig. 7).

La lista de las plantas analizadas para la detección de inclusiones virales se encuentra en el apéndice VI.

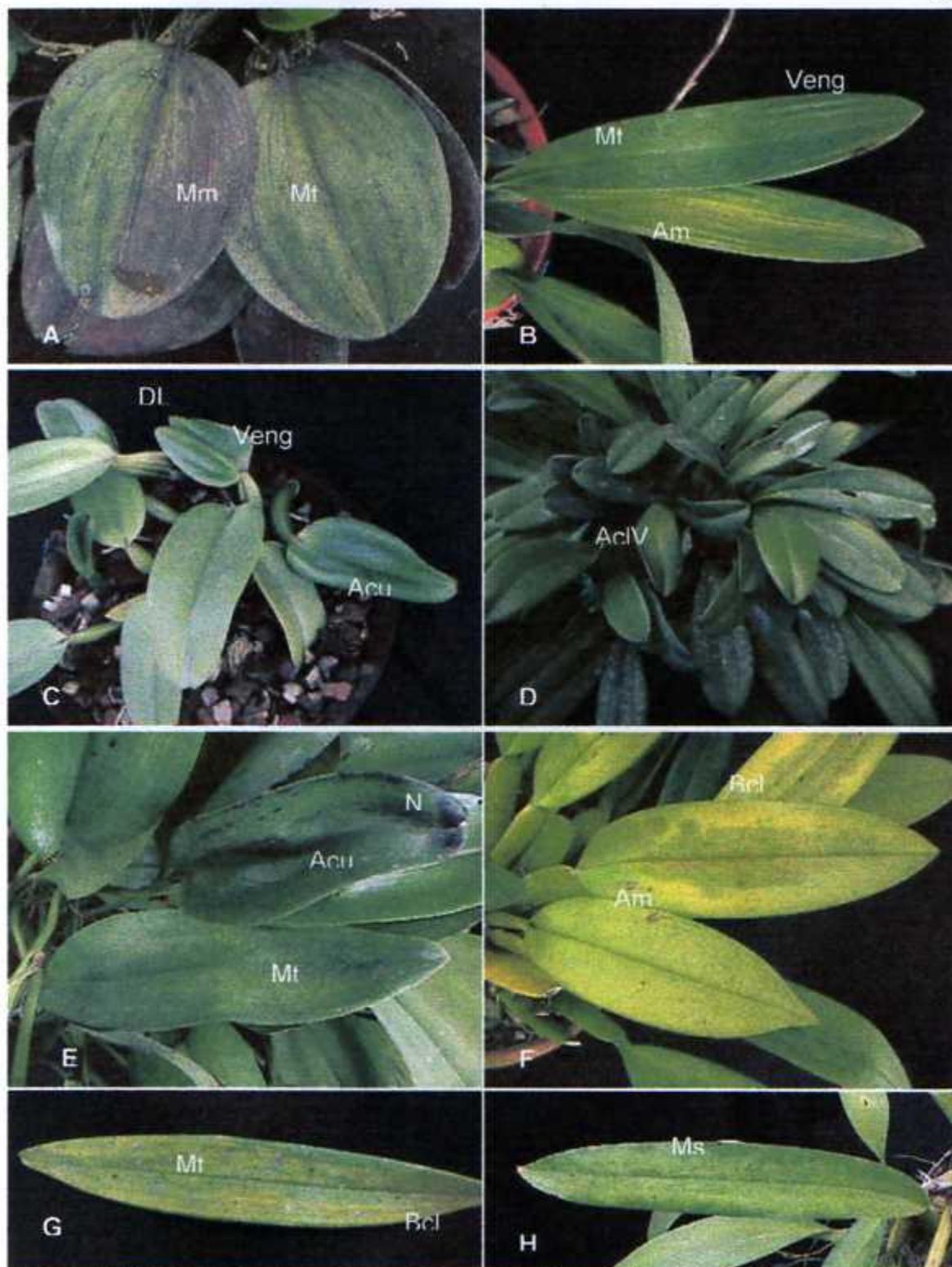


Figura 4. Diferentes síntomas observados en infección simple de CymMV en orquídeas de especies nativas de Costa Rica. A) *Zootrophion* sp. B) *Oncidium* sp. C) *Cattleya* híbrida. D) *Masdevallia* sp. E) *Pleurothallis floribunda*. F) *Trichopilia marginata*. G) *Prosthechea prismatocarpa*. H) *Oncidium stenotis*. Nota: Acl = aclaramiento de venas; Am = amarillamiento; Bcl = bandeado clorótico; DL = deformación lámina foliar; Mm = manchas moradas; Mt = moteado; Ms = mosaico; N = necrosis; Veng = venas engrosadas.

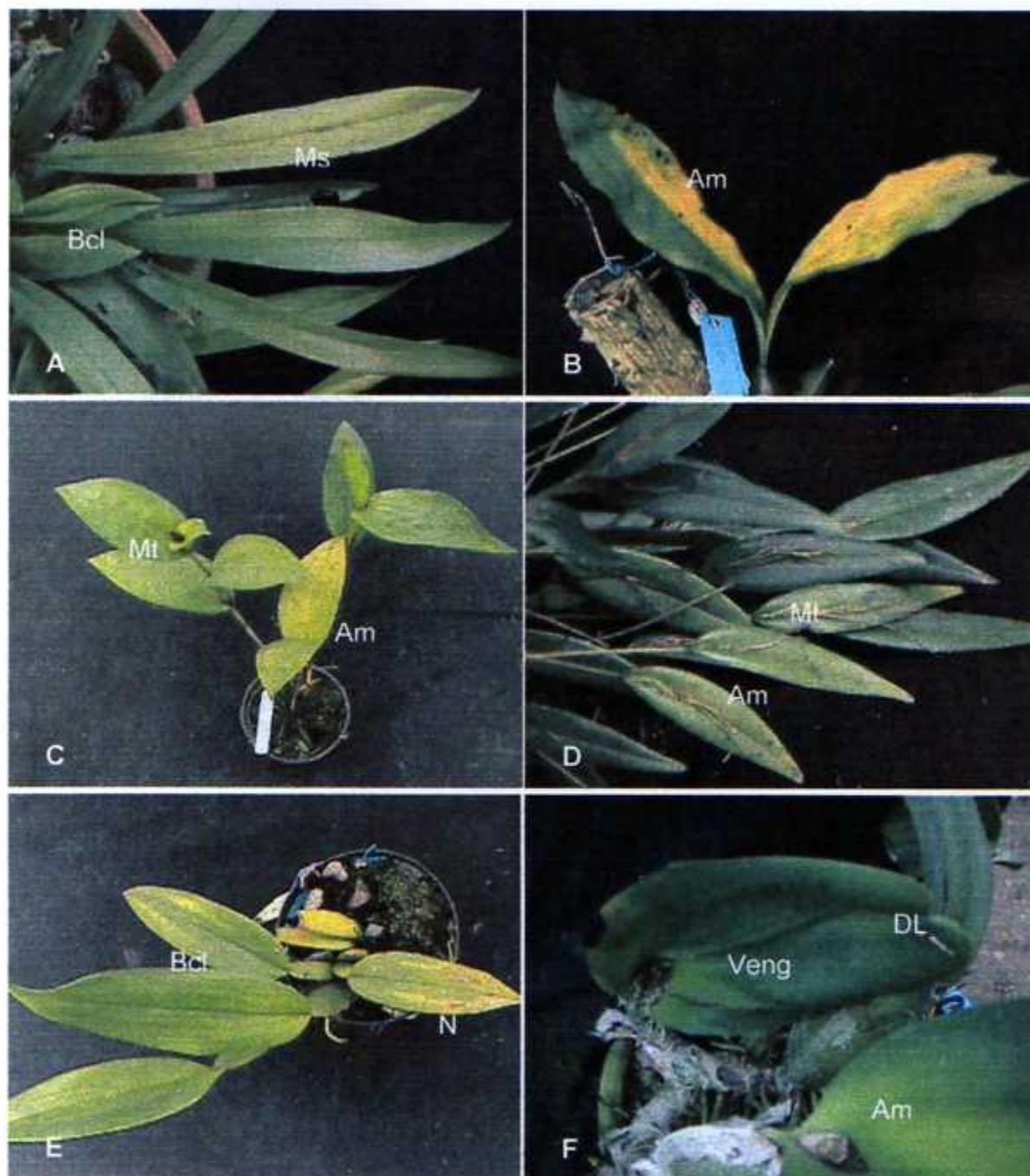


Figura 5. Síntomas inducidos por infecciones virales simples de ORSV (A y B), TRV (C y D) y TSWV (E y F) en algunas orquídeas de especies nativas. A) *Warscewiczella discolor*. B) *Lycaste dowiana*. C) *Sobralia fragans*. D) *Pleurothallis eumococaulon*. E) *Trichopilia* sp. F) *Cattleya* sp. Nota: Am = amarillamiento; Bcl = bandeado clorótico; DL = deformación lámina foliar; Ms = mosaico; Mt = moteado; N = necrosis; Veng = venas engrosadas.



Figura 6. Síntomas inducidos por infecciones virales simples de CymRSV (A), potyvirus (B, C y D) y CMV (E y F) en algunas orquídeas de especies nativas. A) *Stenorrhynchos speciosum*. B) *Encyclia pigmea*. C) *Cattleya skinneri*. D) *Oncidium schroederianum*. E) *Stelis spathulata*. F) *Pescatorea cerina*. Nota: Am = amarillamiento; Bcl = bandeado clorótico; Mt = moteado.

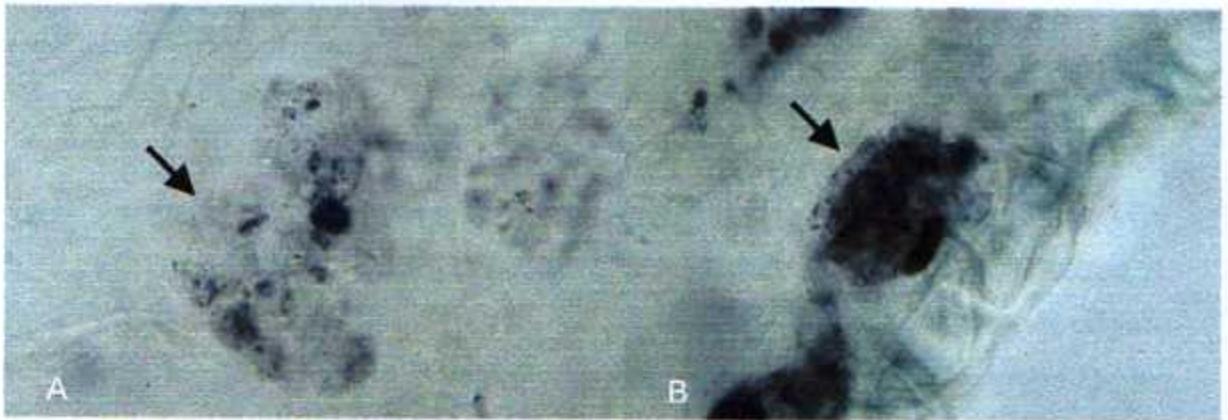


Figura 7. Inclusiones virales encontradas en *Pleurothallis fulgens* por microscopia de luz a 1000 X. A) inclusiones en mesófilo; B) inclusiones en epidermis.

## 6. Discusión y conclusiones

En este estudio se identificaron los virus CymMV, ORSV, CymRSV, TRV TSWV, CMV y el género *Potyvirus*, en al menos uno de los viveros analizados. Como mencionaran Zettler *et al.* (1990) y Hu *et al.* (1993), estos virus y el género viral detectados, se han encontrado anteriormente en orquídeas mantenidas en invernaderos.

En Costa Rica sólo el CymMV había sido informado con anterioridad en *Phaius tankervilleae* (Moreira *et al.* 1999) e híbridos de *Cattleya* (Velasco *et al.* 1986). Ninguna de estas orquídeas es nativa. En el ámbito mundial, se reconoce que los virus CymMV y ORSV son los virus más comúnmente encontrados afectando orquídeas en invernadero (Zettler *et al.* 1990, Lawson 1995).

Los virus CMV, TSWV y el potyvirus BYMV han sido detectados en orquídeas en otros países; sin embargo, en Costa Rica se han informado anteriormente en otros cultivos (Rivera *et al.* 1990 y 1991), y no en orquídeas. Los virus CymRSV y TRV son informados por primera vez en el país en este estudio.

Los potyvirus son el género de virus de plantas más grande que se conoce: cuentan con casi 180 especies que infectan a un amplio ámbito de especies vegetales (Shukla *et al.* 1994). Al menos ocho potyvirus se han reconocido infectando orquídeas (Zettler *et al.* 1990, Lawson 1995). Debido a que en este estudio se empleó un anticuerpo general que permite detectar a un amplio grupo de especies del género *Potyvirus*, éstos son informados como bloque, y no se conoce cuáles especies virales están presentes en los viveros analizados (Fig. 3 y Cuadro 5). Esto abre un nuevo frente de estudio para reconocer si los potyvirus encontrados corresponden a BYMV, *Dendrobium mosaic potyvirus* (DeMV), CYVC-C, *Cypripedium filamentous potyvirus*, *Turnip mosaic potyvirus*, *Vanilla mosaic*

*potyvirus*, *Calanthe mosaic potyvirus* o *Caretobium mosaic potyvirus*, o si hay otras especies de este género viral que afectan las orquídeas en el país.

Como se observa en la figura 3, en el vivero B se detectaron más especies virales que en el A. La abundancia de plantas, las condiciones en que son mantenidas, y el origen de éstas, son diferentes para cada uno de los viveros, diferencias que podrían estar influyendo en la cantidad de especies virales presentes en cada vivero.

Las colecciones de los dos viveros en los que se desarrolló el estudio, contienen tanto plantas nativas, como especies e híbridos introducidos. En el caso del vivero A, la colección principal de plantas madres se estableció en 1989, formada principalmente por especies e híbridos extranjeros y posteriormente en el vivero se introdujeron especies nativas. En este vivero, la mayoría de las plantas no nativas ingresaron desde Taiwán durante la década de 1990, pero también se cuenta con otras adquiridas en el país a importadores o coleccionistas privados.

La colección del vivero B, se inició entre los años 1940 y 1950 como colección privada, y contienen tanto especies nacionales como introducidas, y gran cantidad de híbridos. Además, se encontraron muchas orquídeas que ingresaron a la colección en las décadas de 1980 y 1990, y provenían directamente de diferentes partes de América Latina, Asia y África, o fueron donadas o canjeadas por coleccionistas privados que las habían importado tiempo atrás.

Actualmente, muchos de los especímenes presentes en las colecciones de ambos viveros son producto de donaciones, intercambio con otros coleccionistas, decomisos y algunas compras. Las plantas decomisadas recibidas provienen de los llamados "materos", y el vivero B es el que mayor cantidad de plantas ha recibido por este concepto.

Esta breve descripción de la manera cómo se han conformado las colecciones de los viveros A y B, permite comprender porque en el estudio (Cuadro

2) se incluyeron algunas especies que no son nativas, cuando el fin principal de esta investigación era evaluar si los virus seleccionados afectaban las especies nativas presentes en ambos viveros.

Conociendo que en el país se encuentra un grupo considerable de coleccionistas y comercializadores de orquídeas, que han importado orquídeas de diferentes partes del mundo, la mayoría de las veces sin ninguna precaución cuarentenaria, sumado al intercambio y venta de especies e híbridos que se produce entre coleccionistas y público en general, era de esperar que los virus CymMV y ORSV se encontraran presentes en las colecciones de los viveros en estudio, y pueden haber ingresado a éstas mediante plantas contaminadas.

Los potyvirus detectados en este estudio, pueden haber ingresado a las colecciones mediante material contaminado proveniente del campo, y pudieron posteriormente ser dispersados en la colección, por áfidos, o mecánicamente por el uso de herramientas contaminadas. Hamon (1995) informó que los áfidos *Aphis gossypii* y *Sitobion luteum* son plagas de orquídeas. Ambas especies se encuentran en Costa Rica (Voegtlin & Rivera 2002, en preparación), pero no se ha comprobado si estos áfidos están transmitiendo estos virus en orquídeas en el país. En ninguno de los dos viveros en que se desarrollaron las evaluaciones de las colecciones, se cuenta con malla anti-áfidos. Además, en una ocasión algunos áfidos fueron encontrados en dos plantas de *Masdevallia* spp. en el vivero 03, aunque no se les pudo identificar por no encontrar adultos alados.

Dado que son varios los potyvirus informados como patógenos de orquídeas, y al no contar con la información de cuáles son las especies virales y las plantas hospederas reservorios que hay presentes en el país, además de la posible transmisión por áfidos, el problema aún no se puede cuantificar ni definir el nivel de riesgo, por lo que se recomienda que estos puntos sean tratados esuturas investigaciones.

Aunque la mayoría de las orquídeas son epífitas (Dressler 1981) y en las colecciones son mantenidas atadas a pequeños troncos o bien en macetas o canastas con sustratos sin tierra (Rittershausen & Rittershausen 2001), la presencia de virus transmitidos por nematodos en orquídeas (que no se encuentren sembradas en tierra) podría ser considerada extraña. Los virus *Tomato ringspot nepovirus* (ToRSV) y el TRV han sido informados afectando orquídeas y son transmitidos por nematodos (Lawson 1995). El TRV es transmitido principalmente por nematodos del orden Dorylaimida (Zettler et al. 1987, Lawson 1995); sin embargo, también puede transmitirse por medios mecánicos (Zettler et al. 1987, Lawson 1995), de tal manera que el uso de sustratos, potes y herramientas de siembra contaminados, podrían ser las causas de la presencia de este virus en las colecciones estudiadas.

En este estudio el TRV se encontró en infección simple solamente en el vivero B (Fig. 3) y en ambos viveros en infecciones mixtas (Cuadro 5). En el vivero A (rara vez en el B) en ocasiones uno de los componentes del sustrato, empleado es la cáscara de "coquito", que antes de emplearlo como medio de siembra, se mezcla con tierra y permanece a la intemperie durante un tiempo variable para permitir que los microorganismos degraden los aceites remanentes. Posteriormente a este proceso, los "coquitos" se lavan con agua, pero ésto no asegura la eliminación de posibles infecciones con nematodos. En ambos viveros se observaron plantas de la orquídea terrestre del género *Sobralia* sp., que fueron positivas para TRV (apéndices IV y V), sembradas fuera de los invernaderos. Podría considerarse que estas plantas adquirieron el TRV en estos sitios, y posteriormente lo introdujeron a la colección mediante la contaminación de los instrumentos de poda. Cabe también la probabilidad de que estas plantas de *Sobralia* sp. pudieron encontrarse contaminadas antes del ingreso a los viveros, ya fuera en los ambientes naturales o en las colecciones de donde provinieron. Zettler et al. (1994) mencionan que se espera que TRV no constituya un problema importante en el cultivo de orquídeas, debido a que la mayoría de los cultivos se realizan en medios especiales sin suelo, en los cuales los nematodos no pueden establecer grandes

poblaciones (Zettler *et al.* 1987). La diseminación mecánica puede ser más efectiva, lo que podría ser la responsable por el 11.9 % del total de las plantas que se hallaron infectadas en este estudio (Cuadro 3).

Las seis especies y el género viral incluidos en este estudio se transmiten fácilmente por medios mecánicos (Cuadro 1, Zettler *et al.* 1990, Hu *et al.* 1998), por lo que dentro de las colecciones pudieron pasar de una planta a otra por mal manejo, por desconocimiento o métodos inefectivos de desinfección de los instrumentos de poda.

Por otro lado, no hay informes certeros de que los virus que afectan orquídeas se transmitan a través de semilla, aunque se ha informado que es posible infectar las plántulas con material materno contaminado (Yuen *et al.* 1979, Porter *et al.* 1996). En ambos viveros se practica el cultivo de semillas, pero no se han evaluado las prácticas utilizadas, a fin de determinar si la contaminación con material materno podría ser la fuente potencial del inóculo. Es importante determinar cuál(es) especie(s) de potyvirus infectan las orquídeas en los viveros en estudio, y cuáles de estos virus son transmitidos por semilla, ya que se ha informado que BYMV y DeMV se transmiten por este método, al menos en ensayos en Fabaceae (Shukla *et al.* 1994). De los virus evaluados en este estudio, también son transmitidos por semilla el CMV y el TRV, por lo que aumenta la lista de riesgo, aunque se carece de información exacta de su transmisión en orquídeas por este medio (Mink 1993).

Los resultados indican que el orden de prevalencia de los virus evaluados en este estudio, en términos generales, es el siguiente: CymMV, potyvirus, ORSV-TRV, CMV, TSWV, CymRSV (Cuadros 3-5). CymMV es el virus más frecuentemente encontrado, lo cual coincide con lo informado por otros estudios (Zettler *et al.* 1990, Lawson 1995, Lawson & Hsu 1995, Geraci 1996). El ORSV es el segundo virus más prevalente en el mundo, sin embargo, en este estudio cuenta con el tercer lugar, después de los potyvirus.

Hay muy poca información publicada con respecto a los síntomas foliares inducidos por virus en orquídeas; la mayoría se ha orientado a los síntomas en las flores. El valor comercial de las orquídeas está ligado a la calidad floral, y muy probablemente se considere que si no hay efecto sobre éstas, la infección no es de importancia (Lawson 1995). Por otra parte, la mayoría de la información disponible sobre este tema se centra en las especies e híbridos de flores e inflorescencias vistosas. En esta investigación se observó la mayoría de los síntomas en hojas, y en las pocas ocasiones en que se observó floración, las flores no presentaron síntomas.

Las plantas con infección viral simple son las que permiten la descripción de los síntomas inducidos por el virus en cada especie vegetal particular, debido a que una combinación de virus puede producir síntomas diferentes o agravados con respecto a las infecciones simples (Walkey 1985, Matthews, 1992, Lawson 1995). Para la descripción de los síntomas, lo ideal es contar con un número considerable de plantas de la misma especie con el mismo tipo de infección. Uno de los objetivos planteados en este estudio era la descripción de síntomas para las especies virales detectadas. Este objetivo no pudo cumplirse debido a que la cantidad de plantas con infección simple fue muy baja (Fig. 3 y Cuadro 4). Aunque con la muestra presente no se puede afirmar una correlación entre los síntomas observados en cada especie o género de orquídea con un virus en particular, debido a la falta de repeticiones, en la mayoría de los casos, los síntomas son clorosis típicas que variaron en intensidad y patrón en los casos evaluados. Por otra parte, especialistas como Jensen & Gold (1955) y Corbett (1967) mencionaron que existe gran variabilidad de los síntomas entre especies de orquídeas infectadas por virus (en especial CymMV y ORSV).

En este estudio, debido a la abundancia de hongos (principalmente en el vivero B), los síntomas de necrosis son inciertos de asignar como responsabilidad de los virus, ya que éstas se presentan como reacción hipersensible de las plantas

a la invasión de distintos patógenos (Culver *et al.* 1991, Ohtsubo *et al.* 1999). Se requiere más tiempo de observación de las plantas con la infección identificada y estudios histológicos para establecer si existe relación entre las infecciones virales y los síntomas necróticos observados.

Aunque los virus CymMV y ORSV son reconocidos por inducir síntomas con un patrón definido en algunas especies de orquídeas, la variación de éstos entre especies y géneros incluidos en este estudio, implica posibles diferencias de susceptibilidad de éstas a los virus (Hu *et al.* 1994, Lawson 1995).

La única planta con infección simple de CymRSV detectada aquí (Fig. 6:A), muestra un síntoma típico informado para esta especie: el moteado (Hollings *et al.* 1977). El CymRSV presentó muy baja frecuencia en el vivero B, sólo en una planta en forma simple y 13 en infección mixta (Cuadros 3 y 4).

Los síntomas observados en las infecciones por potyvirus fueron muy similares entre plantas (Cuadro 10 y Fig. 6 B-D), pero a falta de identificación de cada virus particular y de más repeticiones, no se puede aseverar que los síntomas cumplan un patrón. Hu *et al.* (1993) encontraron dificultades y no pudieron determinar cuál o cuáles eran los potyvirus encontrados en su estudio, aunque probaron anticuerpos específicos para nueve diferentes potyvirus. En el caso de dos plantas de *Cattleya skinneri* con variación en los síntomas puede tratarse de infecciones causadas por diferentes especies virales o por diferencias en el tiempo o momento de infección entre ambas (Cuadro 10). Las probabilidades son múltiples, pero el BYMV y el DeMV, inducen síntomas de moteados (Hammond & Lawson 1988), por lo que serían potenciales especies para identificar. Se requiere de mayor número de repeticiones para asegurar si el arrugamiento en la base de las hojas de *Trichopilia*, detectadas con infección de potyvirus, se debe a la infección viral, o esté relacionado con cambios de temperatura o humedad, o se deba a defectos genéticos, según la opinión de especialistas en el cultivo de orquídeas (Sheehan 1995, Rittershausen & Rittershausen 2001).

Se ha informado poco acerca de géneros de orquídeas afectados por el CMV, entre ellas *Calanthe*, *Dendrobium*, *Miltonia* y *Phalaenopsis* (Ko 1988, Lawson 1995, Lawson & Hsu 1995). Sin embargo, no debe extrañar la gran cantidad de especies nuevas infectadas, encontradas en este estudio, si se considera que este virus es uno de los que a nivel mundial se encuentra más ampliamente distribuido y que afecta a gran cantidad de especies vegetales. Las plantas de diferentes especies infectadas por CMV detectadas, presentaban síntomas cloróticos similares, pero con diferente intensidad entre especies (Cuadro 11 y Fig. 6 E-F). Por otra parte, el CMV, es transmitido por áfidos y ésta es una posible manera en que llegó a las colecciones.

En cuanto a las plantas con infecciones múltiples detectadas, no se observaron mayores diferencias respecto al estado general y síntomas presentados por las plantas con infecciones simples; es común para ambas condiciones la variabilidad de síntomas observados, aunque sería lógico esperar, que las infecciones múltiples produzcan síntomas más fuertes que las infecciones simples, como mencionan Zettler *et al.* (1990) y Lawson (1995).

Debido a que la mayoría de la literatura referente a infecciones virales en orquídeas mencionan principalmente géneros y no las especies analizadas (Lawson & Brannigan 1975, Zettler *et al.* 1978 y 1990, Hu *et al.* 1993, Brunt *et al.* 1996, Elliot *et al.* 1996, Freitas-Astua *et al.* 1999), es difícil establecer los casos reales de nuevos informes, a nivel de especie, de infección de los virus en estudio. En este trabajo se encontraron 150 posibles nuevos casos de infección viral en orquídeas, ya sea a nivel de especie, de género o ambos, según se logró determinar; lamentablemente, existen muy pocas repeticiones para cada caso particular.

La mayor cantidad de nuevos informes, tanto de especies como géneros, corresponden al vivero B (135 casos), debido al mayor número de plantas de especies nativas mantenidas en éste, con respecto al vivero A, y a que en este

último no fueron detectados dos de los virus en estudio (CymRSV y CMV). Además, se debe destacar que la gran mayoría de las plantas del vivero B se encontraron correctamente identificadas a nivel de especie (apéndice V).

La mayoría de los nuevos informes son para CymMV (Cuadros 12 y 13), por ser el más abundantes, como se discutió anteriormente. El número de nuevos informes para ORSV y potyvirus es igual (19), (Cuadro 12, 14 y 18), sin embargo para el segundo caso se conocían menos géneros de orquídeas infectados por estos virus, de tal forma que casi todos los nuevos informes se pueden dar tanto para la especie como para el género. Para TRV y CMV se hallaron 16 nuevos informes (Cuadros 12, 15 y 19), la gran mayoría en ambos casos a nivel de género y especie por el mismo fenómeno descrito con los potyvirus. Las 10 nuevas infecciones de CymRSV aquí determinadas son importantes de destacar, ya que desde la publicación de la descripción del virus, rara vez se han informado nuevas especies o géneros de orquídeas infectados (Cuadros 12 y 16), (Zettler *et al.* 1990, Lawson 1995). Por otra parte, los 12 informes nuevos para TSWV (Cuadros 12 y 17), confirman las sospechas de Zettler *et al.* (1987 y 1990), de que este virus se dispersaría en los cultivos de orquídeas, a causa de su amplio ámbito de plantas hospederas, tanto cultivadas como silvestres.

Los géneros *Amparoa* (una especie), *Brassia* (2), *Chondrorhyncha* (1), *Elleanthus* (6), *Epidendrum* (4), *Masdevallia* (1), *Maxillaria* (10), *Mormodes* (3), *Octomeria* (1), *Oerstedella* (1), *Oncidium* (2), *Otoglossum* (1), *Pescatorea* (1), *Pleurothallis* (19), *Prescotia* (1), *Prosthechea* (5), *Restrepia* (1), *Rhynchostele* (2), *Scaphyglottis* (6), *Sobralia* (9), *Stanhopea* (2), *Stelis* (2), *Stenorrhinchos* (1), *Trichopilia* (2), *Trichosalpinx* (2), *Warscewiczalla* (1) y *Zootrophion* (1) contienen nuevos informes a nivel de género para alguno de los virus en estudio (Cuadros 12-18).

Los géneros con mayor cantidad de nuevos informes en total (por género, por especie o ambos) son *Pleurothallis* (24), *Maxillaria* (16), *Epidendrum* (8), *Elleanthus*

(7), *Oncidium* (7), *Prosthechea* (7), *Scaphyglottis* (7), *Lycaste* (6), *Cattleya* (5) y *Sobralia* (5), éstos son cultivados por los coleccionistas en todo el mundo (Northen 1996, Rittershausen & Rittershausen 2001). Todos los géneros mencionados se encuentran distribuidos ampliamente de manera natural por América Neotropical (Dressler 1981 y 1993b), y el cultivo ha llevado a la mayoría de estos géneros a otras latitudes donde son apreciados como joyas vivas (Northen 1996), aunque el cultivo comercial normalmente da preferencia a los géneros *Cattleya* y *Oncidium*, y a los híbridos de flores vistosas.

Entre las especies estudiadas, sólo *Gongora amparoana* y *Scaphyglottis bifida* son endémicas de Costa Rica, y el resto de las especies puede hallarse en los otros países del área mesoamericana, especialmente Panamá (Dressler 1993a, Pupulin 2002). Por lo tanto, los informes nuevos deben llamar la atención no sólo de los coleccionistas nacionales, sino también de los de otros países del área.

Tres casos importantes de destacar entre las especies que se encontraron infectadas por alguno de los virus en el estudio, son *Cattleya dowiana*, *C. skinneri* y el híbrido nativo de *Cattleya* infectadas por CymMV, CMV y potyvirus respectivamente. La primera especie es endémica de Costa Rica y la segunda se le encuentra distribuida por Centroamérica (Dressler 1993a). Ambas plantas son cultivadas con gran aprecio en Costa Rica y fuera del país, y utilizadas en cruces para producir híbridos (en especial *C. dowiana*). Éstas son buenas razones para determinar la capacidad de CMV para infectar estas especies y efectuar controles fitosanitarios antes de hacer los cruces, en particular para CMV ya que este virus se transmite a través de semilla en otras especies de plantas (Mink 1993). El caso del híbrido de cattleyas nativas infectado con potyvirus es importante con relación a la afición de los coleccionistas a este tipo de híbridos.

Los tejidos sintomáticos con infecciones fúngicas revisados en todos los casos mostraron estructuras típicas de hongos (Cuadro 20). Para Costa Rica, se han informado algunos hongos como patógenos comunes en viveros que provocan

podredumbre negra (*Phytophthora cactorum* y *Pythium ultimum*) y manchas foliares (*Cercospora* sp. y *Phyllosticta* sp.) los cuales podrían ser los responsables de estos síntomas (Simone & Burnett 1995, Rivera-Coto 1998).

Al aplicar la técnica de tinción de inclusiones virales, los resultados no siempre fueron satisfactorios debido a dificultades como la separación de la epidermis abaxial y lo quebradizo del tejido. Por lo tanto, se tomaron también muestras de epidermis adaxial y en el caso de hojas gruesas, cortes transversales. Otro problema fue la abundancia de rafidios y otros cristales en las células epidérmicas y del mesófilo de orquídeas, los cuales, en muchos casos, retienen ligeramente la tinción O-G, o impiden ver otras estructuras. En el único caso en que se observaron inclusiones virales claras, *Pleurothallis fulgens* (Fig. 7), éstas tienen la apariencia típica de inclusiones de nepovirus (Christie & Edwardson 1994). El único nepovirus informado para orquídeas es *Tomato ringspot nepovirus*; sin embargo, no se pudo verificar la identidad del virus. Este hallazgo implica la presencia de un sétimo virus, y tal vez más, que se podrían encontrar en futuros estudios. Ko (1988) relacionó las inclusiones celulares de CMV encontradas en hojas con los síntomas cloróticos en híbridos de *Phalaenopsis*, por lo que suponemos que en este caso se podría encontrar el mismo tipo de relación.

Futuros estudios con la aplicación de anticuerpos para otros virus no evaluados en el presente, con microscopía de luz y electrónica podrían revelar algunos patógenos virales no diagnosticados en el país hasta la fecha. Entre ellos pueden encontrarse rhabdovirus, transmitidos por ácaros, entre los cuales se informan como plagas de orquídeas *Tetranychus urticae* y *Tenuipalpus pacificus* (Hamon 1995). Además, un estudio semejante a este debería desarrollarse para determinar las infecciones asintomáticas, para establecer la proporción real de infecciones y definir los cuidados pertinentes para el buen control fitosanitario en los viveros.

## 7. Bibliografía

- Anónimo. 1973. Orquídeas: su cultivo en Costa Rica. Delta, San José. 103 p.
- Anónimo. 1998. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies (CITES). Apéndices I y II (versión revisada). URL: [www.cites.com](http://www.cites.com)
- Barry, K., J.S. Hu, A.R. Kuehnle & N. Sughii. 1996. Sequence analysis and detection using immunocapture-PCR of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in hawaiian orchids. *J. Phytopathol.* 144: 179-86.
- Brunt, A.A., K. Crabtree, M.J. Dallwitz, A.J. Gibbs, L. Watson, & E.J. Zurcher, (eds.) (1996 onwards). *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. URL: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>.
- Cervera, M.T. & J.A. García. 1996. Patogénesis de virus de plantas. *In* Llácer, G., M.M. López, A. Trapero, & A. Bello (eds.). *Patología Vegetal*. Tomo I. Phytoma, España. 695 p.
- Christie, R.G. & J.R. Edwardson. 1978. Light microscope techniques for detection of plant virus inclusions. *Phytopathology* 70: 273-9.
- Christie, R.G. & J.R. Edwardson. 1994. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Monograph 9 (revised), University of Florida. 165 p.
- Cho, J.J., R.F.L. Mau, T.L. German, R.W. Hartmann & L.S. Yudin. 1989. A Multidisciplinary approach to management of *Tomato spotted wilt virus* in Hawaii. *Plant Dis.* 73: 375-83.
- Clark, M.F. & A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* 34: 475-83.
- Corbett, M.K. 1967. Some distinguishing characteristics of orchids strains of *Tobacco mosaic virus*. *Phytopathology* 57: 164-72.
- Culver, J.N., A.G.C. Lindbeck, & W.O. Dawson. 1991. Virus-host interactions: induction of chlorotic and necrotic responses in plants by Tobamovirus. *Annu. Rev. Phytopathology* 29: 193-217.
- Cybularz, T., T. Kobyłko & K. Miczyński. 1997. *Cymbidium mosaic virus* in the orchid *Coelogyne lawrenceana* Rolfe. *Folia Hort.* 9: 53-8.
- Dressler, R.L. 1981. *The orchids: natural history and evolution*. Harvard University Press, Cambridge. 498 p.

- Dressler, R.L. 1993a. Field guide to the orchids of Costa Rica and Panama. Comstock, Ithaca. 374p.
- Dressler, R.L. 1993b. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides, Portland. 314p.
- Elliot, M.S., F. W. Zettler, M. T. Zimmerman, O. W. Barnett & M. D. Legrande. 1996. Problems with interpretation of serological assay in a virus survey of orchids species from Puerto Rico, Ecuador, and Florida. *Plant Dis.* 80: 1160-4.
- Eun, A.J.C. & S.M. Wong. 2000. Molecular beacons: a new approach to plant virus detection. *Phytopathology* 90: 269-75.
- Freitas-Astúa, J., J.A.M. Renzende & E.W. Kitajima. 1999. Incidence of orchids viruses in the state of São Paulo, Brazil. *Fitopatol. Bras.* 24: 125-30.
- Gara, I.W., H. Kondo, T. Maeda, N. Inouye & T. Tamada. 1998. *Calanthe mild mosaic virus*: a new *Potyvirus* causing mild mosaic disease of *Calanthe* orchid in Japan. *J. Phytopathol.* 146: 357-63.
- Geraci, R. B. 1996. Major viruses affecting orchids. *Am. Orch. Soc. Bull.* 65: 836-43.
- Gibbs, A., A. Mackenzie, A. Blanchfield, P. Cross, C. Wilson, E. Kitajima, M. Nightinbale & M. Clements. 2000. Viruses of orchids in Australia; their identification, biology and control. *Australian Orchid Review* June/July: 10-21.
- Hammond, J. & R.H. Lawson. 1988. A strain of bean yellow mosaic virus is aphid-transmitted from orchids. *Acta Horticult.* 234: 365-70.
- Hamon, A.B. 1995. Orchid pests. *In* Anónimo. *Orchids pests and Diseases*. American Orchid Society, Palm Beach. Pp. 74-104.
- Herrera-Villalobos, A. 1998. Factibilidad, técnica y financiamiento para la producción *in vitro* de orquídeas *Masdevallia* en la zona de Monteverde. Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica, San José.
- Hew, C.S. 1989. Orchids cut-flower production in Singapore and neighboring ASEAN countries. *Am. Orch. Soc. Bull.* 58: 887-97.
- Hollings, M., O.M. Stone & R.J. Barton. 1977. Pathology, soil transmission and characterization of *Cymbidium ringspot*, a virus from cymbidium orchids and white clover. *Ann. Appl. Biol.* 85: 233-48.
- Hsu, H.T., D. Vongsasitorn & R.H. Lawson. 1992. An improved method for serological detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* infection in orchids. *Phytopathology* 82: 491-5.

- Hu, J.S., S. Ferreira, M. Wang, & Q. Xu. 1993. Detection of *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, *Tomato spotted wilt virus*, and potyvirus infecting orchids in Hawaii. *Plant Dis.* 77: 464-8.
- Hu, J.S., S. Ferreira, M.Q. Xu, M. Lu, M. Iha, E. Pflum & M. Wang. 1994. Transmission, movement, and inactivation of *Cymbidium mosaic* and *Odontoglossum ringspot* viruses. *Plant Dis.* 78: 633-6.
- Hu, J.S., S. Ferreira, M. Wong, W.B. Borth, G. Mink & R. Jordan. 1995. Purification, host range, serology and partial sequencing of *Dendrobium mosaic potyvirus*, a new member of the *Bean common mosaic virus* subgroup. *Phytopathology* 85: 542-6.
- Hu, W.W. & S.M. Wong. 1998. The use of DIG-labelled cRNA probes for the detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) in orchids. *J. Virol. Meth.* 70:193-9.
- Jensen, D.D. 1951. Mosaic or black streak of *Cymbidium* orchids. *Phytopathology* 41: 401-14.
- Jensen, D.D. & A.H. Gold. 1955. Hosts, transmission and electron microscopy of *Cymbidium mosaic virus* with special reference to *Cattleya* leaf necrosis. *Phytopathology* 45: 327-34.
- Jordan, R. & J. Hammond. 1991. Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain-, virus-, subgroup specific and potyvirus group-common epitopes using monoclonal antibodies. *J. gen. Virol.* 72: 25-36.
- Kado, C. I. 1964. Viruses, villains of orchid disorders. *Am. Orch. Soc. Bull.* (Nov.): 943-8.
- Kado, C.I. & D.D. Jensen. 1964. *Cymbidium mosaic virus* in *Phalaenopsis*. *Phytopathology* 54: 974-7.
- Kitajima, E.W., H. Kondo, A. Mackenzie, J.A.M. Rezande, R. Gioria, A. Gibbs & T. Tamada. 2001. Comparative cytopathology and immunocytochemistry of japanese, australian and brazilian isolates of *orchid fleck virus*. *J. Gen Plant Pathol.* 67: 231-7.
- Kitajima, E.W., A. Blumenschein & A.S. Costa. 1974. Rod-like particles associated with ringspot symptoms in several orchid species in Brazil. *Phytopathology Z.* 81: 280-6.
- Ko, N.J. 1988. Cytological identification of *Cucumber mosaic virus* infecting *Phalaenopsis*. *Proc. Natl. Sci. Council B. ROC.* 12: 46-51.

- Ko, N.J., F.W. Zettler & G.C. Wisler. 1985. A simplified bioassay technique for *Cymbidium mosaic* and *Odontoglossum ringspot* viruses. *Am. Orch. Soc. Bull.* 54:1080-2.
- Lawson, R.H. 1995. Viruses and their control, p. 74-104. *In* Anónimo. *Orchids pests and Diseases*. American Orchid Society, Palm Beach.
- Lawson, R.H. & H.T. Hsu. 1995. Orchids, p. 409-19. *In* Loewbenstein, G., R.H. Lawson & A.A. Brunt (eds.). *Virus and virus like disease of bulb and flower crops*. Wiley, Chechester.
- Lawson, R. H. & M. Brannigan. 1975, *Virus diseases of orchids*. *In* Anónimo. *Orchids pests and Diseases*. American Orchid Society, Palm Beach. Pp. 2-43.
- Lee, D.W. & S. Brammeier. 1987. The selective advantages of anthocyanins in developing leaves of mango and cacao. *Biotropica* 19: 40-9.
- Lesemann, D.E. & H.J. Vetten. 1985. The occurrence of tobacco rattle and turnip mosaic viruses in *Orchis* sp., and an unidentified potyvirus in *Cypripedium calceolus*. *Acta Hort.* 164: 45-54.
- Lidoo, S.J. & M.M. Caldwell. 1978. Ultraviolet-B radiation-induced inhibition of leaf expansion and promotion of anthocyanin production: lack of involvement of the low irradiance phytochrome system. *Plant Physiol.* 61: 278-82.
- Mackenzie, A.M., M. Nolan, K.J. Wei, M.A. Clements, D. Gowanlock, B.J. Wallace & A.J. Gibbs. 1998. *Ceratobium mosaic potyvirus*: another virus from orchids. *Arch. Virol.* 143: 903-14.
- Malter, A.J. 1995. The economic importance of ornamentals, p. 1-13. *In* Loewbenstein, G., Lawson, R.H. & A.A. Brunt (eds.). *Virus and virus like disease of bulb and flower crops*. Wiley, Chechester.
- Matthews, R.E.F. 1992. *Plant Virology*. Academic Press, London. 403 p.
- Mayhew, D.E., A.L. Cook & R.D. Raabe. 1992. Special report: a new virus is reported for *Phalaenopsis*. *Am. Orch. Soc. Bull.* 61: 574-7.
- Méndez, M.E., M. Dix & M. Palmieri. 2002. 42<sup>a</sup> Reunión de la Sociedad Americana de Fitopatología – División Caribe; 5<sup>o</sup> Seminario de Manejo Integrado de Plagas en Cultivos no Tradicionales de Exportación, , Guatemala. 67 p.
- Mink, G.I. 1993. Pollen and seed transmitted viruses and viroids. *Annu. Rev. Phytopathology* 31: 375-402.

- Moreira, L., W. Villalobos, E. Rodríguez-Cerezo & C. Rivera. 1999. Infección de la orquídea terrestre *Phaius tankervillei* (Orchidaceae) con el potexvirus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 47: 281-6.
- Moreno, R.A. 1968. Caracterización del virus común del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Costa Rica. Tesis para optar por el grado de Magister Scientia, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- Murakishi, H.H. 1958. Host range, symptomatology, physical properties and cross-protection studies of orchid virus isolates. *Phytopathology* 48: 132-7.
- Northern, R.T. 1996. *Miniature orchids and how to grow them*. Dover., Nueva York. 191 p.
- Ohtsubo, N., N. Mitsuhashi, I. Koga, M. Seo & Y. Ohashi. 1999. Ethylene promotes the necrotic lesion formation and basic PR gene expression in TMV-infected tobacco. *Plant Cell Physiol.* 40: 808-17.
- Pearson, M.N., G.V.H. Jackson, S.P. Pone & R.L.J. Howitt. 1993. *Vanilla virus* in the South Pacific. *Plant Pathol.* 42: 127-31.
- Porter, K., A. Kuehnle & J. Hu. 1996. Lack of seed transmission of *Cymbidium mosaic virus* in *Dendrobium*. *Lindleyana* 11: 211-3.
- Pupulin, F. 2002. Catálogo revisado y anotado de las Orchidaceae de Costa Rica. *Lankesteriana* 4: 1-88.
- Rittershausen, W. & R. Rittershausen. 2001. *Gardener's guide to growing orchids: a complete guide to cultivation and care*. Southwater, Londres. 128 p.
- Rivera, C., R. Pereira & P. Ramírez. 1990. Identificación del marchitamiento del tomate (TSWV) en *Impatiens waleriana* en Costa Rica. *Turrialba* 40: 562-8.
- Rivera, C., P. Ramírez & C.M. Rodríguez. 1991. *Papaya ringspot virus* and *Cucumber mosaic virus* associated with a severe mosaic in melon. *Turrialba* 41: 437-43.
- Rivera-Coto, G. 1998. *Orquídeas: generalidades y cultivo*. Ed. Universidad Nacional. 266 p.
- Robertson, W. 1992. How accurate are virus tests? *Am. Orch. Soc. Bull.* 61: 258-61.
- Schelpe, E.A. 1983. An early appearance of *Cattleya* colour break virus. *Am. Orch. Soc. Bull.* 52: 1161-2.

- Sclar, C. & T. Anisco. 2001. Tospovirus host list. Longwood Gardens, Kennett Sawar (PA). 3 p.
- Sheehan, T.J. 1995. Physiological disorders of orchids, p. 4 – 21. *In* Anónimo. Orchids pests and Diseases. American Orchid Society, Palm Beach.
- Simone, G.W. & H.C. Burnett. 1995. Diseases caused by bacteria and fungi, p. 74 - 104. *In* Anónimo. Orchids pests and Diseases. American Orchid Society, Palm Beach.
- Shukla D.D., C.W. Ward & A.A. Brunt. 1994. The Potyviridae. CABI, Wallingford. 516 p.
- Sutula, C.L., J.M. Gillett, S.M. Morrissey & D.C. Ramsdell. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Dis.* 70: 722-6.
- Tanaka, S., H. Nishii, S. Ito & M. Kameya-Iwaki. 1997. Detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* from Thai orchids by rapid immunofilter paper assay. *Plant Dis.* 82:167-70.
- Velasco, A.C., F. Hernández & R. Gámez. 1986. Una doble infección viral en orquídeas del género *Cymbidium*. *Rev. Biol. Trop.* 34: 171-9.
- Walkey, D.G.A. 1985. Applied Plant Virology. Willey, Nueva York. 329 p.
- Wisler, G.C., F.W. Zettler & L. Mu. 1987. Virus infection of *Vanilla* an other orchids in French Polynesia. *Plant Dis.* 71:1125-9.
- Wong, S.-M., C.G. Chng, Y.H. Lee & H.T.M. Lim. 1995. An appraisal of the banded and paracrystalline cytoplasmic inclusions induced in *Cymbidium mosaic potexvirus* and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* infected orchids cells using confocal laser scanning microscopy. *Arch. Virol.* 141:231-42.
- Yuen, C.K.K.H., H. Kamemoto & M. Ishii. 1979. Transmission of *Cymbidium mosaic virus* through seed propagation in *Dendrobium*. *Am. Orch. Soc. Bull.* 48:1245-7.
- Zettler, F.W., G.R. Hennen, W.H. Bodnaruk, H.T. Clifford & T.J. Sheehan. 1978. Wild and cultivated orchids surveyed in Florida for the *Cymbidium mosaic* and *Odontoglossum ringspot* viruses. *Plant Dis. Rep.* 62: 949-52.
- Zettler, F.W., G.C. Wisler, M.S. Elliot & N.J. Ko. 1987. Some new, potentially significant viruses of orchids and their probable means of transmission. *Am. Orch. Soc. Bull.* 56: 1045-53.
- Zettler, F.W., N.J. Ko, G.C. Wisler, M.S. Elliot & S.M. Wong. 1990. Virus of Orchids an their Control. *Plant Dis.* 74:621-6.

## APÉNDICES

### Apéndice I

#### Virus en estudio

Los virus que infectan orquídeas pertenecen a grupos taxonómicos muy distintos. A continuación se presentan algunas de las características biológicas y físicas de los virus en estudio, que permiten distinguirlos.

#### *Cymbidium mosaic potexvirus*

El "*Cymbidium mosaic potexvirus*" (CymMV), tiene una distribución geográfica universal. Se ha informado en varias especies de orquídeas, en las que presenta diferentes tipos de síntomas, tales como mosaicos y necrosis en hojas, y necrosis o jaspeados de las flores. Puede infectar plantas de otras familias, en las que causa lesiones locales, como las inducidas en *Chenopodium amaranticolor*, *Datura stramonium* y *Cassia occidentalis*, entre otros. Se transmite mecánicamente y por contacto entre plantas, pero no se le conoce un vector. Se inactiva entre los 60 y 70 °C, puede permanecer infectivo hasta 25 días fuera de la planta hospedera. El virión es de forma filamentosa flexuosa, sin envoltura, de 480 nm de largo y 13 de diámetro, con estructura espiral. Contiene 5.6% de ácido nucleico, 94% de proteína, sin lípidos. Su genoma es un ARN simple banda, lineal de 8.1 kb. Se encuentra presente en las hojas, en el citoplasma de las células, donde forma inclusiones como cuerpos bandeados que contienen viriones (Brunt *et al.* 1996).

#### *Odontoglossum ringspot tobamovirus*

El "*Odontoglossum ringspot tobamovirus*" (ORSV) fue considerado en un principio como una raza del *Tobacco mosaic tobamovirus* para orquídeas (TMV-O). Su distribución es cosmopolita. Los síntomas inducidos en orquídeas varían. En *Odontoglossum* induce anillos concéntricos; en otros géneros puede producir jaspeados en la flor, clorosis, mosaicos o necrosis en las hojas. En algunas

variedades se ha descubierto que produce infecciones asintomáticas. Produce lesiones locales en *Nicotiana tabacum*, *Cassia occidentalis* y *Chenopodium amaranticolor*. No se le conoce vector, aunque se transmite por medios mecánicos. Se inactiva al exponerse a temperaturas superiores a 90 °C, y no es inactivado por éter dietílico en extractos de savia. Es un virus muy estable. Las partículas virales tienen forma de bastón, con un largo aproximado de 300 nm (en su mayoría, algunos más cortos), y 18 nm de ancho. Es purificado como dos partículas, una de 212 S, y la otra de 119 S. Los viriones contienen 5% ácido nucleico, y el resto proteína. Tiene dos ARNs simple banda lineares. Produce inclusiones cristalinas en el citoplasma (Brunt *et al.* 1996).

### ***Tobacco rattle tobnavirus***

El "*Tobacco rattle tobnavirus*" (TRV) tiene una amplia distribución en Eurasia, Norte y Centroamérica, China y Japón, y aunque está presente en Nueva Zelanda y Australia, allí se le encuentra poco distribuido. Tiene plantas hospederas en más de veinte familias, y produce síntomas sistémicos como necrosis, clorosis, moteados, bandeados o anillos concéntricos. Es transmitido por nemátodos en forma persistente no circulativa. También es transmitido por semilla y por medios mecánicos, pero no por contacto entre plantas. Su punto de inactivación es a los 80 °C, puede sobrevivir fuera de una planta hospedera por 40-50 días. Los viriones son bastones de 46 a 114 nm, o de 180 a 197 nm, con un grosor de 22 nm. Es purificado como dos componentes. Los viriones contienen 5% ácido nucleico y 95% proteína. Su genoma consiste de dos ARNs simple banda lineares, que suman de 9.09 a 11.515 kb. No presenta residuos de poli-A. Las partículas virales se encuentran en toda la planta, dentro de las células se unen a las mitocondrias, y forma inclusiones generando mitocondrias anormales. Además, en las células enfermas, los cloroplastos tienden a degenerar y degradarse (Brunt *et al.* 1996).

### ***Cymbidium ringspot tombusvirus***

El "*Cymbidium ringspot tombusvirus*" (CymRSV) tiene dos razas que se aislaron en Inglaterra, una que infecta orquídeas del género *Cymbidium*, y otra que infecta tréboles (*Trifolium repens*). En el primer hospedero produce anillos concéntricos, y en el segundo, moteado y manchas cloróticas. Este virus no tiene un vector identificado, pero puede ser transmitido mecánicamente, por contacto entre plantas. No se transmite por semilla, pero tiene un ámbito de plantas hospederas amplio que incluye especies susceptibles en unas diecinueve familias. Su punto de inactivación térmica está entre los 85 y 90 °C, puede permanecer activo fuera de la planta hasta 300 días. El virión es isométrico, sin envoltura y con un diámetro de 30 nm. Su contenido de ácido nucleico es de 14-15%, y su genoma consiste de ARN simple banda, con una extensión de 4.733 kb. La infección es sistémica.

### ***Cucumber mosaic cucumovirus***

El "*Cucumber mosaic cucumovirus*" (CMV) tiene múltiples razas que infectan amplio ámbito de plantas hospederas, en muchas familias de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los síntomas varían entre especies de plantas, pero incluyen necrosis, clorosis, mosaicos y moteados. Su distribución geográfica es cosmopolita. Es transmitido por áfidos (Aphididae) de unas 60 especies, de manera no persistente, y puede transmitirse mecánicamente y por semilla. Su punto de inactivación térmica está entre 55 y 70 °C, puede sobrevivir fuera de la planta hospedera de uno a diez días, y no es inactivado por éter dietílico en extractos de savia. Las partículas virales son isométricas, sin envoltura y con un diámetro de 29 nm. EL virión contiene 18% ácido nucleico, 82% proteína, y 0% de lípidos. Su genoma consta de tres ARN simple banda, de 3.389 kb, 3.035 kb y 2.197 kb de extensión. Produce ARN subgenómicos para la expresión de sus genes. Producen inclusiones romboidales, hexagonales o esféricas que contienen viriones.

### ***Tomato spotted wilt tospovirus***

El "*Tomato spotted wilt tospovirus*" (TSWV) fue el primero de esta familia de virus en ser descubierto que puede infectar plantas, seguido por el "*Impatiens spotted wilt tospovirus*", y unos pocos más. El resto de los Bunyavirus infectan animales. El TSWV es capaz de infectar un amplio ámbito de plantas hospederas en 19 familias. Entre los síntomas inducidos en las plantas se encuentran la marchitez sistémica, necrosis, estriado, moteado, mosaicos, malformaciones en la lámina de las hojas y enrollamiento, aclaramiento de venas y variegaciones en las flores. Su vector son los "trips" (Thysanoptera), los cuales lo transmiten de manera persistente; es circulativo y probablemente propagativo en el insecto, pero no tiene transmisión transovarial. No se transmite por semilla o polen. Es transmisible mecánicamente, aunque tarda cinco horas en decaer fuera de la planta hospedera. El virión es isométrico, cubierto por una membrana, con diámetro de 85 nm, y de forma redondeada. Está compuesto por 5% ácido nucleico, 70% proteína, 20 % lípidos y 5% carbohidratos. Su genoma es ARN lineal simple banda de 17.2 kb, sin poli-A en el extremo 3'. Expresa algunos genes por medio de porciones subgenómicas. Transporta dentro del virión su propia retrotranscriptasa. Produce inclusiones citoplasmáticas poco comunes.

### ***Potyvirus***

El género de virus de plantas *Potyvirus* pertenece a la familia Potyviridae. Este es el grupo de virus de plantas más grande, con unas 170 especies virales. Sin embargo, algunas especies tienen un ámbito de hospederas reducido, y sólo unos cuantos virus son de amplio ámbito de plantas hospederas (ej. *Bean yellow mosaic potyvirus*). Los potyvirus ocurren en todo el mundo, pero en especial en los trópicos y subtrópicos. Son transmitidos de manera no persistente por áfidos (Aphididae), aunque algunos pocos lo son por ácaros u hongos, y algunos por semilla, en especial los que infectan leguminosas. Algunas de las características generales de este grupo son: virión flexuoso normalmente de 650, 758.4 ó 900 nm de largo, grosor de 11, 12.86 ó 20 nm; sobreviven fuera de la planta hospedera entre 0.125 y 64 días; contienen entre 4 y 7 % de ácido nucleico, y entre 93 y 96

% de proteína, y no contienen lípidos; el genoma es ARN simple banda linear; producen inclusiones citoplásmicas características en forma de remolino, en algunos casos amorfas, o producen cuerpos amorfos X, o inclusiones cristalinas en el núcleo.

**Fuente:** documento permanente en la WWW, Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. & Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.' URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>.

## Apéndice II

## EVALUACIÓN DE ORQUÍDEAS

Número de evaluación \_\_\_\_\_

Datos generales:

Fecha					
Colector					
Nombre de la compañía o vivero					
Localización geográfica					
# del vivero					
Linderos del vivero Norte Sur Este Oeste					
Características del vivero (tipo de malla, vidrio, etc)					
código de planta # PCDV					
Género (especie)					
Variedad					
Híbrido					
Descripción general Aspecto talla, vigor estado fisiológico					
Nº total de plantas por variedad o híbrido					
Sanas Con síntomas virales					

Número de evaluación \_\_\_\_\_

## Sintomatología:

<b>HOJAS:</b> Sistémicos= S, Lesión local= LL					
<b>Sistémicos:</b> Mosaico= Ms Moteado= Mt Necrosis= N					
Disminución de la lámina					
Malformación foliar					
Anillos concéntricos= RS Cloróticos= cl Necróticos= n					
Bandeados cloróticos= Bcl					
Senescencia precoz= ST					
<b>Locales:</b> Tamaño: Forma: Ubicación:					
<b>FLORES:</b> <b>Distribución de síntomas:</b> Flor total= FT Labelo= L Sépalo= sp					
<b>Tipo de síntoma:</b> Variegado= V Estriado= E Necrosis= N Anillos: Incoloros= Rsin Necróticos= RSn					
Calidad de flor					
Tamaño de flor					
Orientación de flor					

## Número de evaluación \_\_\_\_\_

Apertura de la flor					
Senescencia precoz= ST					
Flores pérdidas					
<b>Inflorescencias:</b> <b>Distribución de síntomas:</b> Total= IAT Parcial= IAP					
<b>Tipo de síntoma</b> Variegado Estriado Necrosis Anillos					
Reducción de tamaño					
Disminución de cantidad de flores					
Crecimiento y orientación anormal					
Escápulas con síntomas					
Pérdida de escápulas					
Brácteas con síntomas					
Pérdida de brácteas					
Bulbos- rizoma (B o R): <b>Tipo síntoma:</b> Clorosis= CI Moteado= M Necrosis= N Anillos= RS					
Malformación					
Disminución de tamaño					
<b>Presencia de vectores:</b> Afidos Acaros Cicadelidos Nematodos Cochinilla					



### Apéndice III

#### Fórmulas de soluciones amortiguadoras (tomado de los protocolos recomendados por la casa Agdia)

##### Amortiguador para extracción general:

Disolver en 1000 ml de PBST	Masa g	Molaridad de las sales
Sulfito de Sodio (anhidro)	1.3	0.0103
Polivinilpirrolidona (PVP) MW 24-40,000	20.0	-
Azida de Sodio	0.2	-
Albúmina Sérica Bovina (BSA)	2.0	-
Tween-20	20.0	-

Ajustar el pH a 7.4. Guardar a 4 °C.

##### Amortiguador para extracción de muestra indirecta (en amortiguador carbonatos):

Disolver en 1000 ml de agua destilada	Masa g	Molaridad de las sales
Carbonato de Sodio (anhidro)	1.59	0.0150
Bicarbonato de Sodio	2.93	0.0349
Azida de Sodio	0.2	-
Polivinilpirrolidona (PVP) MW 24-40,000	20.0	-

Ajustar el pH a 9.6. Guardar a 4 °C.

##### Amortiguador para recubrimiento:

Disolver en 1000 ml de agua destilada	Masa g	Molaridad de las sales
Carbonato de Sodio (anhidro)	1.59	0.0150
Bicarbonato de Sodio	2.93	0.0349
Azida de Sodio	0.2	-

Ajustar el pH a 9.6. Guardar a 4 °C.

##### Amortiguador PBST (amortiguador de lavado):

Disolver en 1000 ml de agua destilada	Masa g	Molaridad de las sales
Cloruro de Sodio	8.0	0.13690
Fosfato de Sodio, dibásico (anhidro)	1.15	0.00094
Fosfato de Potasio, monobásico (anhidro)	0.2	0.00147
Cloruro de Potasio	0.2	0.00671
Tween-20	0.5	-

Ajustar pH a 7.4 mantener a temperatura ambiente.

**Amortiguador ECI:**

Disolver en 1000 ml de PBST	Masa g
Albúmica Sérica Bovina (BSA)	2.0
Polivinilpirrolidona (PVP) MW 24-40,000	20.0
Azida de Sodio	0.2

(Se recomienda prepararlo en el momento de usarlo, en tal caso no agregar la azida de sodio). Ajustar pH a 7.4. Guardar a 4 °C.

**Amortiguador sustrato para PNP:**

Disolver en 800 ml de agua destilada	Masa g
Dietanolamida	97.0
Azida de Sodio	0.2

Ajustar pH a 9.8 con ácido clorhídrico. Ajustar volumen final a 1000 ml con agua destilada. Guardar a 4 °C.

## Apéndice IV

## Lista de plantas evaluadas por ELISA en el vivero A

Especie, variedad o híbrido	Código Proyecto	CymMV	ORSV	TRV	TSWV	Poty	Nº Virus
<i>Sobralia</i> sp.	PCDV - 00-01	-	+	+	-	+	3
<i>Cattleya skinneri</i>	PCDV - 01-01	+	-	-	-	+	2
<i>Cattleya skinneri</i>	PCDV - 01-02	-	-	-	XD	+	1
<i>Cattleya skinneri</i>	PCDV - 01-03	-	-	-	+	+	2
<i>Cattleya skinneri</i>	PCDV - 01-04	-	-	-	+	-	1
<i>Mormodes</i> sp.	PCDV - 01-05	-	+	+	+	-	3
<i>Encyclia cordigera</i> var. <i>rosea</i>	PCDV - 01-06	-	-	-	-	-	0
<i>Encyclia cordigera</i>	PCDV - 01-07	-	-	-	-	-	0
<i>Trigonidium</i> sp.	PCDV - 01-08	-	-	-	-	-	0
<i>Brassia</i> sp.	PCDV - 01-09	-	-	-	-	-	0
<i>Oncidium</i> sp.	PCDV - 01-10	+	-	-	+	-	2
<i>Pleurothallis</i> cf. <i>grandis</i>	PCDV - 01-11	-	-	-	-	-	0
<i>Oncidium</i> sp.	PCDV - 01-12	-	-	-	-	-	0
<i>Oncidium</i> sp.	PCDV - 01-13	-	-	-	-	-	0
<i>Tricopilia</i> sp.	PCDV - 01-14	-	-	-	-	+	1
<i>Aspasia</i> sp.	PCDV - 01-16	-	-	-	-	-	0
<i>Brassia gireoudiana</i>	PCDV - 01-17	+	-	-	-	XD	1
<i>Epidendrum parkinsoniana</i>	PCDV - 01-18	+	-	-	-	+	2
<i>Epidendrum firmum</i>	PCDV - 01-19	+	-	-	-	+	2
<i>Epidendrum ciliare</i>	PCDV - 01-20	+	-	-	-	-	1
<i>Oncidium</i> sp.	PCDV - 01-21	+	-	-	-	+	2
<i>Epidendrum</i> sp.	PCDV - 01-22	-	-	-	-	+	1
<i>Cattleya</i> hib. nativo	PCDV - 01-23	+	+	+	-	+	4
<i>Cattleya</i> hib. nativo	PCDV - 01-24	+	-	-	-	-	1
<i>Cattleya</i> x <i>Encyclia</i>	PCDV - 01-25	+	-	-	-	+	2
<i>Cattleya dowiana</i>	PCDV - 01-26	+	-	-	-	+	2
<i>Cattleya</i> hib. nativo	PCDV - 01-27	-	-	-	-	-	0
<i>Oncidium</i> sp.	PCDV - 01-29	-	-	-	-	+	1
<i>Oncidium</i> sp.	PCDV - 01-30	-	-	-	-	+	1
<i>Oncidium</i> sp.	PCDV - 02-01	-	-	-	-	-	0
<i>Cattleya skinneri</i>	PCDV - 02-05	-	-	-	-	+	1
<i>Cattleya skinneri</i> hib. M <sup>a</sup> Eug.	PCDV - 02-07	+	-	-	-	+	2

Nota: Poty= potyvirus; XD = planta extraviada o destruida antes del ensayo; + = resultado positivo; - = resultado no positivo.

## Apéndice V

## Lista de plantas evaluadas por ELISA en el vivero B.

Nombre especie	Código Proyecto								N° virus
		CymMV	ORSV	TRV	CymRSV	TSWV	Poty	CMV	
<i>Scaphyglottis prolifera</i>	PCDV - 03-001	+	+	-	-	-	+	-	3
<i>Scaphyglottis micrantha</i>	PCDV - 03-003	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Scaphyglottis sp.</i>	PCDV - 03-005	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Epidendrum resectum</i>	PCDV - 03-006	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Scaphyglottis lindeniana</i>	PCDV - 03-007	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Prosthechea pygmaea</i>	PCDV - 03-010	-	-	-	-	-	+	-	1
<i>Encyclia ochracea</i>	PCDV - 03-011	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Nidema boothii</i>	PCDV - 03-012	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Oerstedella centropetala</i>	PCDV - 03-013	-	-	-	-	-	+	-	1
<i>Cischweinfia sp.</i>	PCDV - 03-014	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Amparoa costarricensis</i>	PCDV - 03-015	-	-	-	-	-	+	-	1
<i>Systemoglossum costarricensis</i>	PCDV - 03-016	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Notylia trisepala</i>	PCDV - 03-019	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Dracula sp.</i>	PCDV - 03-021	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Notylia trisepala</i>	PCDV - 03-022	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Oncidium cheiroporum</i>	PCDV - 03-023	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Oncidium cheiroporum</i>	PCDV - 03-024	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Mesospinidium endresii</i>	PCDV - 03-025	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Dracula riplejana</i>	PCDV - 03-028	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Masdevallia reinchebachiana</i>	PCDV - 03-030	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Zootrophion vulturiceps</i>	PCDV - 03-031	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Masdevallia chasei</i>	PCDV - 03-033	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Trichosalpinx blaisdellii</i>	PCDV - 03-034	-	-	-	-	+	+	-	2
<i>Restrepiopsis tubulosa</i>	PCDV - 03-036	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Zootrophion endresianum</i>	PCDV - 03-040	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Myoxanthus exasperatus</i>	PCDV - 03-041	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Octomeria valerioi</i>	PCDV - 03-043	-	-	-	-	-	+	-	1
<i>Restrepiella ophicephala</i>	PCDV - 03-045	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Zootrophion sp.</i>	PCDV - 03-047	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Dichaea cryptarrhena</i>	PCDV - 03-051	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Oncidium schroederianum</i>	PCDV - 03-053	-	-	-	-	-	+	-	1
<i>Oncidium sp.</i>	PCDV - 03-054	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Mesospinidium warscewiczii</i>	PCDV - 03-056	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Maxillaria ramonensis</i>	PCDV - 03-057	+	-	-	-	-	+	-	2
<i>Lockhartia obtusata</i>	PCDV - 03-058	+	-	-	+	-	-	+	3
<i>Chondrorhyncha lendyana</i>	PCDV - 03-059	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Maxillaria sp.</i>	PCDV - 03-060	-	-	-	-	+	+	-	2
<i>Prescottia sp.</i>	PCDV - 03-061	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Elleanthus caricoides</i>	PCDV - 03-062	-	-	+	+	+	+	-	4
<i>Elleanthus tonduzii</i>	PCDV - 03-063	+	-	+	+	-	+	-	4



## Lista vivero B, continuación:

Nombre especie	Código Proyecto								N° virus
		CymMV	ORSV	TRV	CymRSV	TSWV	Poty	CMV	
<i>Stanhopea</i> sp.	PCDV - 03-148	+	-	-	+	+	-	-	3
<i>Encyclia tandiflora</i>	PCDV - 04-003	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Maxillaria</i> sp.	PCDV - 04-004	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Encyclia</i> sp.	PCDV - 04-005	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Prosthecha prismatocarpa</i>	PCDV - 04-006	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Brassia gireoudiana</i>	PCDV - 04-007	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Oncidium cabagrae</i>	PCDV - 04-008	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Rossioglossum schlieperianum</i>	PCDV - 04-009	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Lacaena spectabilis</i>	PCDV - 04-013	-	-	-	-	XD	-	XD	0
<i>Epidendrum summerhayesii</i>	PCDV - 04-016	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Epidendrum lacustre</i>	PCDV - 04-017	-	-	-	-	-	-	XD	0
<i>Sobralia</i> sp.	PCDV - 04-018	+	+	+	+	-	-	-	4
<i>Encyclia alata</i>	PCDV - 04-019	-	+	-	-	-	-	-	1
<i>Rhynchoatele hortensiae</i>	PCDV - 04-022	+	-	-	-	-	+	-	2
<i>Maxillaria variabilis</i>	PCDV - 04-023	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Maxillaria inaudita</i>	PCDV - 04-027	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Lycaste macrophylla</i>	PCDV - 04-037	+	+	-	-	-	-	-	2
<i>Lycaste bradeorum</i>	PCDV - 04-039	+	-	-	-	XD	-	XD	1
<i>Lycaste brevispatha</i>	PCDV - 04-040	+	+	-	-	-	-	-	2
<i>Masdevallia</i> sp.	PCDV - 04-041	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Oncidium stenoglossum</i>	PCDV - 04-042	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Prosthechea campylostalyx</i>	PCDV - 04-043	+	+	-	-	-	-	-	2
<i>Lycaste dowiana</i>	PCDV - 04-044	-	+	-	-	-	-	-	1
<i>Otoglossum globuliferum</i>	PCDV - 04-045	+	-	-	-	-	+	-	2
<i>Trichopilia laxa</i>	PCDV - 04-046	+	+	-	-	-	+	-	3
<i>Aspasia epidendroides</i>	PCDV - 05 - 002	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Maxillaria angustisegmenta</i>	PCDV - 05 - 003	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Epidendrum oerstedii</i>	PCDV - 05 - 004	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Maxillaria rodrigueziana</i>	PCDV - 05 - 005	+	-	-	-	XD	-	XD	1
<i>Maxillaria cryptobulbon</i>	PCDV - 05 - 006	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Gongora tricolor</i>	PCDV - 05 - 008	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pleurothallis floribunda</i>	PCDV - 05 - 009	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pleurothallis powellii</i>	PCDV - 05 - 010	+	-	-	-	XD	-	-	1
<i>Trichopilia marginata</i>	PCDV - 05 - 012	+	-	-	-	-	-	XD	1
<i>Warszewiczella discolor</i>	PCDV - 05 - 013	-	+	-	-	-	-	-	1
<i>Epidendrum piliferum</i>	PCDV - 05 - 014	+	+	+	-	-	-	-	3
<i>Brassia arcuigera</i>	PCDV - 05 - 015	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Pleurothallis cardiothallis</i>	PCDV - 05 - 016	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Stanhopea warszewicziana</i>	PCDV - 05 - 018	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Trichopilia suavis</i>	PCDV - 05 - 019	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Encyclia baculus</i>	PCDV - 05 - 020	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Osmoglossum pulchellum</i>	PCDV - 05 - 022	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Scaphyglottis bifida</i>	PCDV - 05 - 023	+	-	-	-	-	-	-	1

## Lista vivero B, continuación:

Nombre especie	Código Proyecto	Código Proyecto							N° virus
		CymMV	ORSV	TRV	CymRSV	TSWV	Poty	CMV	
<i>Maxillaria bracteata</i>	PCDV - 05 - 025	-	-	-	-	X D	-	X D	0
<i>Encyclia coccleatha</i>	PCDV - 05 - 027	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Oncidium sp.</i>	PCDV - 05 - 028	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Oncidium stenotis</i>	PCDV - 05 - 029	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Arpophyllum giganteum</i>	PCDV - 05 - 030	+	+	-	-	-	-	-	2
<i>Cattleya skinneri</i>	PCDV - 05 - 031	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Cattleya skinneri</i>	PCDV - 05 - 032	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Maxillaria amparoana</i>	PCDV - 05 - 038	+	+	+	-	+	-	-	4
<i>Eriopsis biloba</i>	PCDV - 05 - 039	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Coelogyne dayana</i>	PCDV - 05 - 040	-	+	-	-	-	-	-	1
<i>Epidendrum stanfordianum</i>	PCDV - 05 - 041	+	-	-	-	-	+	-	2
<i>Cattleya sp.</i>	PCDV - 05 - 042	-	-	-	-	+	-	-	1
<i>Cattleya bowringiana</i>	PCDV - 05 - 043	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Oncidium bracteatum</i>	PCDV - 06 - 001	+	+	-	-	-	-	-	2
<i>Maxillaria ctenostachya</i>	PCDV - 06 - 002	-	-	+	+	-	-	-	2
<i>Oncidium inthmi</i>	PCDV - 06 - 003	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Epidendrum radicans</i>	PCDV - 06 - 004	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Scaphyglottis bidentata</i>	PCDV - 06 - 005	-	-	-	-	+	-	+	2
<i>Scaphyglottis imbricata</i>	PCDV - 06 - 006	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Gongora amparoana</i>	PCDV - 06 - 007	+	-	-	-	-	-	X D	1
<i>Oncidium klotzchianum</i>	PCDV - 06 - 008	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>Encyclia ionocentra</i>	PCDV - 06 - 009	-	+	+	-	-	-	+	3
<i>Pescatorea cerina</i>	PCDV - 06 - 010	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>Sobralia cf. bradeorum</i>	PCDV - 06 - 011	+	+	+	+	-	-	+	5

Nota: Poty= potyvirus; XD = planta extraviada o destruida antes del ensayo; + = resultado positivo; - = resultado no positivo.

## Apéndice VI

Lista de plantas analizadas para detectar la presencia de inclusiones virales por microscopia de luz.

<b>Especie</b>	<b>Código Proyecto</b>
<i>Oncidium</i> sp.	PCDV 01 - 013
<i>Notylia trisepala</i>	PCDV 03 - 019
<i>Myoxanthus exasperatus</i>	PCDV 03 - 041
<i>Restrepiella ophicephala</i>	PCDV 03 - 045
<i>Chondrorhyncha lendyana</i>	PCDV 03 - 059
<i>Sobralia marophylla</i>	PCDV 03 - 072
<i>Pleurothallis fulgens</i>	PCDV 03 - 098
<i>Pleurothallis rowleei</i>	PCDV 03 - 102
<i>Pleurothallis longipedicellata</i>	PCDV 03 - 103
<i>Pleurothallis</i> sp.	PCDV 03 - 119
<i>Cochleanthes aromatica</i>	PCDV 03 - 135
<i>Maxillaria variabilis</i>	PCDV 04 - 023
<i>Oncidium stenoglossum</i>	PCDV 04 - 042
<i>Stanhopea warsewicziana</i>	PCDV 05 - 018
<i>Osmoglossum pulchellum</i>	PCDV 05 - 022
<i>Cattleya skinneri</i>	PCDV 05 - 031
<i>Maxillaria ringens</i>	PCDV 05 - 038

