

9. Enfermedades causadas por virus

Carlos Ariel Ángel C.
Masanobu Tsubota N.
Jairo E. Leguizamón C.
Gabriel Cadena G.

Cómo Citar:

Ángel, C. A., Tsubota, M., Leguizamón, J. E., & Cadena, G. (2001). Enfermedades causadas por virus. En C. A. Ángel, M.

Tsubota, J. E. Leguizamón, R. Cárdenas, B. Chaves, G. Cadena, & A. E. Bustillo (Eds.), *Enfermedades y Plagas en*

Cattleyas. (pp. 113–176). Cenicafé. https://doi.org/10.38141/10791/0024_5



Virus en orquídeas.

- ♦ Aspectos generales.
- ♦ Virus en *Cattleya* spp. Lindl.

Virus del mosaico del *Cymbidium* (CyMV – Potexvirus)

Virus de la mancha anular del *Odontoglossum* (ORSV – Tobamovirus).

Diagnóstico de virus en orquídeas.

- ♦ Pruebas Biológicas.
- ♦ Pruebas Serológicas.
- ♦ Pruebas de Microscopía.
- ♦ Pruebas Moleculares.

Estudios de reconocimiento de los virus CyMV y OSRV en distintos países.

Reconocimiento de la presencia de los virus CyMV y OSRV en Colombia.

- ♦ Aspectos generales.
- ♦ Diagnóstico.
- ♦ Microscopía electrónica de transmisión (MET).
- ♦ Diagnóstico por síntomas.

Consideraciones sobre la utilización de plantas indicadoras y ELISA en el reconocimiento de CyMV y OSRV .

- ♦ Plantas indicadoras.
 - ♦ Síntomas de lesiones locales
 - ♦ Nutrición y Fertilización.
 - ♦ Composición del buffer de extracción
 - ♦ Inhibidores.
 - ♦ Estado de la muestra.
 - ♦ Factores externos y propios de la planta.
- ♦ ELISA.
 - ♦ Criterio de evaluación.
 - ♦ Ubicación y posibles contaminaciones.
 - ♦ Importancia de las repeticiones.
 - ♦ Valores de absorbancia obtenidos.
 - ♦ Calidad de los reactivos.
 - ♦ Estado de la muestra.
 - ♦ Resultados “falsos” y reacciones “no específicas”

Recomendaciones básicas para el manejo preventivo y curativo de enfermedades virales.

Literatura Citada

Virus en Orquídeas

Aspectos Generales.

La familia de las orquídeas, por contar con aproximadamente 20.000 a 35.000 especies y por lo menos 100.000 híbridos, presenta también una alta diversidad en los virus que la afectan y en los síntomas ocasionados por su ataque. Se tienen registrados en la literatura aproximadamente 25 a 27 virus, de los cuales se conoce su taxonomía, morfología y dimensiones de las partículas, los síntomas producidos, los medios de transmisión, las lesiones locales en hospedantes y su distribución geográfica, entre otros (72, 76, 112). En la Tabla 7, se incluye esta información resumida (72, 76).

Virus en *Cattleya* spp.

La presencia histórica de virus en cattleyas se registra gracias a la ilustración de una planta de *Cattleya labiata* var. *Alfrediana*, llegada a Inglaterra en 1890 y comparada por Schelpe (101), quien observó en esta ilustración síntomas de distorsión en la distribución del color, similares a los registrados en la literatura como característicos del virus del mosaico del tabaco raza orquídeas (TMV-O), ó virus de la mancha anular del *Odontoglossum* (ORSV). Sin embargo, este mismo autor se extraña de la falta de observación de los cultivadores en esa época, ya que esta sintomatología es comparable con la virosis del tulipán, ya conocida en Europa en el siglo XIX. Sólo hasta mediados del siglo XX se referenció científicamente la existencia de dos virus que afectan orquídeas incluyendo a *Cattleya* sp. Nobrega (95) informó sobre la presencia y transmisión de un virus en *Dendrobium nobile* en Brasil, y Jensen (52) estudió un virus del mosaico en *Cattleya* y su transmisión por áfidos con resultados parciales. El virus del mosaico del *Cymbidium* fue registrado por Jensen (53, 54) y el virus de la mancha circular o anular del *Odontoglossum* por Jensen y Gold (57). A partir de estas publicaciones se iniciaron los trabajos para conocer la sintomatología, las plantas hospedantes, las propiedades físicas y bioquímicas y la morfología de las partículas virales, entre muchos otros.

Jensen (55), registra en *Cymbidium* cuatro virus diferentes que causan mosaicos, moteados en forma de diamante, manchas anulares necróticas y moteados necróticos lineales o en barras, todos ellos con capacidad de transmitirse a *Cattleya*. Este autor registró en forma concreta los virus CyMV y ORSV como causantes de los dos primeros síntomas, respectivamente.

Tabla 7. Virus registrados en orquídeas (74, 78).

VIRUS		MORFOLOGÍA DE LA PARTÍCULA	DIMENSIÓN (nm)	SÍNTOMAS EN FLORES	MEDIOS DE TRANSMISIÓN	HOSPEDANTES CON LESIONES LOCALES	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
Con forma de bastón							
Virus del Mosaico del <i>Cymbidium</i> (CYMV)	Flexuosa	415-475 x 13-18	Necrosis de Catelejas blancas y coloreadas. Distorsión del color en <i>Dendrobium superbum</i> . Células con necrosis blanca en Catelejas llas	Savia, herramientas de corte, recipientes, aguas de riego.	<i>Cassia</i> spp., <i>Chenopodium amaranticolor</i> , <i>Ch. quinoa</i> , <i>Datura stramonium</i> , <i>Tetragonia expansa</i> .	Todo el mundo.	
Virus del Mosaico del Tabaco de las orquídeas (TMV-O) Incluye Virus de la Mancha Circular del <i>Odontoglossum</i> - (ORSV).	Rígida	280-320 x 15-24	Distorsión oscura del color	Savia, herramientas de corte, recipientes, aguas de riego, residuos de plantas.	<i>Chenopodium</i> spp., <i>Gomphrena globosa</i> , <i>Tetragonia expansa</i> , algunas especies de tabaco.	Todo el mundo	
Virus del Mosaico Amarillo del Frijol (BYMV)	Flexuosa	750 x 13	No registrado	Savia y áfidos	<i>Ch. quinoa</i> , <i>Vicia faba</i> .	Japón, Estados Unidos, Alemania.	
Virus del Mosaico del <i>Dendrobium</i> (DeMV)	Flexuosa	750 x 13	Sin síntomas	Savia y áfidos	<i>Ch. quinoa</i> , <i>Ch. amaranticolor</i> .	Japón.	
Virus de las Nervaduras Amarillas del Trébol (CYW-C)	Flexuosa	750 x 12	Necrosis.	Savia y áfidos	<i>Vicia faba</i> , <i>Pisum sativum</i> .	Japón.	
Virus de la Necrosis de Nervaduras del <i>Dendrobium</i> (DVM).	Flexuosa	1865	Necrosis de nervaduras.	No registrado	No reportado.	Alemania, Estados Unidos.	
Virus Filamentoso del <i>Cypripedium</i> (CF - sin nombrar).	Flexuosa	772	No registrado	Transmisión mecánica no exitosa.	Ninguna.	Alemania.	
Virus del Mosaico del Nabo.	Flexuosa	745	No registrado	Savia y Áfidos.	<i>Nicotiana clevelandii</i> , <i>Ch. quinoa</i> .	Alemania.	
Virus del Mosaico "curvado" del Tabaco (TRV).	Rígida	65 y 193	Flores deformes.	Savia.	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi.	Alemania.	

(Continúa).



Tabla 7. Virus registrados en orquídeas (74, 78) (Continuación).

VIRUS	MORFOLOGÍA DE LA PARTICULA	DIMENSIÓN (nm)	SÍNTOMAS EN FLORES	MEDIOS DE TRANSMISIÓN	HOSPEDANTES CON LESIONES LOCALES	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
Virus del Mosaico de la Vanilla.	Flexuosa	767	No registrado	Áfidos.	No registrado	Polinesia Francesa.
Virus con Forma Isométrica Anular del <i>Cymbidium</i> (CyRSV).	Isométrica	30	No registrado	Savia, suelo	<i>Ch. amaranticolor</i> , <i>Emilia sagittata</i> , <i>Nicotiana clevelandii</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> cv The Prince.	Inglatera.
Virus del Mosaico del Cocombro (CMV).	Isométrica	30	Distorsión moderada del color.	Savia y áfidos.	<i>Ch. amaranticolor</i> , <i>Citullus vulgaris</i> , <i>Datura stramonium</i> , <i>Sesamum</i> sp.	Japón.
Virus del Mosaico Suave del <i>Cymbidium</i> (CyMNV).	Isométrico	28	No registrado	Savia.	<i>Ch. amaranticolor</i> .	Korea.
Virus Isométrico de Trichopilia (TI - sin nombrar)	Isométrico	28	No registrado	No reportado.	No registrado	Alemania.
Virus Isométrico de <i>Mádevalia</i> (MI - sin nombrar).	Isométrico	No registrado	No registrado	Transmisión mecánica no exitosa.	No registrado	Colombia.
Virus de la Mancha Anular del Tomate (TomRSV)	Isométrico	30	No registrado	Savia (a la planta indicadora, pero no a la orquídea)	<i>Nicotiana tabacum</i> var kentucky 35. <i>Vigna unguiculata</i> .	Estados Unidos.
En forma de bala o Baciliformes						
Virus del tipo de los Rhabdovirus cortos.						
Rhabdovirus Corto de las Orquídeas (KORV).	Baciliforme en forma de bala.	47 x 105	No registrado	Savia.	<i>Ch. quinoa</i> , <i>Ch. amaranticolor</i> , <i>N. clevelandii</i> .	Dinamarca, Alemania.
Virus del Dendrobium (DV).	Baciliforme en forma de bala.	50 x 120	No registrado	No registrado	No registrado	En <i>Dend. Inoglossum</i> de Nueva Guinea, Alemania, Japón.
Virus del "Punteado" de las Orquídeas (OFV).	Baciliforme en forma de bala.	40 x 150	No registrado	Savia a temperaturas de 30°C.	<i>Ch. quinoa</i> , <i>Ch. amaranticolor</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>N. glutinosa</i> .	Japón.
Rhabdovirus sin nombrar (RV - sin nombrar)	Similar a un bastón.	400 x 100-120	No registrado	No registrado	No registrado	Brasil.

(Continúa).

Tabla 7. Virus registrados en orquídeas (74, 78) (Continuación).

VIRUS	MORFOLOGÍA DE LA PARTICULA	DIMENSIÓN (nm)	SÍNTOMAS EN FLORES	MEDIOS DE TRANSMISIÓN	HOSPEDANTES CON LESIONES LOCALES	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
Rhabdovirus sin nombrar (RV - sin nombrar)	Similar a un bastón.	400 x 100-120	No registrado	No registrado	No registrado	Brasil.
Virus Baciliforme del Grammatophyllum (GBV).	Baciliforme en forma de bala	40-42 nm de ancho por largo variable.	No registrado	No registrado	No registrado	Maryland (USA)
Virus del tipo de los Rhabdovirus largos.	Baciliforme en forma de bala.	180, 320 x 85	Rayado blanco cuando está con CyMV. Si el DRV está solo, el síntoma es desconocido.	No registrado	No registrado	Hawaii (USA)
Rhabdovirus Largo de las Orquídeas (LOR).	Baciliforme en forma de bala.	176 x 83	No registrado	No registrado	No registrado	Alemania.
Virus de la Mancha Foliar Rojiza de <i>Laelia</i> (LRLSV).	Baciliforme en forma de bala.	190-220 x 80	No registrado	No registrado	No registrado	Alemania.
Virus Baciliforme de <i>Phalaenopsis</i> sin nombrar (PhBV - sin nombrar).	Baciliforme	119 x 29	No registrado	No registrado	No registrado	Alemania.
Tospovirus	Casi esférico.	85	No registrado	Savia y thrips.	<i>Petunia hybrida</i> , <i>Nicoliana benthamiana</i> .	Hawaii (USA)
Virus del Marchitamiento "Manchado" del Tomate (TSWV).	Casi esférico	85	No registrado	Savia y thrips.	<i>Petunia hybrida</i> , <i>Nicoliana benthamiana</i> .	California (USA)

Los virus del mosaico del *Cymbidium* (*Cymbidium Mosaic Virus* - CyMV Potexvirus) y de la mancha circular o anular del *Odontoglossum* (*Odontoglossum Ring Spot Virus* - ORSV Tobamovirus, éste último considerado antes como una raza o "cepa" del virus del mosaico del tabaco (TMV-O), son los de mayor importancia económica en el mundo en orquídeas, ya que afectan numerosos géneros y especies. Son de alta estabilidad y de fácil transmisión por medios mecánicos como herramientas de corte, o por propagación *in vitro* (asexual), lo cual ha contribuido a su alta incidencia en colecciones y cultivos comerciales en todo el mundo (16, 40, 70, 71, 74, 76, 108, 120). Las partículas de CyMV se han encontrado en células apicales de los brotes de *Cattleya*, los cuales se utilizan para obtener los meristemos para el cultivo *in vitro* (propagación masiva asexual), aunque resulta verdaderamente difícil pero posible la obtención de células sanas (70, 89). Con base en lo publicado por la American Phytopathological Society - APS (6, 7) para *Cattleya* spp. Lindl., y a pesar de existir un amplio número de virus que afectan a las orquídeas, CyMV y ORSV, son los únicos que hasta el momento están registrados como patógenos para las especies e híbridos de este género de orquídeas.

Virus del Mosaico del *Cymbidium* (CyMV - Potexvirus).

Este virus de cadena sencilla de ARN con partículas alargadas flexuosas en forma de bastón o de varilla, mide entre 415-475nm de largo por 13-18nm de ancho (26, 43, 76). Se diagnosticó por primera vez en California en *Cymbidium* spp. (53). En Hawaii, Murakishi (90) registró un virus en *Cattleya*, y Jensen (55) y Jensen y Gold (57), registraron la necrosis foliar en *Cattleya* ocasionada por CyMV. Posteriormente, Lawson (69), registró la necrosis floral causada por este mismo virus.

CyMV es un virus que probablemente está en todos los países productores afectando un amplio rango de géneros de orquídeas, aproximadamente 56 o más. Los síntomas generales en *Cattleya* spp. se presentan como moteados o manchas foliares necróticas o pardas, lisas o deprimidas, de formas definidas o irregulares que avanzan progresivamente hasta cubrir la lámina foliar, arrugándola y causando la caída prematura de la hoja. En los brotes se observan áreas cloróticas o ligeros amarillamientos que se acentúan hasta tomar la apariencia necrótica, y de igual forma, se puede producir deformación de los brotes de hojas jóvenes y reducción del crecimiento. Las formas típicas de las lesiones son los mosaicos y los moteados. En las flores puede ocurrir necrosis parda o rayado necrótico que pueden limitarse a las nervaduras o expandirse por toda la flor, síntomas que pueden aparecer

entre los 5 y 21 días después de la apertura floral, e incluso, después de cortadas para comercializarlas. No siempre las plantas afectadas presentan síntomas, ya que la expresión de estos puede afectarse por las condiciones ambientales predominantes, por el estado nutricional y sanitario de la planta y debido al manejo dado, entre otras. También se presentan diferencias en la resistencia y en la susceptibilidad de la planta al virus, fenómeno aún no estudiado profundamente (8, 9, 10, 11, 15, 53, 54, 55, 56, 57, 68, 69, 72, 73, 74, 75, 85, 86, 99, 119, 124).

El virus CyMV se inactiva a una temperatura entre 60 y 70°C, tiene una longevidad *in vitro* de 25 días, es decir, su extracto sólo es infectivo almacenado en nevera durante este período, y un punto final de dilución entre 10^{-6} a 10^{-7} , lo cual equivale a que es posible causar infección contando con sólo 1ml de un extracto concentrado del virus diluido en 1.000 litros de solvente, aproximadamente. En la actualidad se conoce sólo esta especie o raza de CyMV (26).

Virus de la Mancha Anular del *Odontoglossum* (ORSV-Tobamovirus).

Es un virus de cadena sencilla de ARN con partículas rígidas en forma de bastón, con dimensiones entre 280-320nm de largo, por 15-24nm de ancho. También se registra en la literatura como el virus del mosaico del tabaco raza o "strain" orquídea (TMV-O) (26, 72, 76). Aunque es similar morfológica y bioquímicamente al virus del mosaico del tabaco (TMV) (98) existen notables características que lo hacen una especie diferente de (TMV), (37). El virus ORSV se registró por primera vez en una planta de *Odontoglossum grande* recibida para diagnóstico en la Universidad de California (57). En *Cattleya* ocurre en detalle la distorsión del color causada en forma independiente por (ORSV), (71).

Se considera que el ORSV está distribuido en todo el mundo debido a que se transmite mecánicamente, ya que afecta mas de 20 géneros de orquídeas. Los síntomas característicos se observan en la flor, donde el virus puede producir distorsión o interrupción del color y necrosis clara de las células, alterando la distribución normal de los pigmentos en los sépalos y pétalos, lo cual se asemeja al fenómeno de variegación. Es posible visualizar líneas o manchas irregulares en las nervaduras, de una tonalidad más clara o más oscura que la normal, especialmente en aquellas de color lila, púrpura y oscuras. En los botones florales, específicamente en los sépalos, antes de la apertura también es posible

apreciar estas distorsiones y, en ocasiones, deformaciones de los mismos. Los síntomas en hojas corresponden a mosaicos y/o moteados, de formas definidas o irregulares con ligeros hundimientos de la haz y el envés, similares a los ocasionados por CyMV (8, 9, 10, 11, 15, 37, 57, 78, 69, 72, 73, 74, 85, 86, 99, 112, 120).

Es un virus bastante estable ya que su punto termal de inactivación es de 90°C y tiene un punto final de dilución de 10^{-6} . Se menciona la existencia de una sola especie de ORSV (26). Como ejemplo de la estabilidad de este tipo de virus, Dijkstra y De Jager (38), mencionan que es posible obtener infecciones del virus del mosaico del tabaco (TMV Tobamovirus) a partir de cigarros o tabacos ya procesados y que llevan un largo período de almacenamiento. Este virus se disemina en forma sistémica y es relativamente lento dentro de la planta de *Cattleya* después de la inoculación, retrasándose por varios meses su detección debido a su baja concentración. Sin embargo, debe buscarse en los órganos más jóvenes o recientemente formados cercanos al lugar de inoculación o penetración, resultando el área de la base de la hoja próxima al ápice del pseudobulbo un buen sitio para detectarlo (70). En plantas de orquídeas inoculadas la aparición de los síntomas varía entre 10 y 40 días, período de incubación para el ORSV. Por el contrario, CyMV es más fácil de detectar debido a su rápida infección sistémica y alta concentración en los tejidos nuevos (50).

La infección conjunta de ambos virus (CyMV y ORSV), se registró inicialmente de una manera incipiente mediante la diferenciación entre la morfología de las partículas virales obtenidas de muestras de *Cattleya* por Newton y Rosberg (90), y posteriormente se confirmó tanto en *Cattleya* (68, 69) como en *Cymbidium* (30), diferenciando algunas características entre ambos virus. Sin embargo, es verdaderamente difícil reconocer los síntomas de uno y otro virus individual y conjuntamente. CyMV y ORSV reducen el crecimiento de las plantas solos o en combinación, pero el efecto es más serio cuando hay infección conjunta, llegando en ocasiones a causar la muerte. Se aprecian también diferencias en la susceptibilidad entre los materiales afectados (37, 96, 97). No se conoce de plantas silvestres de orquídeas y específicamente de cattleyas afectadas por estos virus, de acuerdo con algunos trabajos de reconocimiento a partir de muestras obtenidas de diferentes países, principalmente del trópico americano, entre ellos Colombia, pero es muy frecuente encontrar estos dos virus en las distintas colecciones y cultivos de orquídeas en todo el mundo (22, 40, 119, 114, 115, 120). Hasta el momento no se ha comprobado transmisión por vectores como las especies de áfidos *Myzus persicae* y *Cerataphis orchidearum* (93), a pesar de que en uno de los primeros trabajos en virus de orquídeas se registró la transmisión por *M. persicae* en *Cattleya trianaei* (52). También lo registra Pirone, *et al.* (99). Tampoco se registra transmisión por polen o semillas, (89, 112).



Diagnóstico de Virus en Orquídeas

Al igual que sucede con otras familias de plantas (2), para la detección de estos virus en orquídeas se dispone de diversas metodologías que varían en su grado de complejidad y en su efectividad en el diagnóstico, teniendo en cuenta además la gran variabilidad en los síntomas y que éstos pueden confundirse con problemas causados por hongos, bacterias y desórdenes fisiológicos. De esta forma y gracias a los avances se cuenta con metodologías para el diagnóstico de virus como: plantas indicadoras, aglutinación de cloroplastos, doble difusión en agar, electroforesis, ELISA, microscopía electrónica, microscopía óptica, citopatología y pruebas moleculares como PCR, entre otras. A continuación se presentan algunos aspectos básicos de las más conocidas metodologías empleadas para diagnosticar CyMV y ORSV, tanto en *Cattleya* como en otros géneros de orquídeas.

Pruebas Biológicas.

Las plantas indicadoras son plantas por lo general herbáceas, pertenecientes a familias diferentes a la afectada, de las cuales se conoce su reacción en forma de lesiones locales o síntomas sistémicos al inocularlas con la savia de las plantas afectadas por virus. Por lo regular, se hace inoculación mecánica, es decir, se frota el extracto de la muestra sobre las hojas de la planta indicadora, con o sin ayuda de abrasivos como el carborundum, el cual causa heridas microscópicas en las células que permiten la entrada del virus y aumentan la efectividad de la inoculación (106). La evaluación de los síntomas locales o sistémicos depende inicialmente de la planta indicadora, pudiendo tardarse entre unos 3 o 4 días hasta 30 o más. Sin embargo, estas reacciones también pueden ser afectadas por condiciones internas de la planta o externas como el clima y la nutrición, afectando de por sí la calidad de la prueba. Se ha utilizado en orquídeas incluyendo las cattleyas en la mayoría de los casos (8, 9, 10, 11, 30, 36, 37, 54, 56, 57, 58, 64, 68, 69, 72, 73, 74, 91, 98, 112).

Brunt *et al.* (26) registran que *Chenopodium amaranticolor*, *Cassia occidentalis* y *Datura stramonium*, son las mejores plantas para el diagnóstico del virus CyMV y para evaluar síntomas en lesiones locales, los cuales aparecen después de los 5, 10 y 20 días de efectuada la inoculación, aproximadamente. Sin embargo, estos mismos autores mencionan otras plantas indicadoras susceptibles como *Gomphrena globosa*, *Cucumis sativus*, *Tropaeolum majus*, *Zinnia elegans* y *Oriza sativa*. De igual forma, para procesos de diagnóstico se describen especies de plantas no susceptibles a CyMV como *Beta vulgaris*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum*, *Petunia hybrida* y *Zea mays*, entre otras. Para ORSV estos

mismos autores registran como especies susceptibles a *Nicotiana tabacum* cv *Xanthi-nc*, *Cassia occidentalis*, *Chenopodium amaranticolor* y *Ch. quinoa*. También son susceptibles *Gomphrena globosa*, *Beta vulgaris*, *Nicotiana clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *Tetragonia expansa* y *Zinnia elegans*.

Pruebas Serológicas.

Se basan en la producción de anticuerpos los cuales son consecuencia de la respuesta del sistema inmune de animales como conejos, ratones, primates, etc. Los anticuerpos son proteínas específicas que el animal produce para contrarrestar la presencia de un agente extraño o antígeno y combatirlo. Por ejemplo, al inyectarle a uno de estos animales un virus purificado de una planta, el sistema inmune desarrolla un anticuerpo específico para este virus, de igual manera como ocurre en los seres humanos cuando son vacunados, inyectándoles los antígenos adecuados con el fin de que el sistema inmune genere los anticuerpos específicos para las distintas enfermedades. La prueba de aglutinación de cloroplastos es una de las pruebas serológicas más elementales para detectar virus en plantas. Para ello se requiere el anticuerpo del virus específico, el cual se obtiene mediante purificación de un sangrado de conejos o ratones inoculados con el virus purificado. Este anticuerpo o antisuero sólo será específico para el virus en estudio. De esta forma, al adicionar el anticuerpo a un extracto de savia de la planta por probar y debido a las reacciones serológicas se unirá el virus (si está presente en la planta muestra) con el antisuero específico formando agregados, aglutinados o precipitados. Si la muestra no está infectada con virus no se presentará aglutinación. También existe una prueba de precipitación en la cual los anticuerpos se adicionan a un tubo donde está diluido el antígeno (savia de la planta con virus), y después de un ligero calentamiento se pueden observar precipitados cuando la reacción serológica es positiva por la presencia del virus (73, 74, 107).

Doble difusión en agar es otra prueba serológica en la cual se aprovecha la capacidad de las proteínas (antígenos y anticuerpos) para migrar o difundirse a través de los poros de un gel o agar. Para ello se hacen orificios dentro de un plato con agar, ubicados a una determinada distancia entre ellos y se depositan en el orificio central el anticuerpo del virus y en los demás a su alrededor, los extractos de savia de la muestra. Si la muestra está afectada por el virus específico se formarán enlaces localizados a distancias intermedias entre los sitios u orificios donde se depositaron el anticuerpo y el antígeno (muestra) sujeto a la prueba. Las reacciones serológicas positivas se aprecian como aglutinados o bandas de agregados que indican la compatibilidad de ambas proteínas (21, 73, 74, 113, 114, 115, 119). La electroforesis aprovecha la migración de las proteínas dentro de un gel a determinado

pH, con ayuda de cargas eléctricas positivas y negativas, basada en la polaridad positiva de las proteínas. Las muestras de las plantas y los controles de anticuerpos del virus se ubican en carriles independientes en la parte superior del gel, y en los extremos de la cámara de electroforesis se ubican fuentes de poder eléctrico a voltajes determinados durante un período de tiempo. A medida que se aplica la carga eléctrica las distintas proteínas de la muestra (proteínas de la planta y proteínas virales si las hay), migran y se van ubicando en distintas posiciones de su carril en el gel por su peso o tamaño molecular, ocurriendo lo mismo para la proteína del antisuero. Las proteínas más pesadas quedan más cerca del sitio de salida y las más livianas más lejos. En términos generales, la identificación de una proteína viral dentro de la muestra se hace por comparación, al ubicarse su banda a la misma distancia donde se ubica la banda de la proteína del control positivo del virus, y por comparación con controles de marcadores de peso o tamaño molecular (42, 118). Con esta metodología, Frowd y Tremaine (42) registraron las propiedades serológicas de CyMV y su pertenencia a los Potexvirus, por estar relacionado con el Virus X de la Papa (PVX).

La prueba inmunoabsorbente de enzimas en cadena ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), también es una prueba serológica en la cual los anticuerpos específicos del virus por detectar se depositan en celdas dispuestas en un plato múltiple, para que se adhieran al fondo. Luego, se agregan en cada celda en forma independiente los extractos de savia de las muestras, los controles positivos del virus, los negativos y los blancos, para que las proteínas virales, si están presentes, se enlacen con las del anticuerpo. Seguidamente, después de un lavado se adiciona un conjugado enzimático específico para el virus, el cual en un extremo tiene una enzima enlazada (fosfatasa alcalina o peroxidasa), y en el otro extremo posee proteínas (globulinas) compatibles con las del virus. De esta manera, se permite el enlace de las partes compatibles del virus y la disposición libre de la enzima por el otro extremo. Finalmente, y posterior a otro lavado, se adiciona un sustrato que reacciona con la enzima generando color. Si las proteínas del virus están presentes se producen los enlaces en cadena, pero si no lo están, en los lavados intermedios se retiran aquellos componentes que no se enlazaron y se visualiza la reacción positiva (color) y la reacción negativa sin el desarrollo de color. ELISA es una prueba altamente sensible a bajas cantidades de virus en la muestra y por ser serológica es específica; sin embargo, también es susceptible de contaminación y de sufrir reacciones no específicas. Existen varias modificaciones a ELISA directo de doble capa, como lo registran Converse y Martin (35), entre ellas el ELISA indirecto, el cual posee pasos y procedimientos intermedios que finalizan en el mismo concepto de generación de color por la reacción sustrato - enzima (1, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 33, 45, 49, 72, 74, 87, 96, 97, 112, 120). En el mercado están disponibles "kits" o paquetes que incluyen todos los reactivos, los materiales y los

procedimientos necesarios para realizar ELISA directo, compuesto, en doble capa o "sandwich", tanto para CyMV como para ORSV, y algunos otros virus de orquídeas como lo utilizaron en sus investigaciones Mesnildrey *et al.* (87), Elliot *et al.* (40) y Angel *et al.* (8, 9, 10, 11). Entre los más conocidos están los kits producidos por Agdia Inc., (Estados Unidos) y por Sanofi (Francia). La prueba ELISA con anticuerpos monoclonales es una técnica serológica mucho más compleja y específica que la ELISA básica anterior que emplea anticuerpos policlonales. Cuando se habla de policlonales, quiere decir que es una mezcla que reconoce varios dominios (sectores de aminoácidos) de las proteínas virales, y de esta forma pueden reaccionar con diversos aislamientos de virus pertenecientes a un mismo tipo, e incluso, puede reconocer virus muy similares pertenecientes al mismo género. Por ejemplo, anticuerpos policlonales del virus mosaico del tabaco (TMV Tobamovirus) pueden reconocer dominios de proteínas de este mismo virus procedentes de diferentes fuentes y también de razas del mismo TMV, incluso puede llegar a hacerlo con el virus de la mancha circular o anular del *Odontoglossum* (ORSV Tobamovirus).

En cambio, en los anticuerpos monoclonales sólo existe un tipo de anticuerpo y se desarrollan para reconocer dominios particulares en una proteína. Un anticuerpo monoclonal sólo pueden reaccionar con dominios de proteínas exactamente iguales a las utilizadas para la producción de éste. Como los virus pueden también mutar o alterarse, el anticuerpo monoclonal no reconoce aislamientos virales ni razas de virus diferentes al que fue su origen. Por ejemplo, se desarrolla un monoclonal para el aislamiento A de un virus ORSV obtenido de una planta procedente de Europa, el cual se va a probar contra una muestra de una planta, posiblemente con ORSV de Colombia. Si el virus ORSV presente en la planta por probar es exactamente el mismo, el monoclonal A se enlazará, pero si hay pequeñas diferencias en la proteína del virus de la muestra no ocurrirá el enlace.

El procedimiento para obtener monoclonales es complejo, ya que luego de obtener el aislamiento de un virus determinado se inyecta en conejos o en huevos de gallina para obtener, por reacciones inmunes, un antisuero normal. Las células encargadas de la producción de la reacción del sistema inmune del animal se llevan a cultivos en medios especiales con condiciones muy específicas de laboratorio para realizar allí procesos de fusión celular o desarrollo de clones. Después de obtener estos clones se incrementan ya sea *in vivo* en ratones o *in vitro* en el laboratorio, obteniéndose así el anticuerpo para sólo un clon.

Al contar ya con el anticuerpo, se siguen los procedimientos para la realización del ELISA de manera similar a los antes descritos. Vejaratpimol *et al.* (109) mostraron avances en la producción de

anticuerpos monoclonales para CyMV y Dore *et al.* (39), utilizaron los anticuerpos monoclonales para diagnosticar parcialmente ORSV de varias orquídeas incluyendo *Cattleya*, pero esta técnica es poco utilizada dada su complejidad. Hu *et al.* (54) aplicaron los anticuerpos monoclonales en la realización de técnicas moleculares más avanzadas como el "dot-blot", "immuno-blot" e "immuno tissue-blot", para la detección de CyMV, pruebas de mayor sensibilidad que ELISA.

Pruebas de Microscopía.

Esta parte está compuesta por dos procedimientos básicos, los de microscopía electrónica y los de microscopía óptica o de luz. Los microscopios ópticos por ejemplo, llegan a unos 1000 aumentos o un poco más, mientras que un microscopio electrónico puede aumentar 30.000, 60.000 y muchas veces más, permitiendo medir milmillonésimas partes de un metro, valores de 10^{-9} a 10^{-10} metros, es decir nanómetros (nm) y Amstrongs, (Å°), respectivamente.

La microscopía electrónica, concretamente la de transmisión (MET), es una técnica sencilla pero a la vez compleja, en el sentido que requiere un equipo altamente especializado y costoso como es el microscopio electrónico, además de la experiencia para su realización. Se basa en el bombardeo de electrones por un filamento dentro de una cámara de vacío los cuales llegan a una rejilla recubierta y en la cual se encuentra el extracto de la muestra o el tejido a observar. La muestra se tiñe previamente con reactivos que se excitan al llegar los electrones disparados por la fuente del equipo. La observación de las partículas de la muestra ocurre cuando ésta emite luz al reflejar los electrones, permitiendo que estos lleguen a una lente similar a un espejo que proyecta las imágenes sobre oculares y objetivos. Cuando se hace tinción negativa de la muestra se hace en forma negativa, los cuerpos oscuros se ven claros y los cuerpos claros se ven oscuros. Varios autores han utilizado esta metodología para el estudio de estos virus en orquídeas (8, 9, 10, 11, 36, 37, 43, 49, 57, 73, 74, 76, 94, 92, 98, 110, 112, 113).

La citopatología o ultraestructura es una técnica histológica que se realiza con la ayuda de la microscopía electrónica y consiste en tomar tejidos vegetales fijados, deshidratados e incluidos en polímero, cortados en secciones muy delgadas (finas y ultrafinas) menores a 1 micra (10^{-6} metros de espesor), con la ayuda de micrótomos. Estos cortes se tiñen y se ubican en rejillas para observarlas en el microscopio electrónico de transmisión como antes se explicó. De esta forma, puede observarse la localización del virus y los efectos causados en las células de la planta. A su vez puede detallarse, la morfología de las inclusiones

virales (agregados de partículas del virus) y/o viroplasmias en aumentos considerables como 20.000 o 30.000 veces o más (8, 9, 10, 11, 46, 47, 70, 110). Existe una técnica que combina la serología con la microscopía electrónica llamada inmunomicroscopía electrónica o ISEM (immunosorbent electronic microscopy). En ésta, el extracto de savia de la muestra en proceso se trata con el anticuerpo del virus y si resulta positiva, se forman los enlaces de complejos antígeno - anticuerpo que reconocen las proteínas. Estos agregados pueden observarse mediante el microscopio electrónico. Esta técnica es utilizada especialmente cuando se desea conocer la identidad del virus. En aquellos casos cuando hay que definir a cuál género pertenece, se agregan anticuerpos de los posibles géneros o virus relacionados para observar la compatibilidad serológica. Por ejemplo, si una muestra de orquídea está infectada con un virus, posiblemente el del mosaico del Cymbidium (CyMV), se le adicionan anticuerpos del virus del mosaico del tabaco (TMV - Tobamovirus) y ésta no va a formar enlaces, mientras que si se le adicionan anticuerpos del virus X de la papa (PVX - Potexvirus), se presenta reacción positiva, ya que el CyMV es un Potexvirus similar y relacionado con el PVX. Esta técnica se puede utilizar como complemento a la prueba de ELISA para detectar virus en orquídeas (12, 49)

La tinción en microscopía óptica consiste en tomar los tejidos de las muestras en proceso, los cuales se decoloran retirando la clorofila mediante alcoholes, para luego deshidratarlos. Posteriormente se tiñen con colorantes específicos que reaccionan con los ácidos nucleicos que pueden estar en el núcleo, en los cloroplastos y en las inclusiones virales. De acuerdo con la morfología de los cuerpos visibles, mediante la coloración pueden identificarse las inclusiones virales producto de la agregación de numerosas partículas de los virus. Cada grupo o género de virus produce inclusiones con formas o apariencias determinadas. Esta identificación de inclusiones virales puede hacerse desde 200 aumentos hasta 1.000 o 2.000 aumentos en microscopios ópticos. Esta técnica requiere experiencia y conocimiento de los virus en estudio (32, 64, 65, 113). Las pruebas inmunocitoquímicas utilizan fundamentos de la microscopía óptica de fluorescencia y de la inmunomicroscopía electrónica. En la primera de ellas, el extracto de la muestra se trata con el anticuerpo del virus y se tiñen con reactivos especiales que marcan los complejos antígeno - anticuerpo. Estos agregados, producto de reacciones serológicas específicas, al observarlos bajo lámparas especiales excitan los reactivos fluorescentes y se pueden observar claramente. La otra técnica toma los tejidos y se tiñen o marcan con una proteína conjugada del virus en estudio con oro coloidal. Estos tejidos se fijan, se deshidratan y se incluyen en resinas, para luego realizar cortes ultrafinos y llevarlos a observación en el microscopio electrónico de transmisión, donde se pueden apreciar con relativa facilidad las inclusiones virales marcadas con oro. Esta última técnica se conoce como marcación con proteína A-Oro y la

utilizaron Ko *et al.* (66) para la identificación de CyMV y ORSV en orquídeas.

Pruebas Moleculares.

Las pruebas moleculares enfatizan su estudio en los componentes principales de los organismos como los ácidos nucleicos que conforman los genes y los aminoácidos que componen las proteínas codificadas por los genes. Los virus están compuestos de un ácido nucleico, ARN (ácido ribonucleico) o de ADN (ácido deoxiribonucleico), sea en cadena sencilla o doble, y por una proteína de la cápside que los recubre. Los virus se replican dentro de la célula insertándose en los ácidos nucleicos, y acoplándose al metabolismo de la misma, alterando su estructura y por ende, modificando el funcionamiento de las células. Estos ácidos nucleicos están formados por cadenas de nucleótidos, ordenadas de tal manera que codifican para la secuencia de aminoácidos los cuales componen la proteína que conforma el virus. Para el caso de los virus CyMV y ORSV que afectan *Cattleya* spp., el ácido nucleico que los compone es ARN de cadena sencilla.

Una de las técnicas moleculares empleadas para el diagnóstico de estos dos virus es la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa RT-PCR. Como la reacción en cadena de la polimerasa PCR requiere como ácido nucleico base o molde el ADN de doble cadena, es necesario sintetizar a partir del ARN del virus un ADN complementario mediante una enzima especializada llamada transcriptasa inversa. En investigaciones anteriores se han diseñado, fabricado y están disponibles en el mercado «primers», cebadores o indicadores, que son secuencias conocidas de bases de un tamaño definido, elaborados nucleótido por nucleótido específicamente para permitir amplificar o sintetizar exponencialmente esta secuencia para la cual fueron diseñadas. En este caso los cebadores o «primers» se obtuvieron para posiciones específicas del ADN de la cubierta proteínica sintetizado a partir del ARN obtenido del virus CyMV. Después de tener el ADN complementario de la muestra se realiza un proceso de amplificación mediante una enzima polimerasa resistente a alta temperatura y equipos especiales en condiciones específicas donde se adicionan los cebadores y bases nitrogenadas libres, con el fin de sintetizar miles de veces la secuencia específica (PCR). De esta forma, si el ADN complementario de la muestra no es del virus, los cebadores específicos no se van a unir a ella y no se amplificará ninguna secuencia. Cuando se lleva a cabo una electroforesis, las copias de la secuencia amplificada de ADN se visualizan en el gel como bandas de un tamaño específico, el cual se determina utilizando marcadores de



peso molecular. Deben establecerse controles positivos con la secuencia específica del virus y controles negativos. La detección de CyMV empleando la técnica de PCR la utilizaron Lim *et al.* (78) y la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa RT-PCR fue utilizada por Ryu *et al.* (100), para detectar CyMV en extractos crudos de hojas infectadas con el virus. Esto lo hicieron a partir del conocimiento de la secuencia de la cubierta proteínica de virus donde diseñaron los cebadores o «primers» específicos que amplificaran fragmentos específicos. Dentro de las pruebas moleculares empleando los ácidos nucleicos del virus, Chia *et al.* (31), realizaron la detección de CyMV y ORSV utilizando hibridación de la impresión del tejido. Para esto, se impregna savia directamente del corte de la muestra sobre una membrana de nitrocelulosa, procesada con un tipo de ADN marcado del virus por detectar. Finalmente, por procesos de autoradiografía de la membrana impregnada se aprecian si hubo adherencia (hibridación) del ADN y se identifica la presencia o la ausencia del virus. Esta metodología la recomienda para determinar la infección por virus en distintas partes de la planta y conocer el movimiento del mismo. Otra técnica menos conocida por ser más reciente pero de mayor complejidad, es la inmunocaptura de la reacción en cadena de la polimerasa (Immunocapture-PCR) y el análisis de secuencias, un acoplamiento de técnicas de biología molecular con principios de inmunología o serología empleadas para el diagnóstico de CyMV y ORSV por Barry *et al.* (14). Estos procedimientos son altamente específicos y requieren reactivos y equipos especializados, pero cada día se utilizan más en la investigación de éstos virus.

Estudios de Reconocimiento de los Virus CyMV y ORSV en Distintos Países.

Los estudios de reconocimiento pretenden determinar la cantidad de plantas de una muestra o de una población que presentan los virus de interés en este caso CyMV y ORSV. En distintos trabajos de reconocimiento y detección de virus de orquídeas se han encontrado el Virus del Mosaico del *Cymbidium* (CyMV - Potexvirus), como el de mayor incidencia en los cultivos de orquídeas en el mundo, infecciones más severas en plantas pertenecientes a la Alianza *Cattleya* (especies e híbridos interespecíficos e intergenéricos entre *Cattleya* spp., y géneros afines taxonómicamente como *Laelia*, *Epidendrum*, *Brassavola*, entre otros). Para el virus de la mancha anular del *Odontoglossum* (ORSV - Tobamovirus), son menores los niveles de incidencia y de forma similar, para la infección conjunta por ambos virus. Una comparación resumida de los resultados en el ámbito internacional para este tipo de estudios con los dos virus puede apreciarse en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados obtenidos en distintos trabajos de reconocimiento de CyMV y ORSV, tanto en *Cattleya* spp., como en otros géneros de orquídeas (Porcentajes de muestras infectadas).

REFERENCIA	VARIOS GÉNEROS				CyMV + ORSV %	"DUDOSOS" %
Zettler <i>et al.</i> (119) Florida	Incluye <i>Cattleya</i>				10	8
Wisler <i>et al.</i> (113) Polinesia Francesa	Incluye <i>Cattleya</i> y <i>Vanilla</i>				0	2,08
	No incluye <i>Cattleya</i> , <i>Vanilla</i>				0	20,27
Zettler <i>et al.</i> (120), Florida	No incluye <i>Cattleya</i>				5,1	--
Hu <i>et al.</i> (49), Hawaii	Incluye <i>Cattleya</i>				17	--
Mesmildrey <i>et al.</i> (87), Guadalupe	No incluye <i>Cattleya</i>				19,8	17,7
	1a serie 1990 (Sin <i>Cattleya</i>)				9,8	18,4
	1a serie 1990 (Con <i>Cattleya</i>)				2	3
	2a serie 1991 (Sin <i>Cattleya</i>)				1,66	4,33
	2a serie 1991 (Con <i>Cattleya</i>)				1,57	4,14
Wong <i>et al.</i> (117), Singapur	12 Géneros C. Comerciales.				4	14,2
	29 Géneros J. Botánicos.				1	8
	13 Géneros <i>In vitro</i> J. Botánico.				0	1
Kaminska <i>et al.</i> (91), Polonia	102 muestras especies e híbridos				54	42
Elliot <i>et al.</i> (40) Florida y Otros	No incluye <i>Cattleya</i>				14,76	--
Zettler <i>et al.</i> (119) Florida	Incluye <i>Cattleya</i>				CyMV y/o ORSV	26,78%
	No incluye <i>Cattleya</i>				CyMV y/o ORSV	19,69%
Wisler <i>et al.</i> (114) USA	No incluye <i>Cattleya</i>				CyMV y/o ORSV	23,61%
REFERENCIA	<i>Cattleya</i> spp.				CyMV + ORSV %	"DUDOSOS" %
Zettler <i>et al.</i> (120) Florida					7	--
Mesmildrey <i>et al.</i> (87), Guadalupe	1a serie 1990				8	14
	2a serie 1991				1	3
Hu <i>et al.</i> (49), Hawaii					11,1	8,3
Elliot <i>et al.</i> (40) Florida y Otros					27,77	--
Angel y Tsubota (8, 10), Colombia	6 especies Col.				21,96	8,7
Angel y Tsubota (11), Colombia	6 especies Col.				12	5,2
Angel <i>et al.</i> (9, 11), Colombia	6 especies Col.				7,2	3
Angel <i>et al.</i> (9, 11), Colombia	6 especies Col.				5	2,9
Zettler <i>et al.</i> (119), Florida	Especies de <i>Cattleya</i>				CyMV y/o ORSV	48,71%
	Híbridos de <i>Cattleya</i> y afines				CyMV y/o ORSV	47,36%
Wisler <i>et al.</i> (114) USA					CyMV y/o ORSV	29,62%



Reconocimiento de la presencia de los virus CyMV y ORSV en Colombia.

Aspectos Generales

En el reconocimiento e identificación de enfermedades y plagas en cattieyas colombianas (8, 9, 10, 11) se presentó como uno de los objetivos la necesidad de "Determinar cuáles disturbios de origen patológico causados por hongos, bacterias, virus y nematodos, afectan a las especies *Cattleya aurea*, *C. mendelii*, *C. quadricolor*, *C. schroderae*, *C. trianaei* y *C. warscewiczii*". Como parte de este objetivo y de acuerdo con los registros existentes en algunas de las publicaciones generales sobre las enfermedades de las orquídeas (28, 29, 44, 103), se planteó para esta parte de la investigación relacionada con virus, determinar la presencia de los virus del mosaico del *Cymbidium* (CyMV Potexvirus) y de la mancha anular del *Odontoglossum* (ORSV Tobamovirus), como causantes de mosaicos y/o moteados, manchas foliares y distorsión del color de la flor, entre otros síntomas, en las seis especies de *Cattleya* mencionadas.

Diagnóstico

Para el reconocimiento se tomaron muestras de mosaicos y/o moteados especialmente y se agruparon y codificaron de acuerdo con los síntomas citados en la literatura para CyMV y ORSV antes mencionados (24, 72, 76, 112). Teniendo en cuenta que los virus (CyMV y ORSV) que afectan a *Cattleya* son sólo transmitidos mecánicamente, las muestras se cortaron con herramientas desinfectadas con hipoclorito de sodio en soluciones superiores al 2%, alcohol al 90% con fuego para inactivar los posibles virus en los utensilios (48, 67). Se seleccionaron plantas con síntomas en 18 cultivos visitados en los departamentos de Antioquia (7 cultivos), Caldas (3 cultivos), Risaralda (2 cultivos) y Valle del Cauca (6 cultivos) (8, 9). Luego se tomaron muestras en 14 cultivos adicionales ubicados en Risaralda (5 cultivos), Caldas (1 cultivo), Santander (1 cultivo), Valle del Cauca (4 cultivos) y Cundinamarca (3 cultivos) (10, 11). La totalidad de los 32 muestreos para estos trabajos abarcó cultivos comerciales y no comerciales (aficionados), en diversas condiciones, distintos niveles de tecnificación y diferentes tamaños, ubicados entre los 900 y 2.250msnm, con valores promedio de humedad relativa entre 50 y 90% y de temperatura entre 17 y 25°C. Las metodologías utilizadas para realizar los trabajos de reconocimiento y de diagnóstico se registran y explican detalladamente en el capítulo del Apéndice Metodológico.

Sin embargo, para ilustrar un poco la forma como se hizo el estudio se mencionan algunos aspectos generales de los métodos empleados por estos autores y se presentan en forma resumida los principales resultados obtenidos: Se utilizaron inicialmente las plantas indicadoras como una prueba previa o de exploración para el diagnóstico de los virus y luego se usó como técnica de identificación definitiva las pruebas ELISA, recurriendo a kits comerciales para CyMV y ORSV con peroxidasa y fosfatasa alcalina, siguiendo las recomendaciones de la firma productora AgDia Inc. (Elkhart, Indiana, USA), y algunas bases dadas en la literatura. Para muestras controles o testigos se empleó la microscopía electrónica de transmisión (MET). Los experimentos de plantas indicadoras y ELISA se realizaron en los laboratorios de Fitopatología de Cenicafé y la microscopía electrónica en la Unidad de Virología del CIAT. Los procedimientos detallados se incluyen en el Apéndice Metodológico. Las muestras ELISA se dividieron en siete grupos y se procesaron con kits peroxidasa (grupos 1 al 4 y la repetición del 5 al 7), y con fosfatasa alcalina (grupos del 5 al 7), modificando en algunas partes los procedimientos básicos (Tabla 9).

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Como técnica de apoyo confirmatoria para algunas muestras seleccionadas y para algunos testigos utilizados en plantas indicadoras y sobre todo en ELISA, se utilizó la microscopía electrónica de transmisión con la colaboración de la Unidad de Virología del CIAT, en la cual se trabajaron la tinción negativa y la citopatología, como se explica con más detalles en el Apéndice Metodológico. En el caso del diagnóstico de virus en orquídeas y concretamente de CyMV y ORSV en *Cattleya*, que posee tejidos suculentos donde los virus se replican con mayor facilidad, la microscopía electrónica es una herramienta valiosa y relativamente fácil de aplicar. Con metodologías como "leaf-dip", donde se deposita la savia de la muestra directamente sobre la rejilla para teñirla y observarla, tarda un diagnóstico desde unos cuantos minutos a unas pocas horas, dependiendo del título o concentración del virus y de la experiencia del investigador (72).

Mediante tinción negativa se pueden observar principalmente las partículas virales (V); de esta manera se encontraron dos tipos de partículas alargadas en forma de varilla o de bastón en muestras de *Cattleya* y en las lesiones locales obtenidas en *Gomphrena globosa* por inoculación mecánica, la cual se describe en forma específica más adelante (8,9,10,11). En estos estudios se observaron las partículas (Figura 88 y 89) en el

Figura 88.
Tinción negativa
de partículas del
virus ORSV
vistas en el MET.



Figura 89.
Tinción negativa
de partículas del
virus CyMV
vistas en el
MET. (VI 0034,



Tabla 9. Resumen general de los resultados de los porcentajes de infección obtenidos en las pruebas ELISA realizadas por Ángel (8, 9, 10, 11, 12).

GRUPOS DE MUESTRAS	N° DE MUESTRAS	ENZIMA	CyMV	PORCENTAJES DE INFECCIÓN				CyMV + ORSV Duda ?	CyMV + ORSV	CyMV + ORSV Duda ?
				CyMV Duda ?	ORSV	ORSV Duda ?	CyMV + ORSV			
Ángel et al. (8, 10)										
Primero	52	Peroxidasa	59,6	0	0	0	0	0	0	0
Segundo	51	Peroxidasa	41,17	3,92	5,88	5,88	3,85	36,5	3,85	36,5
Tercero	50	Peroxidasa	48	2	0	0	0	3,92	3,92	3,92
Subtotal	153	PROMEDIO	49,59	1,96	1,96	1,96	3,92	4	4	0
Ángel et al. (9)										
Cuarto	64	Peroxidasa	70,31	0,52	0	0	0	0	0	0
Quinto	76	F. Alcalina	50	2,63	14,47	14,47	0	5,26	5,26	25
Sexto	72	F. Alcalina	16,65	0	13,88	13,88	1,38	1,38	1,38	12,5
Séptimo	72	F. Alcalina	52,77	0	18,75	18,75	13,88	13,88	13,88	0
Subtotal 5° a 7°	220	PROMEDIO	39,8	0,87	15,7	15,7	23,4	6,84	6,84	12,5
Subtotal 4° a 7°	284	PROMEDIO	46,83	1,05	11,97	11,97	18,3	5,28	5,28	9,85
Ángel et al. (9, 11)										
Cuarto	64	Peroxidasa	70,31	0,52	0	0	0	0	0	0
Quinto (R)	76	Peroxidasa	50,42	2,56	13,78	13,78	0	4,06	4,06	0
Sexto (R)	72	Peroxidasa	24,99	0	2,77	2,77	0	1,38	1,38	0
Séptimo (R)	72	Peroxidasa	44,44	0	12,38	12,38	0	6,94	6,94	0
Subtotal (R) 5° a 7°	220	PROMEDIO	39,95	0,85	9,65	9,65	0	4,12	4,12	0
Subtotal 4° a 7°	284	PROMEDIO	47,54	0,77	7,23	7,23	0	3,1	3,1	0
Ángel et al. (9, 11)										
PROMEDIO	153+284	Peroxidasa + F. Alcalina	48,39	1,17	7,6	7,6	10,89	4,07	4,07	11,21
TOTAL	153+284	Peroxidasa	48,45	1,16	4,99	4,99	0,86	2,91	2,91	5,85
Del 1° a 7°										

citoplasma de las células afectadas, donde las partículas rígidas concuerdan con las descripciones realizadas para ORSV (TMV-O) (110), con longitud cercana a los 300nm, mientras que las partículas observadas coinciden con las descripciones efectuadas para CyMV (46, 47, 110), con longitud aproximada de 450nm. Ambos tipos se encontraron en gran cantidad y dispersas en el citoplasma. Así mismo, mediante cortes histológicos se observaron en el citoplasma de células del parénquima de *Cattleya* sp. inclusiones virales de CyMV, donde se aprecian las partículas agrupadas y dispuestas en forma relativamente paralela, similar a una empalizada o en forma de una huella digital, como lo encontrado por varios autores (46, 47, 70, 110). Estas inclusiones concuerdan también con lo registrado por Francki *et al.* (41), Milne (88) y Lesemann (77) para Potexvirus (Figuras 90 y 91).

Las muestras representativas positivas para virus de cattleyas (números 553, 536 y 540), inoculadas en *Gomphrena globosa*, y de resultado positivo en la producción de lesiones locales, registraron en ELISA la presencia de CyMV para la primera de ellas y de ambos virus para las otras dos, lo cual se confirmó en el

microscopio electrónico, mediante la observación de las partículas y de las inclusiones virales.

Específicamente en esta planta se observaron inclusiones de ORSV, donde las partículas se encontraban agrupadas en forma relativamente ordenada formando grupos o bandas paralelas, similar a lo registrado para ORSV (Tobamovirus) (110), y para T M V (Tobamovirus) (41, 80) (Figura 92).

Imágenes de la morfología y el tamaño de estas partículas se describieron con el apoyo de la microscopía electrónica en varios trabajos

Figura 90.

a. Células del parénquima de *Cattleya trianaei* con partículas de CyMV. Fotografía del MET (VI 055, 15.000X);

b. Células del tejido foliar de *Cattleya trianaei* con partículas de CyMV agregadas en forma de huella dactilar. Fotografía del MET (VI 0039, 30.000X).



Figura 91.

a. Células del tejido foliar de *Cattleya trianaei* con partículas de CyMV dispersas. Fotografía del MET (VI 0044, 40.000X);

b. Células del tejido foliar de *Cattleya trianaei* con partículas de CyMV agregadas en forma de empalizada. Fotografía del MET (VI 053, 40.000X).

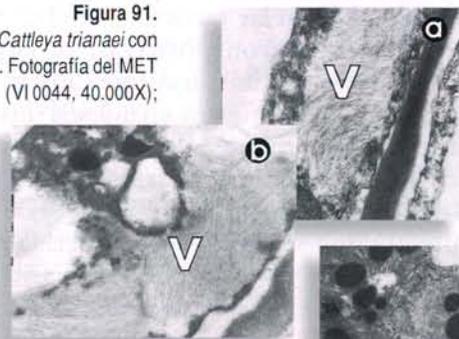


Figura 92.

a. Partículas virales e inclusiones en *Gomphrena globosa* inoculada con muestras de *Cattleya* sp. afectadas por ORSV. Fotografía del MET (6685, 20.000X);

b. Partículas e inclusiones virales en *Gomphrena globosa* inoculada con muestras de *Cattleya* sp. afectadas por ORSV. Fotografía de MET (6686, 25.000X).



para ORSV (37, 57, 68, 69, 71, 94, 98), y para CyMV (4, 36, 43, 68, 69, 71, 94). En la Figura 93 se observa al MET el tejido foliar de una planta de *Cattleya trianaei* sana, utilizada como testigo o control negativo.

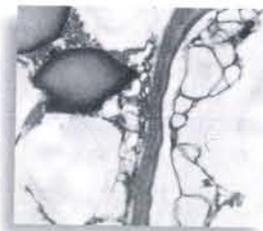


Figura 93.
Tejido foliar de *Cattleya trianaei* sp. sana. No se observan partículas virales en el citoplasma de las células. Fotografía del MET (VI0054, 25.000X).

Diagnóstico por síntomas

Las características de los distintos síntomas causados por los virus CyMV y ORSV en *Cattleya* spp. en Colombia se registran en algunas muestras, que presentaron resultados positivos en ELISA (Figura 94) (8, 9, 10, 11). Si se comparan las fotografías de las muestras afectadas por CyMV y ORSV con las muestras testigo de *Cattleya* sp. sanas, no se observan las partículas virales ni los agregados de las mismas.

Se puede considerar para este tipo de investigaciones y según lo planteado anteriormente en la descripción de síntomas ocasionados por cada uno de los virus según la literatura consultada para CyMV y ORSV (TMV-O), que ésta es una herramienta válida para la orientación de diagnósticos y para el manejo de los cultivos. Es muy importante tener en cuenta siempre que la presencia de determinados síntomas en las plantas no significa necesariamente la presencia o posible diagnóstico de disturbios o problemas de origen viral, y que no siempre las plantas reflejan de una forma sintomática la presencia del virus. Para ello, es necesario realizar pruebas generales y específicas como las antes descritas. Es importante tener en cuenta los resultados obtenidos en Cenicafé (8, 9, 10, 11) (Tabla 7), sobre la incidencia de los virus en *Cattleya* spp. en Colombia, en las cuales, entre el 65 y el 70% de las muestras evaluadas resultaron positivas, restando aproximadamente un 30 a 35% por diagnosticar su agente causante, a pesar de haber sido colectadas por presentar una sintomatología similar a la descrita para los virus. Adicionalmente, debe recalarse la importancia de este tipo de problemas fitosanitarios dentro del reconocimiento efectuado, donde aproximadamente un 38% de las 1.119 muestras colectadas presentaron sintomatología asociada con mosaicos y/o moteados, posiblemente causada por virus. Éste se considera el problema más importante en los cultivos de cattleya en Colombia.

El hecho de que plantas como *Cattleya* spp. se propaguen por vía asexual como la división de plantas y el cultivo de tejidos y meristemos *in vitro*, favorece la diseminación de estos virus de transmisión mecánica, adicionado esto a que en los cultivos se exponen plantas sanas a entrar en contacto con plantas enfermas y a infectarse mediante herramientas contaminadas. Estos virus se encontraron prácticamente en todos los cultivos de orquídeas estudiados y en las distintas condiciones de

manejo, debido posiblemente al amplio movimiento de material vegetal dentro del país y procedente del exterior. Esta descripción de síntomas aplicada en forma efectiva por los cultivadores sirve para que permanezcan en constante alerta o adopten prácticas de prevención, limpieza, aislamiento y observación detallada de materiales sospechosos y si es posible, hagan el diagnóstico basándose en las distintas metodologías citadas en la literatura.

Consideraciones sobre la utilización de plantas indicadoras y ELISA en el reconocimiento de CyMV y ORSV

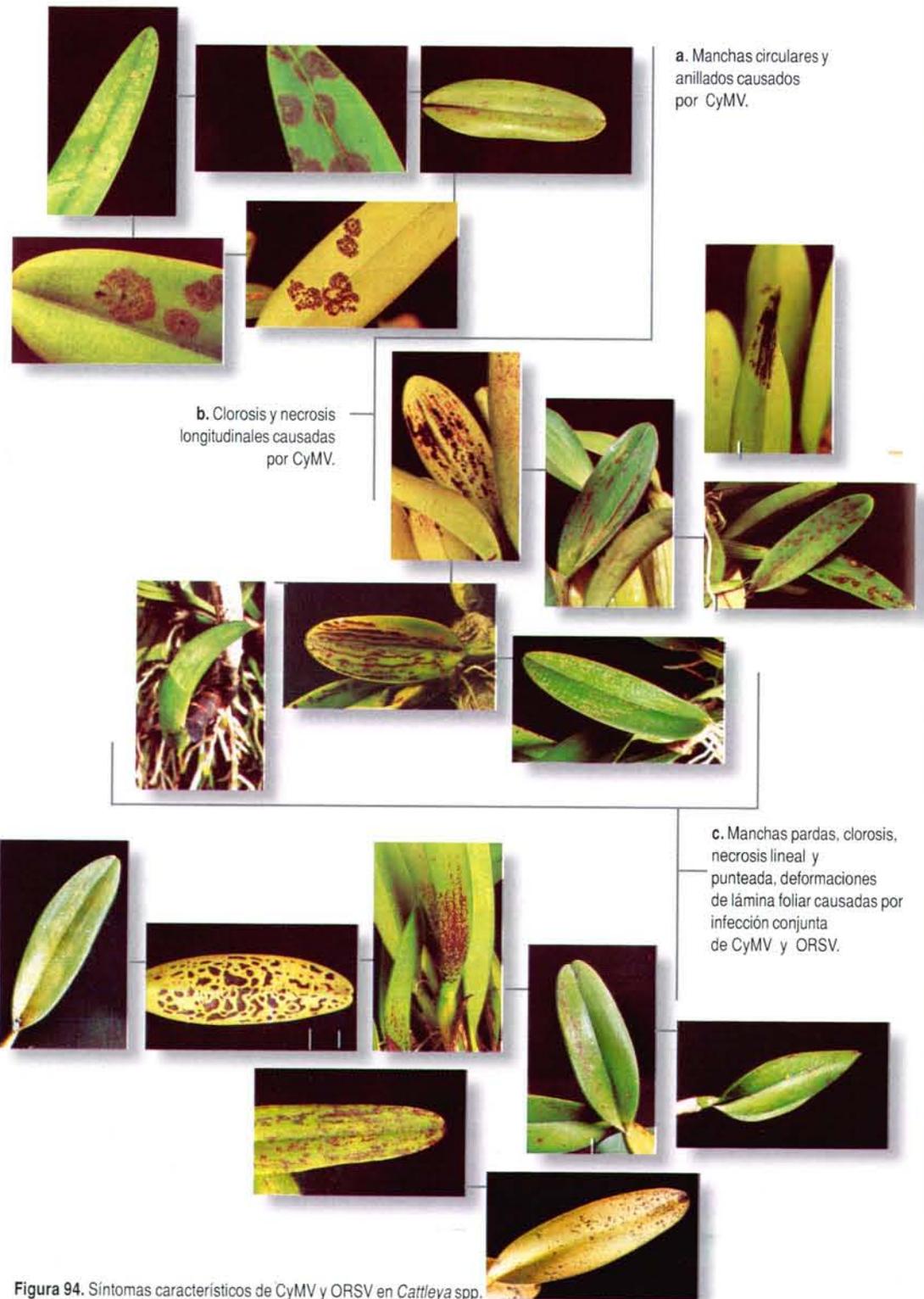
Plantas Indicadoras

La literatura disponible brinda poca información sobre el cultivo de plantas indicadoras de virus. Por ello, Ángel y Tsubota (8, 10) desarrollaron el proceso de cultivo y propagación para *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *Cassia tora*, *Cassia (Zenna) occidentalis* y *Gomphrena globosa*, algunas de las cuales se observan en la Figura 95. Las semillas se obtuvieron de diversas fuentes nacionales y se cultivaron en una casa de mallas en Cenicafé (Figura 96).

Se realizaron 4 pruebas con plantas indicadoras que se inocularon con la muestra en varias hojas y se evaluaron con base en la expresión de síntomas y de lesiones (locales o sistémicas) producidas por el virus inoculado (74, 76, 112).

Las cuatro inoculaciones se efectuaron con diferentes grupos de muestras y en distintos estados de conservación, como se especifica detalladamente en el Apéndice Metodológico.

En la primera inoculación se usó *C. amaranticolor* (63), dividiendo la haz y el envés de la hoja de cattleya, frotando la lámina foliar de la muestra contra la hoja por inocular, modificando la técnica base al "hidratar" la muestra en buffer fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) al 0,5% y pH 7,4-7,6 (Figura 97). También se utilizó la metodología de macerado de la muestra en igual buffer fosfato para inocular el extracto filtrado en la hoja de la planta indicadora (74, 112), con y sin carborundum. La segunda inoculación en *G. globosa*, inoculando el extracto de la muestra de acuerdo con la metodología de macerado en

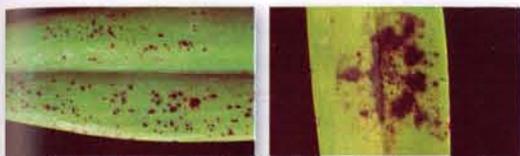


a. Manchas circulares y anillados causados por CyMV.

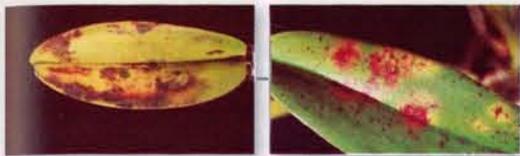
b. Clorosis y necrosis longitudinales causadas por CyMV.

c. Manchas pardas, clorosis, necrosis lineal y punteada, deformaciones de lámina foliar causadas por infección conjunta de CyMV y ORSV.

Figura 94. Síntomas característicos de CyMV y ORSV en *Cattleya* spp.



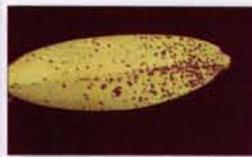
d. Punteados, necrosis circulares y moteados causados por ORSV



e. Necrosis irregular y moteados causados por CyMV.



f. Punteados y anillados causados por CyMV



g. Moteados causado por CyMV.



h. Necrosis y distorsión del color en flores causadas por CyMV.



Figura 94. Síntomas característicos de CyMV y ORSV en *Cattleya* spp.

buffer fosfato, con y sin carborundum. En la tercera inoculación se inoculó *C. amaranticolor* complementando el buffer de extracción con algunos de los aditivos utilizados para el extracto de ELISA. En la cuarta y última inoculación se utilizó un macerado del tejido en buffer fosfato, de pH 7,4-7,6 inoculando plantas de *G. globosa*, *C. amaranticolor* y *N. glutinosa*, donde se obtuvieron lesiones locales, positivas para la primera de las especies inoculadas. Los resultados de estas inoculaciones en plantas indicaron varios aspectos relacionados con los síntomas de las lesiones locales, la nutrición de las plantas indicadoras, la composición del buffer de extracción, el estado de las muestras y la influencia de diversos factores externos y propios de la planta indicadora, entre otros.

Síntomas de lesiones locales.

Las lesiones locales en hojas de *Gomphrena globosa* después de dos semanas de inoculadas las plantas se describen como manchas pardas de forma redondeada, de 2 a 5mm de diámetro, visibles tanto por la haz como por el envés y sólo en el costado donde se inoculó la muestra (Figuras 98 y 99).

En los tratamientos testigos con agua destilada estéril y buffer de extracción las hojas permanecieron sin lesiones, indicando el resultado positivo para las muestras en cuanto a la alta posibilidad de presentar un agente viral. Se utilizó la microscopía electrónica y se observaron las hojas de la planta



Figura 95.

Algunas plantas indicadoras utilizadas para el diagnóstico de los virus ORSV y CyMV. De izquierda a derecha: *Nicotiana benthamiana*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum*, *Chenopodium amaranticolor*, *Datura stramonium*



Figura 96.

Cultivo de plantas indicadoras en casa de mallas en Cenicafé



Figura 97.

Inoculación de *C. amaranticolor* con extracto de savia de *Cattleya* sp. para indicar la presencia de virus. Aspersión del abrasivo carborundum e inoculación del extracto de savia por frotación en la mitad derecha de la hoja.



Figura 98.

Lesiones locales producidas en *G. globosa* por la inoculación de la muestra 536 de *Cattleya* sp. afectada por CyMV y ORSV; a. en la haz de hojas b. en el envés.



Figura 99.

Lesiones locales producidas en las hojas de *G. globosa* por la inoculación de la muestra 553 de *Cattleya* sp. afectada por CyMV; a. en la haz; b. en el envés

indicadora y de los tejidos de las lesiones, determinando la presencia de los virus CyMV y ORSV, lo cual se corroboró posteriormente en las pruebas ELISA (muestras 536 y 540 con ambos virus, y la 553 con CyMV solo). Cuando se evaluaron las otras muestras inoculadas en *G. globosa* después de tres semanas se observaron síntomas de mosaicos ligeros en hojas jóvenes pero no aparecieron nuevas lesiones locales que constituía la variable por evaluar (8, 10).

Es importante definir el período de evaluación que por lo regular está entre 10 y 40 días máximo, con base en el período de incubación que puede tener un virus como CyMV u ORSV. Al respecto, después de cuatro o más semanas a partir de la inoculación se observaron en las plantas inoculadas con las muestras de orquídeas y en los testigos manchas rojizas referenciadas por los autores como posiblemente producidas por deficiencias nutritivas, específicamente de fósforo, manchas que se apreciaron en las hojas caducas y de apariencia clorótica, totalmente distintas a las obtenidas con muestras positivas.

Nutrición y Fertilización. La nutrición puede incidir de manera positiva o negativa cuando se trabaja con plantas indicadoras, y se deben evitar deficiencias o excesos que puedan enmascarar los síntomas esperados. Se requiere un adecuado conocimiento de las condiciones de cultivo de las plantas indicadoras, en especial, la nutrición y el levante, además de la sintomatología de las principales deficiencias nutritivas que fueron la causa para la no aceptación de los resultados de la primera inoculación en *C. amaranticolor*. Hubo lesiones locales debido a la mala nutrición de las plantas indicadoras por estar sembradas en un suelo franco arcilloso, sin adición de materia orgánica ni de fertilizantes, desarrollándose en consecuencia plantas débiles no aptas. En estas plantas se observó clorosis generalizada con los bordes de las hojas de tonalidad rojiza, similares a los síntomas de deficiencia de fósforo. Estas hojas se desprendieron con facilidad después de la inoculación. Esta sintomatología no se presentó en *C. amaranticolor* cuando se aplicaron 2g por planta de fosfato di-amónico (DAP), al menos cada 30 días (8,10).

Consideraciones similares se hacen respecto a *Gomphrena globosa*, utilizada para la segunda inoculación de muestras de *Cattleya* spp. Las plantas inoculadas presentaron lesiones redondeadas de 1 a 4mm de diámetro con centro de color pardo claro y margen rojiza (Figura 100). Cuando se compararon con las plantas testigo y las hojas no inoculadas, también se observaron estas lesiones lo cual condujo a pensar que no se debían a las inoculaciones.

Figura100.
Lesiones producidas
en *Gomphrena*.
globosa por posible
deficiencia de
fósforo.



Mediante observaciones al estereoscopio y al microscopio no se encontraron estructuras de hongos, ni exudados de posible origen bacterial, lo cual llevó a plantear la hipótesis de que estas lesiones podían ser consecuencia de deficiencias nutritivas, ya que en pruebas consecutivas con éstas y otras plantas que recibieron la adición de fertilizantes entre ellos DAP no ocurrió esta sintomatología. Por tanto, estos resultados relacionados con las lesiones observadas no se tuvieron en cuenta. Posteriormente, cuando se llevaron muestras de estas lesiones y de las plantas afectadas para su observación en tinción negativa en el microscopio electrónico de transmisión, no se observaron partículas virales ni otros patógenos, tanto en las hojas afectadas como en hojas jóvenes asintomáticas.

Composición del buffer de extracción. Otro aspecto a tener en cuenta cuando se hacen inoculaciones mecánicas es la utilización de soluciones tampón o buffer adecuadas para esta práctica, siguiendo las recomendaciones registradas en la literatura y determinando correctamente las funciones y características de los reactivos utilizados. No todos los virus ni todas las plantas pueden inocularse de la misma forma y la respuesta puede variar. Por ejemplo, se ensayó en la tercera de las inoculaciones un extracto de savia con aditivos empleados para la extracción de la muestra en ELISA tratando de reducir los efectos adversos de oxidantes donde el virus probablemente podría estar aún infectivo. Sin embargo, al inocularlo en las hojas de *C. amaranticolor* ocurrió una clorosis del área respectiva, marchitamiento y caída súbita de la hoja, en los tratamientos con la muestra y en las plantas inoculadas con el buffer de extracción solo, no así para las inoculadas con agua destilada estéril. Por razones como ésta, así se obtengan lesiones similares a las lesiones locales registradas en la literatura, se deben descartar los resultados.

Respecto a este último aspecto, una experiencia similar con inoculaciones en fríjol* (*Phaseolus vulgaris*) se determinó como causa de los síntomas citados en *C. amaranticolor*, el uso de un buffer de extracción de características distintas al utilizado para inocular estos virus en orquídeas registrado anteriormente (fosfato 0,5% y pH 7,4-7,6), el cual brinda estabilidad y conserva infectivo al virus. De esta forma el buffer usado, muy similar al de ELISA con los estabilizantes, reductores y detergentes que lleva, posiblemente no permitió mantener infectiva la estructura del virus o la bloquearon (ácido nucleico y proteína), ya que es apropiado para pruebas serológicas, donde lo importante es mantener libre la proteína de enlaces con compuestos extraños como taninos y materiales fenólicos, entre otros. Los componentes de este buffer usado en ELISA incluyen antioxidantes y dispersantes que pueden afectar los procesos bioquímicos en la hoja,

*Pineda, B. Comunicación personal. 1997



produciendo fitotoxicidad al actuar sobre enzimas propias de la planta como las nucleasas, fenoloxidasas, ribonucleasas, fenoles, quinonas y taninos, entre otras. Si se pretende que estos aditivos actúen sobre iguales componentes de la muestra vegetal también lo harán sobre la hoja viva.

Inhibidores. Una proporción variable de las partículas de virus puede ser alterada en algunas formas durante el aislamiento, donde algunas enzimas y polisacáridos pueden atacar las proteínas de envoltura y oxidarse por fenoles, o dichas proteínas perder parte de sus enlaces terminales disponibles y en menor posibilidad afectar su estructura (81, 82, 83). En relación con lo anterior, estas enzimas y polisacáridos comunes en plantas de las familias *Amaranthaceae* y *Chenopodiaceae*, a las cuales pertenecen *Gomphrena* y *Chenopodium*, pueden inhibir la infección de algunos virus mientras que otros inhibidores pueden enlazarse al virus, bloquearlo y evitar la traducción del ácido nucleico, sin que este mecanismo haya sido totalmente entendido. Además, compuestos como los taninos, polifenoles, ortoquinonas y oxidasas pueden causar inactivación total (25, 38, 111).

En la transmisión mecánica la presencia de algunos componentes o aditivos en los extractos por inocular puede actuar de varias formas diluyendo, adsorbiendo, neutralizando o inactivando sustancias en la hoja o en el inóculo, por tanto pueden inhibir la infección o por el contrario, reducir el efecto de los inhibidores específicamente el de polifenoles y las nucleasas (23, 38, 80, 81, 82, 83, 111). Además de las ya mencionadas, hay gomas, mucílagos, ácidos orgánicos y, en particular, ribonucleasas que afectan la infectividad del virus (81, 82, 83). Por tal motivo, es necesario adicionar a algunos de los buffers empleados compuestos reductores, antioxidantes y estabilizadores de proteínas debidamente probados y recomendados (25, 38).

Existen metodologías específicas para inocular virus y grupos de virus y cuando no se adicionan reactivos antioxidantes y estabilizadores en los procedimientos de extracción o no son productos propiamente recomendados en las metodologías respectivas, es muy probable que no se obtengan los mejores resultados.

Estado de la muestra. Al macerar los tejidos vegetales, los metabolitos de la planta y los restos celulares pueden acusar pérdida de capacidad infectiva de algunos virus (111), aunque en el caso de ORSV y CyMV, dada su alta estabilidad, esto es menos frecuente pero ocurre. La muestra de la mejor calidad es aquella totalmente fresca y donde no ha ocurrido el proceso de oxidación antes mencionado y son más útiles las hojas y tejidos jóvenes que tienen menor contenido de fenoles y de taninos, entre otros (81, 82, 83, 111). Por esta razón, en las inoculaciones realizadas la oxidación de las muestras y su

permanencia en almacenamiento pudo convertirse también en uno de los factores condicionantes que afectaron la infección en las plantas indicadoras.

Factores externos y propios de la planta. La utilización y la respuesta de las plantas indicadoras dependen de distintos factores tanto externos a la planta como de ella misma. Por ejemplo, temperaturas entre 18 y 26°C son usualmente recomendadas, pero cuando superan este valor e incluso son mayores de 30°C, no se observan síntomas como lesiones locales. También se registra la influencia de la luz, donde altas intensidades van a formar "plantas duras" que dificultan su infección y la aparición de síntomas. Por ello, en algunos procedimientos de inoculación mecánica se recomienda mantener las plantas que van a ser inoculadas durante 24 a 48 horas en oscuridad, pero normalmente éstas deben cultivarse en ambientes sombreados. Otro factor que influye es la nutrición aunque en este aspecto es variable la información, pero regularmente las plantas bien nutridas responden mejor en cuanto al desarrollo de la infección y la manifestación de síntomas. Por ejemplo, plantas deficientes en nitrógeno registraron clorosis y manchas de tonalidades rojizas que afectaron la evaluación de síntomas (38, 111).

La planta, el genotipo y las características de la especie utilizada influyen también en la respuesta a la inoculación de un virus o de razas de éste, donde la planta puede tener genes de susceptibilidad o de resistencia al virus que se reflejan en los síntomas ocasionados. Cuando se está en procesos continuos de subcultivo de virus durante períodos prolongados, se puede estar realizando una selección por susceptibilidad a un aislamiento determinado, seleccionando una cepa o aislamiento del virus más o menos patogénico. Una menor edad de la planta favorece la infección, debido a que los virus dependen en gran medida de las células epidermales superiores para penetrar y lo logran mejor en los tejidos tiernos. Además, las plantas indicadoras tienen una edad determinada a partir de la cual se considera adecuada su respuesta en las inoculaciones mecánicas, condición que por lo general ocurre al inicio de su período vegetativo, normalmente cuando están en el primer mes de edad (38, 111). En las plantas indicadoras también es posible que se presenten infecciones latentes o no se manifiesten los síntomas por cualquiera de estos u otros de los factores relacionados. Lo anterior también está relacionado con la concentración del virus (título) en la planta muestra, determinante para la obtención de síntomas locales o sistémicos en las plantas hospedantes indicadoras, especialmente cuando las concentraciones del virus en la muestra son bajas (59, 111). Finalmente, otra de las consideraciones importantes al trabajar con plantas indicadoras es conocer bien las características de su follaje, especialmente su fragilidad o susceptibilidad al daño mecánico cuando se utilizan abrasivos como



celita (tierra diatomácea) o carborundum, con el fin de causar heridas en las paredes celulares para que puedan entrar los virus a las células (31, 38, 80, 83, 111). Esto ocurrió en la cuarta inoculación donde se empleó *Nicotiana glutinosa*, que presentó evidentes síntomas de heridas, desprendimiento de la epidermis y demás daños mecánicos que terminaron en necrosis después de inocular el extracto de la muestra con ayuda de copitos de algodón y con carborundum.

Plantas de esta especie y de otras similares, como *N. benthamiana* y *N. tabacum*, tienen hojas frágiles y si no ha habido una buena nutrición e hidratación, estos daños ocurren más fácilmente. Para el caso de la primera de estas dos especies hubo numerosos inconvenientes con el área foliar reducida, hojas y tallo quebradizos y frágiles, mientras que para la segunda especie se registraron problemas de clorosis continuada no obstante las fertilizaciones, sin que se apreciara aparentemente respuesta a ellas (8, 10).

En conclusión, las plantas indicadoras son una herramienta más que debe complementarse con otras técnicas más poderosas para el diagnóstico e identificación de virus. Son valiosas para propósitos de reproducción de síntomas en tiempos cortos, relativamente fáciles de cultivar y son muy útiles para el incremento de los virus experimentalmente. Sin embargo, pueden presentar problemas por el efecto de condiciones externas (variables climáticas) o propias de la planta (edad, nutrición y fisiología) sobre la expresión o no de las lesiones locales en la planta indicadora, como antes se registró ya que manifestaron los síntomas esperados, luego de inocularse con muestras positivas a virus. Un ejemplo simple de lo anterior muestra que las plantas de *C. amaranticolor* inoculadas en la cuarta prueba con plantas indicadoras no registraron en ningún momento lesiones locales ni mosaicos, a pesar de utilizar el mismo extracto de cada muestra con las cuales se inoculó *G. globosa* que resultó positiva; no obstante haberse hecho de la misma manera para las tres especies indicadoras inoculadas y en igualdad de condiciones. Los virus estaban en las muestras, como se registró en muestras positivas de *G. globosa* respecto a la presencia de lesiones locales, lo cual se confirmó al llevar estas plantas al microscopio electrónico para verificar la infección por ambos virus –

ELISA.

Como se mencionó anteriormente, esta técnica se ha utilizado en distintos estudios con los virus CyMV y ORSV en orquídeas (1, 5, 48, 49, 72, 74, 112) y fue empleada para la determinación o identificación específica de CyMV y ORSV. En estos trabajos se utilizó ELISA en platos múltiples (33), como prueba determinante ya que las plantas indicadoras son un complemento en la detección de la presencia

de estos virus, debido a la influencia que pueden tener distintos factores para que se expresen los síntomas y se obtengan las lesiones.

En el reconocimiento de virus en cattleyas colombianas se utilizaron kits comerciales ELISA de doble capa o “sandwich” de anticuerpo (Das- Elisa) o compuesto directo para la detección de CyMV y ORSV, usando platos múltiples en los cuales emplearon las enzimas peroxidasa y fosfatasa alcalina (8, 9, 10, 11). Se realizaron básicamente los procedimientos recomendados por los fabricantes, con algunas modificaciones (35, 38, 112). Los procedimientos detallados se incluyen en el apéndice metodológico. Las muestras se procesaron en siete grupos principales y una repetición adicional o complementaria con peroxidasa para los grupos de muestras que se habían trabajado con kits con fosfatasa alcalina (grupos del 5 al 7), realizando modificaciones y ajustes según su procedencia, estado de oxidación y tiempo de conservación. Los resultados de la totalidad de los siete grupos de muestras con los subgrupos, más la repetición o prueba complementaria se detallan en la Tabla 10.

Criterio de Evaluación. Uno de los aspectos fundamentales para evaluar los resultados de las pruebas ELISA tiene que ver con el criterio para definir el carácter positivo de una muestra. Cuando se trata de la evaluación cualitativa se hace con base en el desarrollo de color, que para la enzima fosfatasa alcalina es amarillo, y si se usa peroxidasa la reacción positiva es de color naranja (Figura 101). En Cenicafé se utilizó la siguiente escala para la intensidad en el desarrollo de color (8, 9, 10, 11):

- + Leve o Tenue,
- ++ Moderado,
- +++ Fuerte o Intenso,
- Negativo
- ? “dudoso o por confirmar”.

La comparación siempre se hace contra los blancos y contra los controles de muestras de plantas de la misma especie negativas o sanas, que no deben generar color en las reacciones en cadena.

Para la determinación del umbral positivo de una muestra en trabajos de investigación es más importante usar el factor de evaluación cuantitativo que el cualitativo o visual, este último más apropiado cuando se hacen



Figura 101.
Reacciones positivas para Cymv en ELISA en el desarrollo de color; a. Fosfatasa alcalina; b. Peroxidasa.

Tabla 10. Resultados detallados de los porcentajes de infección obtenidos en las pruebas ELISA realizadas para cada grupo y subgrupo de muestras de *Cattleya* spp. (8, 9, 10, 11)

GRUPO	SUBGRUPO	N° DE MUESTRAS	ENZIMA	CYMV	PORCENTAJES DE INFECCIÓN			CYMV + ORSV Duda ?
					CyMV Duda ?	ORSV	ORSV Duda ?	
Primero	Unico	52	Peroxidasa	59,6	0	0	0	3,85
	Segundo	51	Peroxidasa	41,17	3,92	5,88	5,88	3,92
	Tercero	50	Peroxidasa	48	0	0	0	4
	Cuarto	26	Peroxidasa	96,15	0	0	0	0
Quinto	Primero	26	Peroxidasa	50	1,56	0	0	0
	Segundo	12	Peroxidasa	58,33	0	0	0	0
	Tercero	64	Peroxidasa	70,31	0,52	0	0	0
	Subtotal	26	F. Alcalina	69,23	3,84	3,84	3,84	11,53
Sexto	Primero	24	Peroxidasa	76,92	0	0	0	0
	Segundo	26	F. Alcalina	69,23	3,84	100	100	0
	Tercero	24	Peroxidasa	57,69	7,69	3,85	0	3,85
	Subtotal	76	F. Alcalina	8,33	0	25	0	4,16
Séptimo	Primero	24	Peroxidasa	16,66	0	37,49	0	8,33
	Segundo	24	F. Alcalina	50	2,63	14,47	35,52	5,26
	Tercero	72	Peroxidasa	50,42	2,56	13,78	0	4,06
	Subtotal	24	F. Alcalina	8,33	0	25	4,16	0
TOTAL	Primero	24	Peroxidasa	12,5	0	16,6	0	4,16
	Segundo	24	F. Alcalina	20,83	0	4,16	0	0
	Tercero	24	Peroxidasa	37,5	0	0	0	0
	Subtotal	72	F. Alcalina	45,83	0	4,16	100	0
TOTAL	Primero	24	Peroxidasa	16,65	0	13,88	34,72	4,16
	Segundo	24	F. Alcalina	24,99	0	2,77	0	1,38
	Tercero	24	Peroxidasa	50	0	16,6	0	12,5
	Subtotal	72	F. Alcalina	45,83	0	0	0	0
TOTAL	Primero	24	Peroxidasa	91,66	0	25	0	12,5
	Segundo	24	F. Alcalina	75	0	33,33	0	16,66
	Tercero	24	Peroxidasa	16,6	0	12,5	0	4,16
	Subtotal	72	F. Alcalina	52,77	0	4,16	0	4,16
TOTAL	Primero	24	Peroxidasa	44,44	0	18,75	0	13,88
	Segundo	24	F. Alcalina	48,39	1,17	7,6	10,89	4,07
TOTAL	Primero	24	Peroxidasa	48,45	1,16	4,99	0,86	2,91
	Segundo	24	F. Alcalina	48,45	1,16	4,99	0,86	2,91

^{1A} : Se utilizan los valores del kit 22 para ORSV.

^{1B} : Sin el kit 22, el resultado sería 1,6% para ORSV y 6,6% para CyMV+ORSV "duda".

^{2A} : Se utilizan los valores de los kits 55 y 56. Se descartan los valores del kit 45 con 25% de

CyMV y del kit 46 con 100% para ORSV.

^{2B} : Si se utilizan los valores de los kits 45 y 46, el resultado sería 26,39% CyMV, 1,39% ORSV, 33,33% ORSV "duda", 1,39% CyMV + ORSV y 8,33% CyMV+ORSV "duda".

^{3A} : Se utilizan los valores del kit 30 para ORSV.

^{3B} : Sin el kit 30, el resultado sería 1,64% para ORSV y 5,85% para CyMV + ORSV "duda".

⁴ : Sin los kits 22 y 30, el resultado sería 0,70% ORSV y 0,35% CyMV + ORSV "duda".

⁵ : Se utilizan los valores de los kits 55 y 56. Se descartan los valores del kit 45 de CyMV y kit 46 de ORSV.

evaluaciones en condiciones limitadas tecnológicamente o por los cultivadores. En la evaluación cuantitativa los valores de absorbancia se obtienen mediante un equipo lector espectrofotométrico, provisto de filtros que permiten cuantificar la absorbancia de la luz al pasar por las celdas de los platos, luz que es emitida por una serie de lámparas del equipo. Esta absorbancia es medida a una determinada longitud de onda (405nm para fosfatasa alcalina y 490nm en peroxidasa). Para Clark y Adams (33), el ojo humano es capaz de visualizar color cuando su absorbancia es superior a 0,100.

En este aspecto de la evaluación cuantitativa la literatura no brinda claridad y no hay consistencia en la utilización de diversos factores para considerar una muestra positiva (35, 105). Se pueden utilizar los factores de dos veces (Tx2) el promedio de las absorbancias de los testigos (T) sanos (48), tres veces (Tx3) (34), y hasta cuatro veces (Tx4) (49). También hay criterios donde se utiliza la desviación estándar de toda la prueba, sumándola dos (T+2s), tres (T+3s) o cuatro veces (T+4s) al valor obtenido para el promedio de los testigos sanos (105). Bar Joseph *et al.* (13), recurren a un valor de 0,150 superior al del promedio de los testigos sanos como criterio positivo. Elliot *et al.* (40) por ejemplo, emplean para un trabajo de reconocimiento de virus en orquídeas los factores de dos (Tx2) y tres veces (Tx3) el promedio de los testigos sanos. Si el valor de la muestra supera este factor ésta es positiva. Normalmente en los anteriores trabajos se resta a cada uno de los valores obtenidos por el equipo el valor de fondo, el cual resulta del promedio de la absorbancia del buffer de extracción (B.E.) ubicado en la prueba como un blanco. De esta forma se evalúa el valor de la absorbancia real de la muestra. Para el reconocimiento se consideró como factor de evaluación o umbral positivo-negativo, dos veces (Tx2) el promedio de las absorbancias de los testigos sanos o controles negativos (Buffer de extracción B.E.).

Este es un factor fuerte de castigo a la prueba, ya que la base de la comparación de acuerdo con la literatura mencionada al respecto es el resultado del promedio de muestras de plantas testigo sanas. Sin embargo, en la presentación de resultados se tuvieron en cuenta otros factores de evaluación más fuertes (Tx3 y Tx4), con el fin de ilustrar cómo puede interpretarse la información según el factor seleccionado. También se consideraron los valores o resultados dudosos, aplicando conceptos (48, 105), donde valores de absorbancias mayores a 0,100 pueden considerarse como positivos (para este caso "dudosos o por confirmar") al generar color, principalmente en la evaluación cualitativa, reafirmando lo conceptuado por Clark y Adams (33), siempre y cuando se consideren los factores de evaluación como se mencionó anteriormente, sobre todo, los valores de los testigos negativos y de los blancos (buffer de extracción B.E.). A continuación se presenta el formato utilizado para el registro de los resultados obtenidos en las pruebas ELISA:

MUESTRA (Código)	EVALUACIÓN VISUAL (Intensidad)		ABSORBANCIA (490 o 405 nm)		FACTOR DE EVALUACIÓN							
	CyMV	ORSV	CyMV	ORSV	CyMV			ORSV				
					Tx2	Tx3	Tx4	Tx2	Tx3	Tx4		

En las pruebas ELISA hay influencia de factores externos y de procesos no detectables o definidos por las características de la técnica que pueden afectar negativamente los resultados obtenidos. De esta forma, dentro de las evaluaciones realizadas pueden obtenerse valores o registros “dudosos o por confirmar”, tanto cualitativa como cuantitativamente. Adicionalmente, se registran reacciones o procesos que pueden generar respuestas contrarias, como son los “falsos positivos o falsos negativos”. Algunos de los principales factores que afectan la calidad de los resultados obtenidos en las pruebas ELISA son:

Ubicación y posibles contaminaciones. Para Clark y Adams (33), quienes desarrollaron ELISA en platos múltiples hacen énfasis en algunos factores que pueden afectar los resultados entre ellos, la procedencia y las características de los platos, principalmente, la localización de las muestras dentro del mismo. Son más susceptibles de variar o de obtener valores erróneos o reacciones no específicas en las celdas ubicadas en los bordes del plato, todo esto llamado “efecto de plato”. ELISA es una prueba altamente sensible al detectar bajas cantidades del virus y de por sí, es sensible a contaminaciones entre las muestras y los controles o en el procedimiento de adición y lavados de los reactivos, especialmente del conjugado enzimático. Cuando se están analizando los resultados obtenidos en cada celda debe contemplarse su ubicación en el plato y la comparación con los valores de las otras repeticiones. Dentro de los resultados obtenidos en una prueba es frecuente la existencia de valores sospechosos de contaminación o de reacción “no específica”, lo cual se puede presentar en celdas individuales o en la totalidad del plato. Un ejemplo de posible contaminación en celdas individuales se presenta para el primer grupo de pruebas ELISA (Figura 102), donde la muestra testigo de *Gomphrena globosa* (Gg) en el kit de ORSV presentó un valor de 0,147, el cual tiene alta posibilidad de haberse contaminado en una de las repeticiones, alterando el promedio respectivo con relación al promedio del control negativo (B.E.), que fue de 0,023. Cuando se compararon con una muestra positiva como la 240 con un valor de 1,210 o del control positivo del kit (C+) con un valor de 1,192, el resultado de Gg no se puede considerar como positivo.

En Cenicafé se registraron problemas para kits comerciales de fosfatasa alcalina (por ejemplo, kits 22 y 30), (Figura 103a y b), en los cuales hubo color amarillo intenso en la totalidad de las celdas del plato, incluyendo los controles negativos o blancos (buffer de extracción

B.E.), y en menor grado, para kits comerciales de peroxidasa (kit 46) (Figura 103c), con desarrollo de color naranja intenso. Esto puede apreciarse al comparar los valores de la evaluación cuantitativa de los controles negativos de ambos virus en la Tabla 11, que comparan además los valores mínimos y máximos de absorbancias registrados por las muestras y los testigos de referencia (sanos y enfermos) de los kits. Cuando ocurren este tipo de problemas donde no hay respuesta alguna, la totalidad de los resultados entran en “duda o por confirmar” y deben descartarse o aclararse dentro del análisis, requiriéndose la repetición de la prueba (Tabla 10).

Lo anterior pudo darse hipotéticamente en los procesos de lavado, tanto al retirar el contenido de la muestra antes del primer lavado como al efectuar el lavado del conjugado enzimático. Una explicación probable es la manipulación de los residuos cuando se realiza manualmente y automáticamente, de acuerdo con lo mencionado también por Pineda** personal, 1998). En Cenicafé, para los dos primeros grupos de pruebas se hizo manualmente, mientras que para los demás (del tercero al séptimo grupo) se utilizó el equipo inmunolavador Biorad 1250. Dentro de esta explicación es posible que permanezcan residuos del conjugado o queden ligeras contaminaciones en los bordes del plato que repercuten en el desarrollo de color. Clark y Adams (33) mencionan este aspecto del lavado de los platos varias veces asegurando que trazas de los reactivos que no se laven pueden ocasionar contaminación y reacciones “no específicas”. Esta explicación se puede descartar porque utilizando el mismo equipo

inmunolavador no se presentaron contaminaciones en los platos siguientes de CyMV y ORSV, considerando además, que las distintas pruebas se realizaron en forma simultánea y en las mismas condiciones de procedimientos, detalles explicados en el Apéndice Metodológico.

También complementan la información sobre los lavados con el efecto que puede tener el origen y las características del plato. No obstante este último aspecto, es poco probable que exista un efecto marcado de los platos debido que en el caso de los kits comerciales producidos por Agdia estos son los mismos provistos por la firma Nunc y el

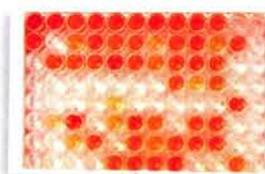


Figura 102.
Plato microtitulable con los resultados obtenidos en ELISA del kit 1 de ORSV.

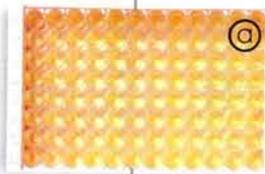
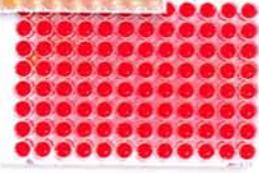


Figura 103.
Reacciones de desarrollo de color obtenido por posibles contaminaciones generalizadas en kits ELISA para ORSV; a. y b. kit 22 y 30 con fosfatasa alcalina; c. kit 46 con peroxidasa.



** Pineda, B. Comunicación personal 1998

Tabla 11. Resumen de los valores máximos y mínimos de promedios de absorbancias (9, 10, 11, 12), para las muestras y los controles en los siete grupos de pruebas ELISA procesados.

GRUPOS DE MUESTRAS		PROMEDIOS DE ABSORBANCIAS												
		405nm (Fosfatasa alcalina)					490nm (Peroxidasa)							
		CONTROL NEGATIVO		CONTROL POSITIVO			MUESTRAS		MUESTRAS		MUESTRAS			
GRUPO	SUBGRUPO	ENZIMA	CyMV	ORSV	Buffer de Extracción	ORSV	CyMV	C+	(Agdia)	ORSV	MÁXIMOS Y MÍNIMOS	(Rangos)	CyMV	ORSV
Primero	Único	Peroxidasa	0,070	0,023		0,023	2,622		1,192		Máx, 1,210	2,958		1,210
Segundo	Único	Peroxidasa	0,084	0,053		0,053	> 3,100		1,593		Mín, 0,021	0,013		0,021
Tercero	Único	Peroxidasa	0,069	0,098		0,098	> 3,100		1,887		Máx, 2,356	0,037		2,356
Cuarto	Primero	Peroxidasa	0,051	0,149		0,149	1,016		1,053		Mín, 0,041	0,069		0,041
	Segundo	Peroxidasa	0,108	0,144		0,144	> 3,100		1,314		Máx, 2,409	0,047		2,409
	Tercero	Peroxidasa	0,081	0,197		0,197	> 3,100		1,334		Mín, 0,085	0,082		0,085
Quinto	Primero	F, Alcalina	0,076	0,146		0,146	1,259		0,373		Máx, 1,216	0,096		1,216
	Segundo	Peroxidasa	0,060	0,133		0,133	> 3,100		2,212		Mín, 0,143	0,078		0,143
	Tercero	F, Alcalina ^{TA}	0,084	1,719		1,719	1,231		1,582		Máx, 1,425	0,055		1,425
	Segundo	Peroxidasa	0,079	0,186		0,186	2,837		2,762		Mín, 0,115	0,084		0,115
	Tercero	F, Alcalina	0,085	0,270		0,270	1,516		0,702		Máx, 2,181	0,062		2,181
	Segundo	Peroxidasa	0,070	0,181		0,181	> 3,100		2,920		Mín, 0,194	0,080		0,194
	Segundo	Peroxidasa	0,070	0,181		0,181	> 3,100		2,920		Máx, 1,036	0,063		1,036
	Segundo	Peroxidasa	0,070	0,181		0,181	> 3,100		2,920		Mín, 0,151	0,078		0,151
	Segundo	Peroxidasa	0,070	0,181		0,181	> 3,100		2,920		Máx, 2,210	0,055		2,210
	Segundo	Peroxidasa	0,070	0,181		0,181	> 3,100		2,920		Mín, 0,060	0,055		0,060
	Segundo	Peroxidasa	0,070	0,181		0,181	> 3,100		2,920		Máx, 2,288	0,084		2,288
	Segundo	Peroxidasa	0,070	0,181		0,181	> 3,100		2,920		Mín, 1,334	0,084		1,334
	Segundo	Peroxidasa	0,070	0,181		0,181	> 3,100		2,920		Máx, 2,713	0,084		2,713
	Segundo	Peroxidasa	0,070	0,181		0,181	> 3,100		2,920		Mín, 0,120	0,062		0,120
	Segundo	Peroxidasa	0,070	0,181		0,181	> 3,100		2,920		Máx, 2,526	0,062		2,526
	Segundo	Peroxidasa	0,070	0,181		0,181	> 3,100		2,920		Mín, 0,263	0,080		0,263
	Segundo	Peroxidasa	0,070	0,181		0,181	> 3,100		2,920		Máx, 2,821	0,080		2,821
	Segundo	Peroxidasa	0,070	0,181		0,181	> 3,100		2,920		Mín, 0,138	0,063		0,138

(Continúa)

Tabla 11. (Continuación). Resumen de los valores máximos y mínimos de promedios de absorbancias (9, 10, 11, 12), para las muestras y los controles en los siete grupos de pruebas ELISA procesados.

GRUPOS DE MUESTRAS		PROMEDIOS DE ABSORBANCIAS						
GRUPO	SUBGRUPO	ENZIMA	405nm (Fosfatasa alcalina)		490nm (Peroxidasa)			
			CONTROL NEGATIVO		CONTROL POSITIVO			
			CyMV	ORSV	CyMV	ORSV		
		Buffer de Extracción		C+ (Agdia)		MUESTRAS (Rangos)		
		CyMV		ORSV		MÁXIMOS Y MÍNIMOS		
		CyMV		ORSV		CyMV		
		ORSV		CyMV		ORSV		
Sexto	Primero	F, Alcalina	0,079	0,280	1,094	0,457	Máx, 1,094	Mín, 0,077
		Peroxidasa	0,058	0,111	> 3,100	1,624	Máx, > 3,100	Mín, 2,065
	Segundo	F, Alcalina	0,109	0,248	1,391	0,510	Mín, 0,053	Máx, 2,153
Tercero	Primero	Peroxidasa ^{2A}	0,077	0,155	> 3,100	0,751	Mín, 0,082	Máx, 2,17
		F, Alcalina ^{3A}	0,102	0,426	1,837	0,596	Mín, 0,069	Máx, 0,068
	Segundo	Peroxidasa	0,071	0,077	> 3,100	1,395	Mín, 0,095	Máx, 2,367
Séptimo	Primero	F, Alcalina	0,089	0,371	1,878	1,046	Mín, 0,059	Máx, 2,488
		Peroxidasa	0,068	0,090	3,243	0,690	Mín, 0,085	Máx, 2,308
	Segundo	F, Alcalina	0,091	0,416	1,823	0,873	Mín, 0,062	Máx, 2,724
Tercero	Primero	Peroxidasa	0,081	0,171	> 3,100	0,722	Mín, 0,091	Máx, 2,137
		F, Alcalina	0,108	0,467	1,807	0,881	Mín, 0,076	Máx, 2,043
		Peroxidasa	0,068	0,092	> 3,100	0,799	Mín, 0,102	Máx, 2,339
						Mín, 0,059	Máx, 0,065	

^{1A} : Se utilizan los valores del kit 22 con problemas para ORSV.

^{2A} : Se utilizan los valores de los kits 55 y 56. Se descartan los valores del kit 45 de CyMV y del kit 46 con problemas de 100% para ORSV.

^{3A} : Se utilizan los valores del kit 30 con problemas para ORSV.

comportamiento sería igual para kits pertenecientes a los mismos lotes, sea de CyMV o de ORSV. A medida que se incrementa el conocimiento de la prueba y se elaboran algunos más, se pueden eliminar algunos de los valores de “posibles contaminaciones”, contrastantes al compararlos con las distintas repeticiones, valores que pueden afectar el promedio resultante.

Importancia de las repeticiones. Para reducir el efecto de los valores “sospechosos” por contaminación o de reacciones “no específicas” se deben establecer varias repeticiones dentro del plato, tanto para las muestras por procesar como para los controles positivos, negativos y algunas muestras de referencia comprobada como testigos* (40). En cuanto al número de repeticiones la literatura no brinda parámetros definidos y se registran dos repeticiones (34, 40) y tres repeticiones (79). Se utilizaron entonces para los tres primeros grupos de pruebas ELISA, de 3 a 4 repeticiones aleatorias para las muestras y de 5 a 8 repeticiones para los controles. Sin embargo, estos mismos autores emplearon para los cuatro grupos finales 3 repeticiones dentro de cada plato para las muestras a procesar y para los controles (+ y -), con al menos 2 repeticiones para las muestras de referencia o testigos de *Cattleya*, teniendo en cuenta que los grupos se dividieron en subgrupos adecuados a distintos formatos o diagramas de carga. En todas las ocasiones los promedios de absorbancias se obtuvieron a partir de 3 lecturas en el equipo lector Biorad 3550 uv, trabajando en los platos múltiples para ELISA que contienen 96 celdas cada una con capacidad aproximada de 350 microlitros, dispuestas en 8 filas y 12 columnas.

Valores de absorbancia obtenidos. Cuando se hacen las evaluaciones teniendo como referencia los valores de los testigos sanos o blancos es importante evaluar la magnitud de los valores obtenidos. En los trabajos realizados en Cenicafé se registran varios casos al respecto. El primero de ellos tiene que ver con los valores bajos en los testigos que son la base para establecer el criterio o factor de evaluación. Por ejemplo, en el primer grupo de pruebas los testigos negativos o blancos (B.E), registraron un valor de absorbancia promedio de 0,023, donde la mayor parte de las muestras procesadas registraron valores menores a 0,100. Muestras como la 328 que registró una absorbancia de 0,121 van a resultar positivas en todos los factores de evaluación, resultando este valor bajo si se compara con el testigo o control positivo de ORSV con una absorbancia de 1,192, y es un resultado considerado “dudoso o por confirmar” al evaluar su desarrollo de color en la escala cualitativa respecto al control positivo. El efecto de estos valores es una alta incidencia del virus en el grupo de muestras procesadas, y

* Elliot, M. Comunicación personal, 1998

como se presenta en la Tabla 10, la magnitud de los resultados “dudosos” llegó a cerca del 37% cuando se trató de ORSV e infección conjunta para el primer grupo de pruebas, y otra serie de valores en algunos de los grupos de pruebas siguientes.

Un segundo caso se refiere a los valores variables entre pruebas para el mismo virus o para distintos virus entre kits, para los controles y para las muestras (Figura 104 a y b). Por ejemplo, se registró alta variación en los valores de absorbancia, sobre todo en los controles negativos (B.E.), donde los promedios fueron relativamente mayores respecto a los obtenidos en la primera prueba. Se apreciaron datos en las repeticiones de 0,175 y 0,180 como los mayores y de 0,016 entre los inferiores para CyMV en distintos kits. En cambio, al analizar los datos de los kits de ORSV, encontraron como valor alto 0,087 y bajo 0,024. De esta manera, se registraron en estos experimentos valores distantes entre los distintos kits (CyMV respecto a ORSV) y no entre los valores obtenidos en un mismo tipo de kit, en este caso con el conjugado enzimático de peroxidasa. Para el caso del análisis de una muestra vegetal individual (muestra de referencia 297), que registraron en dos pruebas las calificaciones de resultados “por confirmar o dudoso” para ORSV, debido al efecto sobre el promedio de un valor mayor presentando valores de 0,263 a diferencia de las otras repeticiones con 0,052, 0,062 y 0,039. Por tanto, la obtención de un determinado valor considerablemente alto o bajo en uno de los kits puede alterar los promedios y la interpretación de los mismos, tanto para los controles como para las muestras. Se recomienda entonces realizar los análisis plato por plato, comparando los valores de las distintas repeticiones para identificar valores con una alta variación y considerar su inclusión o no dentro del análisis y no obtener los promedios a partir de los resultados de platos independientes.

Calidad de los reactivos. Otra fuente posible de variación en los resultados obtenidos en las pruebas ELISA está en la calidad de los reactivos utilizados en los kits comerciales, relacionada en parte con la procedencia y el efecto de platos (33). Dentro de las posibles fuentes de error está el procedimiento de cubrimiento del plato en la compañía fabricante (Agdia, Inc en este caso), el cual al adquirirlo ya viene cubierto con el anticuerpo desde la firma proveedora. Así se utilizó para los siete grupos de

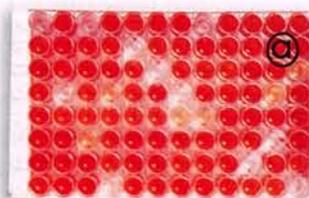
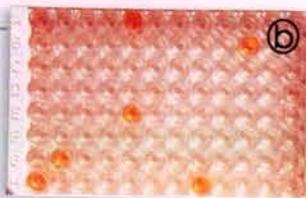


Figura 104.

Diferencias apreciables ópticamente en la intensidad del desarrollo de color en ELISA con peroxidasa; **a.** Kit13 CyMV y **b.** Kit 14 ORSV. (Debe tenerse en cuenta que es el mismo grupo de muestras, en igual disposición en el plato y en pruebas simultáneas en el tiempo)



pruebas, con problemas para los que emplearon conjugado enzimático de fosfatasa alcalina. Tratando de evitar el posible efecto de la fijación del anticuerpo al fondo de las celdas, se emplearon los kits de Agdia sin los platos pre-cubiertos con el anticuerpo específico, realizando este cubrimiento en Cenicafé con el anticuerpo adquirido a Agdia e importado desde los Estados Unidos. Este procedimiento se utilizó para la repetición de los tres últimos grupos en la prueba adicional o complementaria con peroxidasa con resultados satisfactorios similares a los obtenidos a las pruebas de los primeros grupos con peroxidasa, y distintos a los resultados obtenidos con fosfatasa alcalina. Sin embargo, se presentaron valores mayores de los controles negativos o blancos (B.E.) cuando se trató de ORSV, la mayoría de las veces superiores a 0,100 de absorbancia, en contraste con los de CyMV realizados simultáneamente, como se explicará más adelante.

Es posible que también exista algún efecto de las características del anticuerpo utilizado, que de por sí son distintas para CyMV y ORSV, a pesar de utilizar un buffer de cubrimiento igual en los kits de Agdia (carbonato de sodio). Se discutiría entonces la calidad del anticuerpo, aspecto que es de total incertidumbre y una causa probable de error para este tipo de investigaciones donde se depende de empresas comerciales. Sin embargo, este aspecto no se estudió ni se analizó en detalle.

Con relación a la enzima utilizada en el conjugado enzimático dentro de los kits ELISA, se registraron diferencias entre los resultados obtenidos con peroxidasa respecto a los de fosfatasa alcalina, cuando realizaron la repetición de los tres últimos grupos de pruebas (grupos 5, 6 y 7), como puede apreciarse en la Tabla 10. Estos grupos de pruebas se habían procesado inicialmente con fosfatasa alcalina pero con base en el incremento de los resultados "dudosos o por confirmar" en el quinto y sexto grupos, especialmente para ORSV se realizó la repetición o prueba complementaria utilizando kits en peroxidasa sin platos pre-cubiertos con el anticuerpo como antes se explicó, tanto para CyMV como para ORSV. Estos autores tuvieron en cuenta siempre la realización de las pruebas en forma simultánea en el tiempo y en igualdad de condiciones del laboratorio para poder compararlas (Figuras 105).

Se registraron diferencias debidas a valores de absorbancias más bajos en los controles positivos y en las muestras positivas con los Kits Agdia de peroxidasa para ORSV, respecto a los obtenidos para CyMV. Así mismo, se registró variación consistente en que blancos (B.E.) y muestras negativas para ORSV marcaron valores superiores para ORSV con relación a CyMV (Tabla 11). Una situación similar ocurre con varios de los kits de fosfatasa alcalina, donde los valores de absorbancia de los blancos (B.E.) son superiores en los kits de ORSV respecto a los de CyMV e inclusive, se presentan valores altos

generalizados cuando se hace la prueba conteniendo las muestras y los controles para ORSV. Lo esperado es que las celdas que contienen el blanco o control negativo (buffer de extracción B.E.), produzcan valores similares tanto en el kit de CyMV como en el de ORSV,

conociendo que es el mismo buffer de extracción, el extracto de la muestra es el mismo para ambos virus y los procedimientos son prácticamente los

mismos con fosfatasa alcalina y peroxidasa para las mismas muestras, se trabajó con iguales disposiciones en los formatos o diagramas de carga de los platos. La magnitud de las diferencias en los valores de absorbancia obtenidos

(máximos y mínimos), puede observarse en la Tabla 11, planteándose una mayor eficacia de la enzima peroxidasa respecto a fosfatasa alcalina, para el diagnóstico de los virus CyMV y ORSV en *Cattleya* spp. en Colombia (Tabla 9).

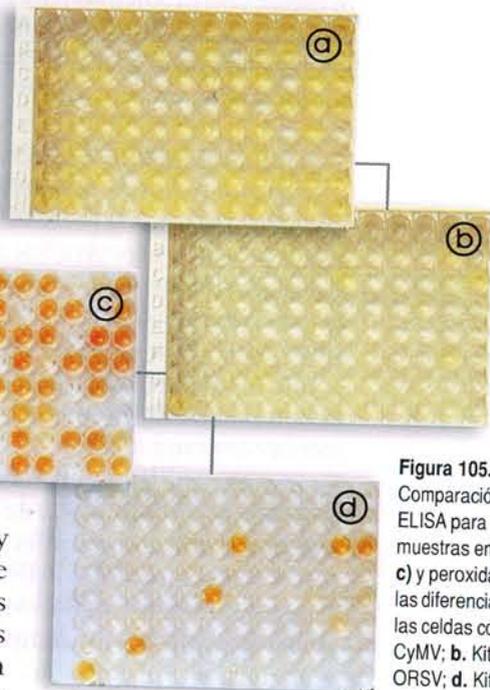


Figura 105.

Comparación de pruebas por ELISA para un mismo grupo de muestras en fosfatasa alcalina (a y c) y peroxidasa (b y d). Nótese las diferencias en las posiciones de las celdas coloreadas. a. Kit 19 CyMV; b. Kit 37 CyMV; c. Kit 20 ORSV; d. Kit 38 ORSV

La consecuencia evidente de estos valores altos, principalmente en los kits de ORSV, es un alto número de muestras registradas con resultados “dudosos o por confirmar”, y resultados de incidencia posiblemente más bajos en el reconocimiento. El posible efecto de una mayor eficacia o un mejor comportamiento de una enzima respecto a la otra, registra resultados en los cuales hay diferencias en los promedios de incidencia (porcentajes de muestras infectadas) obtenidos, como lo resume la Tabla 10. El hecho que una muestra resulte positiva para CyMV en fosfatasa alcalina y negativa o viceversa para el mismo virus en peroxidasa, y de igual resultado o forma contraria para ORSV, también lo atribuyen los autores a reacciones “no específicas” o “no serológicas”, posiblemente más factibles de ocurrir en fosfatasa alcalina respecto a peroxidasa. Como un caso concreto, al analizar las Tablas de resultados de las pruebas ELISA presentadas por Ángel *et al.* (9, 11) para cada muestra en su comparación de las pruebas efectuadas con fosfatasa alcalina y con peroxidasa, registran lo siguiente: Para el primer subgrupo del quinto grupo, en fosfatasa alcalina apareció negativa para CyMV la muestra 737 mientras que en peroxidasa es positiva, y en fosfatasa alcalina aparecieron positivas para ORSV las muestras 729, 741, 745 y 749, con la 725 “dudosa”, mientras que no se produjeron

positivos en peroxidasa. Resultados similares donde no concuerdan los resultados de ambas enzimas, en cuanto al número y las muestras evaluadas, se registran reiteradamente para los siguientes grupos de pruebas. Los autores cuestionan parcialmente la información generada por algunos de los kits comerciales de fosfatasa alcalina, en especial los de ORSV. Es evidente que al analizar los resultados no hay coincidencia en varias de las muestras positivas registradas con peroxidasa, respecto a las obtenidas con fosfatasa alcalina, lo cual se explicaría también por reacciones "no específicas" o "no serológicas", incluso cuando se efectuaron repeticiones de pruebas.

Agdia Inc. (Elkhart, Indiana U.S.A.), evaluó los registros de los valores de absorbancia obtenidos en el lector de platos Biorad 3550 uv, de los kits 19 al 36 (Grupos de pruebas del 5 al 7) procesados con el conjugado enzimático de fosfatasa alcalina por Ángel *et al.* (9, 11), los remanentes de los reactivos de los kits, como también tejidos de muestras controles y referencias como la CTVE (Testigo positivo de para CyMV de *Cattleya trianaei* fresca), CTE (Testigo negativo sano de *Cattleya trianaei* fresca) y 433 (Muestra de referencia positiva para ORSV y CyMV, almacenada). Por intermedio de Vrient*, Agdia da a entender que los valores y los reactivos pertenecientes a los kits de CyMV, tienen resultados adecuados, donde el buffer de extracción presentó un valor de 0,080, lo cual está acorde con lo obtenido anteriormente por Ángel *et al.* (9, 11). Sin embargo, indica que no se presentaron ni se encontraron inconvenientes con los remanentes de reactivos enviados por los autores desde Cenicafé para las pruebas, al igual que con las existencias de los lotes en cuestión y los de referencia de la firma proveedora de ellos. Consideran en Agdia que es muy probable que estos inconvenientes fueran producto de errores de procedimiento por parte de los investigadores o por aspectos desconocidos para ambas partes (usuarios y proveedores).

La firma proveedora está de acuerdo con la anormalidad de los datos presentados de ORSV con fosfatasa alcalina, más para unos platos que para otros, donde los valores de los buffer de extracción (B.E.) y de los testigos negativos son más altos de lo normal (superiores a 0,500 de absorbancia) y los valores de los testigos positivos son más bajos de lo que deberían ser, dando la impresión que el conjugado enzimático se hubiera fijado al plato cubierto con el anticuerpo. Para los fabricantes, los valores altos de testigos negativos no son problema al restar a los valores de las absorbancias de las muestras este valor de fondo, obteniendo resultados razonables para la prueba para algunos de los platos.

Adicionalmente Agdia, envió a Cenicafé los registros de las pruebas efectuadas por ellos a las muestras de referencia y testigos (sanos y

* Vrient, B, W. Comunicación Personal. 1999

enfermos) que se remitieron desde Colombia, resultados que no concordaron ni fueron semejantes con los obtenidos en Cenicafé donde se evidencia la problemática de valores altos en las muestras procesadas para ORSV. Por ejemplo, obtuvieron valores de absorbancia con fosfatasa alcalina del orden de 3,000 y más, en muestras y en controles positivos, lo cual en ningún momento se obtuvo en Colombia (Tabla 11). Muestras testigos como la CTVE (muestra de planta viva de *Cattleya trianaei*), utilizada reiteradamente en las pruebas ELISA como control positivo comprobado de CyMV solamente, y que se observó en el microscopio electrónico de transmisión, marcó en Agdia (Estados Unidos) valores altos de absorbancia (superiores a 0,900), considerados positivos para ORSV en las pruebas realizadas por Agdia con fosfatasa alcalina.

En resumen, no se tiene explicación técnica sobre la posible causa de estos inconvenientes, aunque una de las hipótesis principales apunta a inconvenientes en la calidad de los anticuerpos de ORSV producidos por Agdia. Diferencias entre pruebas ELISA realizadas para los virus CyMV y ORSV mediante kits de una compañía, han registrado diferencias respecto a pruebas efectuadas con kits comerciales de otro fabricante (72)

Estado de la muestra. Otro aspecto posible como causa de variación de los resultados de ELISA, es el efecto de la oxidación y degradación de las muestras aún en condiciones de refrigeración y deshidratación, lo cual puede estar afectando la interpretación de los valores y de los resultados obtenidos. Es posible que para muestras almacenadas bajo condiciones no aptas que permitan su degradación y oxidación, la capacidad de ELISA se vea afectada más para un virus que para otro. Esto se indicó observando, entre otros, los datos obtenidos para la muestra 240 ya que inicialmente ésta, cuando llevaba almacenada en nevera cerca de 11 meses resultó positiva para ambos virus y cuando llevaba cerca de 16 meses resultó positiva para ORSV y negativa para CyMV, aunque con valores de absorbancia superiores a 0,100. Sin embargo, muestras como la 310 mantuvieron su respuesta positiva en CyMV después de los mismos 16 meses de almacenamiento. Lo anterior puede estar relacionado con la estabilidad del virus, aspecto no analizado en estas investigaciones pero donde siempre se menciona que ORSV es un virus más estable en los tejidos de la planta respecto a CyMV, y probablemente sea una de las causas por las cuales se detecta con mayor facilidad después de tener las muestras almacenadas, deshidratadas y oxidadas.

Se observaron más ejemplos de estabilidad de los virus en distintas condiciones de almacenamiento, como es el comportamiento de la muestra testigo 433, que en pruebas realizadas durante 2 años (48

meses) reiteradamente resultó positiva para ambos virus CyMV y ORSV, con valores en la mayoría de los casos superiores a los mismos controles positivos suministrados por el kit comercial, no obstante el almacenamiento de la muestra en nevera a 4°C que presentaba oxidación y deshidratación (Figura 106). Una submuestra de esta muestra 433 se envió a Agdia (Estados Unidos) para utilizarse como testigo en pruebas confirmatorias y obtuvo valores de absorbancia entre 1,235 y 2,184 para CyMV, y valores superiores a 3,000 para ORSV. Resultados similares se obtuvieron para las muestras 536 y 540 positivas para ambos virus después de 21 meses de almacenadas a -20°C y comprobadas mediante plantas indicadoras y microscopía electrónica.

También se obtuvieron resultados positivos y consistentes para las muestras de referencia 461 y 462 positivas para CyMV almacenadas durante aproximadamente 24 meses a 4°C y a -20°C. Las anteriores muestras de referencia tuvieron un comportamiento similar tanto en fosfatasa alcalina como en peroxidasa a pesar del tiempo de almacenamiento y estado de oxidación (Figura 107a). Los resultados son más evidentes para el tercer grupo y los cuatro siguientes de pruebas de ELISA (del 5 al 7), donde el efecto de la oxidación en las muestras fue menor al haberse almacenado a -20°C, poco después de su recolección hasta el procesamiento y macerado, inmediatamente antes de servir las en los platos microtitulables (Figura 107b) En estos resultados los valores “dudosos” o por confirmar son prácticamente

mínimos, cuando se trabajaron los kits con la enzima peroxidasa, especialmente.

Al respecto, Ángel y Tsubota (8, 9, 10, 11) en su discusión de resultados complementan lo mencionado por Elliot (comunicación personal, 1998), quien plantea que estos virus pueden ser detectados en tejidos secos sin que estén afectados o degradados por bacterias y/o por hongos. Las reacciones en este tipo de tejidos pueden verse reducidas si se comparan con las que ocurren en tejidos frescos. Sin embargo, el virus puede detectarse fácilmente, aunque no hay experiencias específicas de almacenar en condiciones de nevera o congeladas las hojas infectadas con

Figura 106. Reacciones positivas para ORSV en ELISA con conjugado de peroxidasa, para controles positivos (Posiciones G2, E5 y C9) y muestras de referencia almacenadas.

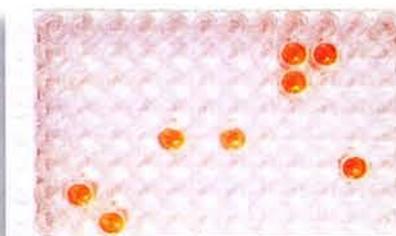
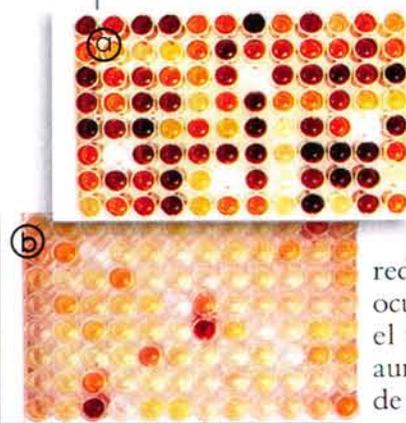


Figura 107. Comparación del estado de oxidación del extracto de muestras de *Cattleya* refrigeradas; a. A 4°C. y b. A -20°C. (Nótese las celdas con fondo blanco total que corresponden al buffer de extracción B.E.)



CyMV y ORSV, y estas experiencias existen y han sido positivas para el TMV (virus del mosaico del tabaco, Tobamovirus). Elliot* mencionó que se utilizaron con éxito tejidos de orquídeas almacenados a 4°C durante varias semanas y mucho más tiempo, previniendo la degradación por bacterias y/u hongos como antes se mencionó, retirando la humedad de la superficie del tejido y vigilando constantemente que no se presenten pudriciones en las muestras. La desecación es menos perjudicial que la degradación por patógenos secundarios, y es una de las formas como se conserva material con virus, como lo cita Bos (23) mediante cloruro de calcio.

Este aspecto de la oxidación está relacionado con los fenoles o polifenoles contenidos en distinta cantidad según la planta, su edad y el órgano, pudiendo reaccionar con otras proteínas y oxidarse a quinonas (altamente reactivas), lo cual puede darse o no por vías enzimáticas mediante las fenol-oxidasas y peroxidasas, abundantes en las plantas y provocando la inactivación o alteración de los virus (82). Los fenoles al formar quinonas pueden establecer enlaces covalentes con las proteínas de la planta a través de grupos amino (-NH) y sulfhidrilo (-SH) libres, y estas mismas quinonas pueden tener un segundo grupo reactivo libre para enlaces cruzados con las proteínas virales, las cuales se verían bloqueadas, afectando los procedimientos de aislamiento y las consecuentes reacciones para las cuales son requeridas, sin ser esto totalmente entendido (81). Para Clark y Adams (33) las características propias de la planta y por ende del extracto obtenido, tienen efecto en los resultados siendo diferentes las respuestas en las interpretaciones.

Las metodologías recomiendan procesar las muestras lo más rápido posible antes que se produzca oxidación y deterioro. Por este motivo y teniendo en cuenta que las orquídeas contienen fenoles y taninos de rápida oxidación, los componentes del buffer de extracción de ELISA incluyen antioxidantes y agentes reductores como la polivinilpirrolidona y el sulfito o metabisulfito de sodio, detergentes como el tween, estabilizadores como la albúmina y antimicrobiales como la azida de sodio. La razón de su utilización es mantener lo más estable y libre posible las proteínas del virus, reducir los procesos de oxidación y evitar la contaminación de patógenos secundarios como hongos y bacterias. Al tratar de retirar alguna cantidad de compuestos fenólicos de los extractos obtenidos para ELISA cuando se emplean muestras oxidadas y deshidratadas, se filtraron a manera de ensayo extractos obtenidos de muestras de referencia almacenadas a 4°C y oxidadas, y muestras de testigos frescos sanos de *Cattleya*, filtración efectuada mediante exclusión molecular (102), utilizando la columna de sepharosa Econo Pac 10DG Biorad, con base en trabajos de laboratorio en extractos de hojas de café, según Riaño**.

* Elliot, M. Comunicación personal, 1998

** Riaño, N. Cenicafé. Comunicación personal, 1998

Se obtuvieron resultados similares para la muestra 433 que confirmaron la alta posibilidad de la presencia de CyMV y de ORSV, estando almacenada unos 55 días, aproximadamente. Se logró retirar una alta cantidad de compuestos fenólicos y demás proteínas degradadas, quedando el filtrado con una coloración parda más clara que la inicial, producto de compuestos oxidados irreversiblemente y de tamaño más pequeño al retenido por el gel.

Para la muestra 240 que llevaba cerca de 16 meses almacenada en nevera, oxidada y deshidratada, fue alta la cantidad retirada de estos compuestos, pero de igual manera quedó otra alta cantidad sin ser retenida en el gel, resultando el filtrado con una coloración parda oscura. Esta muestra registró valores menores de absorbancia pero la evaluación del resultado fue similar al obtenido en el procedimiento normal (presencia de CyMV y ORSV), conservando el posible efecto en las reacciones “no específicas”. Es posible que se conserven proteínas virales que indiquen la concentración “real” de virus (como una manera específica de llamarla), que pueden reaccionar con los anticuerpos de la prueba en determinado momento, pese al estado de oxidación y almacenamiento de la muestra. Para el ensayo donde se utilizó un extracto en buffer de ELISA de la muestra 328, almacenado en nevera a -20°C durante aproximadamente 6 meses, los resultados fueron positivos para la presencia de CyMV confirmando lo obtenido en el primer grupo de pruebas, y negativos para ORSV, al no coincidir con lo obtenido anteriormente, donde resultó “dudosa” la presencia de este último virus. El uso del extracto almacenado al parecer sería menos adecuado que el empleo de tejidos vegetales almacenados, deshidratados y oxidados, aspecto que deberá estudiarse posteriormente.

Para el extracto de la muestra fresca de *Cattleya trianaei* (CTE) filtrada en el gel por la columna de sepharosa, fue negativa la presencia de ambos virus, coincidiendo con el primer grupo de pruebas y dejando ligeras dudas respecto a los resultados de la segunda prueba para CyMV. El filtrado resultante de esta muestra al ser procesada fresca fue completamente transparente, lo cual indica que cuando se hace poco después de cortarla de la planta, la oxidación y la degradación son menores, y permiten que el gel filtrante retenga los compuestos polifenólicos y demás oxidados que se hayan podido formar. En este tema de filtración de compuestos fenólicos en extractos de ELISA deberá investigarse con profundidad posteriormente, con el fin de reducir su presencia en el extracto y disminuir las reacciones “no serológicas”. Con el empleo de muestras adecuadas y en lo posible frescas, se pretende reducir el efecto e identificar las reacciones “no específicas”, complementado con la ubicación de un buen número de repeticiones de la muestra dentro del plato y sorteadas en lo posible aleatoriamente. Así se pueden comparar los resultados entre ellas, como antes se manifestó.

Resultados “falsos” y reacciones “no específicas”. Este es uno de los principales aspectos a considerar en la evaluación de los resultados de ELISA celda por celda. Las reacciones “no serológicas” o reacciones “no específicas” (40), pueden ocurrir al obtener los extractos vegetales y al utilizar procedimientos como ELISA, ocasionando dificultades en la obtención e interpretación de los resultados antes referidos. La diferencia entre reacciones serológicas específicas y “no específicas” no es posible conocerla a simple vista; por tanto, es un factor de incertidumbre para el análisis de los resultados. Ángel *et al.* (8, 9, 10, 11) por ejemplo, siempre presentan los resultados de ELISA, como una “alta posibilidad de presencia y/o ausencia del virus estudiado”.

La reacción “no específica” positiva, se produce al enlazarse el anticuerpo del virus con las proteínas de la planta, y éstas con el conjugado enzimático, enzima que reacciona generando color en presencia del sustrato adecuado, lo cual se evalúa como positivo. Lo anterior se debe a la formación de los compuestos de origen fenólico en la muestra al oxidarse y enlazarse irreversiblemente con las proteínas virales (antígenos o anticuerpos). La reacción negativa, se da cuando no se logra la reacción antígeno-anticuerpo, estando presente el virus.

Un resultado considerado como “falso negativo” ocurriría al no poder enlazar las proteínas virales (antígenos) con las proteínas homólogas (anticuerpos), por presentarse un bloqueo de los enlaces terminales disponibles en los dominios específicos de estas proteínas, quedando libres en el medio y retiradas en los procesos de lavado. Los “falsos negativos” afectan los resultados cuando la concentración de virus en la muestra es baja, lo cual resulta en valores bajos de absorbancia y de leve o ningún desarrollo de color, al no lograr enlazar el conjugado enzimático lo suficiente para que reaccione con el respectivo sustrato.

Un “falso positivo” podría generarse al quedar bloqueados los dominios específicos afines a los dominios del anticuerpo necesarios para la reacción antígeno anticuerpo, y quedar libres dominios afines a las proteínas de la planta, enlaces que resultan de la alteración por la oxidación.

Los anticuerpos son altamente específicos para las proteínas del virus (antígenos), siempre y cuando tengan una alta pureza y calidad. Sin embargo, pueden presentar en su composición otros anticuerpos contaminantes afines a otras proteínas homólogas o compatibles con las de la planta, las cuales serían reconocidas y enlazadas. De igual forma los anticuerpos pueden ser bloqueados en algunos enlaces terminales, lo que impide reconocer el antígeno del virus como antes se mencionó para el caso de “falsos negativos”, pero también pueden tener enlaces compatibles con proteínas de la planta al tener dominios afines con otras familias de proteínas o por la alteración de enlaces amino y sulfidrilos antes mencionados, alteración que puede ser causada

por efecto de los agentes oxidantes. Estos enlaces no específicos permiten que de una u otra manera se unan anticuerpos con proteínas de la planta y queden cubriendo el fondo de los platos ELISA, lo cual se convierte en una reacción “no serológica” o “no específica”. Las globulinas que conforman parte del conjugado enzimático utilizado en el procedimiento son proteínas que tienen terminales y dominios compatibles o afines con diversas proteínas, incluyendo algunas de la planta y las del virus (antígenos y anticuerpos), y es por ello que se usan como “puente de enlace” entre proteínas y enzimas, estas últimas son las que reaccionan en presencia del sustrato específico generando color.

De esta forma, valores considerados como “falsos positivos o negativos” pueden aumentar su influencia en los resultados de los análisis dependiendo del criterio tenido en cuenta para considerar una muestra positiva, o lo que se ha llamado en este estudio factores de evaluación. Para Sutula *et al.* (105) los “falsos positivos” en la evaluación cuantitativa se disminuyen en la medida que se considere un criterio o factor de evaluación más exigente o de mayor valor, pero se corre el riesgo de aumentar los “falsos negativos”.

Las reacciones “no específicas” ocasionan diferencias notables que se identifican en la evaluación de los valores de las absorbancia de las repeticiones, tanto de las muestras como los de los controles (positivos y negativos) (Figura 107). Estas alteraciones deben eliminarse de los cálculos para obtener los promedios, aspecto que también se complementa con lo descrito por Clark y Adams (33) para la ubicación de las muestras y el efecto de platos, donde son más susceptibles las celdas localizadas en los bordes del plato, como antes se mencionó.

En ocasiones, se recomienda no ubicar muestras en este borde y sí llenarlas con buffer de extracción o de lavado. Ejemplo de una posible reacción “no específica” en muestra fresca, puede ser el ocurrido con el extracto de la muestra de *C. trianaei* (CTE) filtrada en el gel por la columna de sepharosa, al registrar ligeras inconsistencias (“dudas”) para CyMV, conociendo que es una muestra comprobada negativa. En este trabajo se fortalece esta parte de la discusión sobre reacciones “no específicas”, con base en la literatura (40, 112), donde se menciona que siempre es necesario utilizar en ELISA varios controles sanos o negativos de plantas de orquídeas del mismo género o de la especie de planta evaluada.

Las reacciones “no específicas”, es decir, que no son de origen viral, se producen frecuentemente cuando se prueban orquídeas con ELISA y es prácticamente imposible distinguir las de los valores de absorbancia de las reacciones virales. Para tal efecto se llevaron muestras de referencia y controles de *Cattleya* spp., para su observación en el microscopio electrónico de transmisión en el CIAT (Cali, Colombia),

y así corroborar la presencia o ausencia de partículas virales e inclusiones de los virus, tanto en plantas afectadas como en sanas y testigos (Figuras 108 y 109).

La influencia que pueden tener problemas como los antes mencionados, se observa en la alteración de los promedios de incidencia del virus en las muestras, como se presenta con claridad en las Tablas 8 y 9, incluyendo tanto los valores problema como los valores finales, para los siete grupos de pruebas. También es importante considerar las pérdidas de tipo económico, ya que un kit de 96 celdas puede costar en el mercado aproximadamente US\$200 (valores a diciembre de 2000), sumado esto al tiempo requerido, a los insumos no provistos por el kit, pero en consideración mayor, al riesgo que se toma al decidir la suerte de materiales vegetales valiosos posiblemente afectados por virus, y al peligro de cultivar materiales enfermos en presencia de sanos.

El conocimiento de la problemática del estado de las muestras, su procesamiento y las características básicas de la técnica ELISA, es indispensable al momento de interpretar los resultados obtenidos, al igual que en la modificación y mejoramiento de otros aspectos de los métodos utilizados para muestras de *Cattleya* spp. en ELISA.

La principal conclusión que genera todo este análisis, plantea que ELISA es una metodología adecuada para el diagnóstico de los virus CyMV y ORSV en *Cattleya* spp., técnica de alta sensibilidad y de aplicación masiva y relativamente práctica en el momento de realizarla.

Sin embargo, deben considerarse y tenerse en cuenta aspectos como son: la calidad y el estado de la muestra, el riesgo de contaminaciones, el número de repeticiones, la calidad de los reactivos empleados, especialmente cuando se trata de kits comerciales y la forma de interpretar los resultados obtenidos. Se recomienda en el mejor de los casos y en la medida de las posibilidades, no basar el diagnóstico en una sola técnica, excepto cuando se trata de microscopía electrónica donde pueden visualizarse las partículas de virus presentes en la planta.

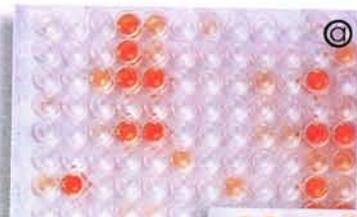


Figura 108.

a. Comparación de dos pruebas ELISA con conjugado enzimático de peroxidasa para CyMV, usando las mismas muestras en igual disposición dentro de los platos. **b.** Nótese las diferencias en la ubicación de las celdas coloreadas.

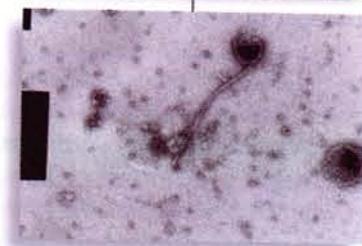
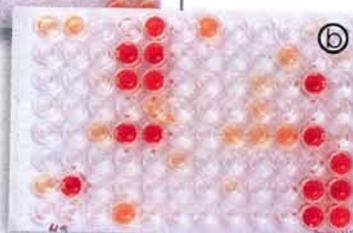


Figura 109.

Partículas de CyMV en planta testigo positiva de *Cattleya trianaei* (CTVE). Fotografía del MET.

Recomendaciones Básicas para el Manejo Preventivo y Curativo de Enfermedades Virales

Reiteradamente se ha mencionado que el medio de transmisión de los virus CyMV y ORSV es exclusivamente mecánico, es decir, que no se conoce un vector natural que lo disemine. El ser humano es quien se ha encargado de aumentar cada día su incidencia en los cultivos y colecciones a lo largo y ancho del mundo, debido a la utilización de herramientas infestadas, a la propagación masiva asexual convencional e *in vitro* (cultivo de tejidos) de explantes infectados, al cultivo de plantas sanas en presencia de enfermas, y a la movilización de material infectado al nivel doméstico e internacionalmente.

El objetivo de un programa de manejo de virus en un cultivo de orquídeas busca evitar al máximo la presencia del patógeno, reduciendo las posibilidades de introducción de material vegetal afectado y la diseminación del problema al resto del cultivo. A continuación se presentan las principales medidas requeridas para el manejo preventivo y curativo de enfermedades con posible origen viral en *Cattleya* spp. y orquídeas en general, según diversos autores (16, 18, 19, 20, 27, 40, 43, 67, 72, 73, 74, 87, 106, 112, 116, 121).

- ♦ Adquirir en lo posible plantas y materiales de origen conocido, donde su calidad de cultivo y en especial, la sanitaria sea adecuada, procurando obtener plantas sanas que procedan de viveros que analicen sus progenitores. De esta forma se previene la entrada de plantas infectadas como fuentes de inóculo para el cultivo. Las plantas propagadas *in vitro* a partir de semillas (reproducción sexual), tienen menor probabilidad de estar infectadas por los virus que aquellas procedentes de cultivo de tejidos en laboratorio o división de plantas convencional (reproducción asexual). Para el caso de los híbridos, esta última reproducción es la necesariamente empleada, mientras que las especies pueden propagarse mediante los dos tipos de reproducción.
- ♦ Someter a cuarentena en un lugar aislado del resto del cultivo las plantas recién adquiridas o nuevas, con el fin de observar detalladamente y evaluar el comportamiento de las mismas, para evitar la entrada de material que se sospecha está infectado. La decisión sobre la destrucción o el manejo de este material está en poder del cultivador.
- ♦ Obtener información sobre la amplia gama de síntomas ocasionados por los virus, sintomatología que se ha descrito en la literatura internacional y que cada vez es más diversa. Si aparecen síntomas, el cultivador puede someter las plantas que despiertan sospecha a algunas

de las medidas de control o de manejo que más adelante se detallan. Siempre se debe realizar observación continua (hojas y flores, principalmente) en busca de síntomas o de comportamientos anormales. Es importante tener en cuenta que pueden existir dentro del cultivo plantas asintomáticas, que están afectadas, condición que es más usual cuando las plantas se encuentran en excelentes condiciones de cultivo. La ocurrencia de plantas asintomáticas depende de características propias de la especie o híbrido y de su interacción con el ambiente del cultivo. De igual forma, debe considerarse que algunos síntomas como manchas necróticas, marchitamientos, lesiones foliares, etc., pueden también ser causados por hongos, bacterias, desórdenes fisiológicos o toxicidad, y esto sólo se verificará mediante un diagnóstico especializado.

- ♦ Si existen plantas posiblemente infectadas dentro del cultivo, éstas deben retirarse del cultivo y llevarse a un sitio aislado para evitar que entren en contacto con las plantas sanas, a fin de que reciban un manejo adecuado independiente. Debe ponerse más atención sobre plantas pertenecientes a los géneros más comerciales de orquídeas cultivadas y propagadas en todo el mundo, como lo son *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Vanda*, *Oncidium*, y en especial *Cattleya* y sus géneros afines (Alianza *Cattleya*), que pueden ser una fuente importante de inóculo.
- ♦ Mantener los cultivos en forma adecuada desde el punto de vista agronómico, suministrando oportunamente y en las dosis recomendadas los fertilizantes y demás insumos requeridos. Las aplicaciones excesivas pueden conducir a desequilibrios que debilitan la planta y la hacen más susceptible a problemas sanitarios.
- ♦ Trabajar primero en las plantas sanas cuando se están desarrollando las distintas labores del cultivo, con el fin de no contaminar herramientas, utensilios, recipientes y las manos del operario con patógenos como hongos, bacterias y virus, los cuales se pueden transmitir mediante estos implementos y penetrar por heridas o en ligeros contactos.
- ♦ No utilizar recipientes ni sustratos donde hayan estado sembradas otras plantas, en especial si se sospecha de su infección por virus. Si se requiere de la reutilización de recipientes, éstos deben recibir un adecuado manejo lavándose con abundante agua y jabón y tratándose con hipoclorito de sodio 2% (blanqueador casero), para retirar e inactivar los posibles virus y otros patógenos.
- ♦ Eliminar las partes afectadas y los residuos vegetales, preferiblemente mediante incineración, ya que estos se convierten en fuentes de inóculo y fácilmente pueden contaminar herramientas, utensilios, recipientes, operarios, o animales que pueden habitar en los cultivos, favoreciendo la transmisión mecánica de los virus. El

viento y la lluvia pueden transportar restos vegetales y depositarlos en las superficies de las plantas, donde ocurre la inoculación en el momento de producirse heridas o contactos directos. De igual forma las aguas de riego y de fertilización no deben reutilizarse, ya que pueden contener restos de plantas infectadas e incluso, estar contaminadas con partículas de virus.

- ♦ Probar mediante una o varias de las técnicas de diagnóstico antes mencionadas, aquellas plantas especiales o de interés para el cultivador, con el fin de certificar su estado con propósitos de propagación. Este diagnóstico puede realizarse, dependiendo de la técnica, por los mismos cultivadores, por asistentes técnicos o por centros y laboratorios especializados.
- ♦ Efectuar tratamientos físicos que inactiven y destruyan los virus, como el calentamiento de las herramientas de corte a una temperatura cercana a los 100°C, mediante el flameo en mecheros de alcohol y gas hasta observar, si es posible, el extremo rojo. Se debe recordar que el virus ORSV (Tobamovirus) se inactiva a temperaturas superiores a los 90°C, y el virus CyMV (Potexvirus) a más de 70°C. El empleo de tijeras o cuchillas esterilizadas mediante calor es útil para cauterizar o cicatrizar heridas y reducir el riesgo de entrada de otros patógenos.
- ♦ Realizar tratamientos químicos para esterilizar las herramientas y los utensilios, como la inmersión y limpieza con hipoclorito de sodio del 2 al 5% (blanqueador casero), el cual se presenta comercialmente con una concentración de 5,25%. Este producto es oxidante, incluso afecta el metal de las herramientas por corrosión. Mezclas de hidróxido de sodio al 2% con formaldehído al 2% también pueden inactivar los virus. Otro producto apropiado es el fosfato trisódico (TSP), que puede utilizarse en dilución en una solución acuosa saturada. Posterior al lavado o inmersión en el producto, debe realizarse un enjuague con agua limpia para retirar residuos que le puedan afectar la planta. Las soluciones desinfectantes deben renovarse frecuentemente durante la sesión de trabajo ya que al realizar las inmersiones sucesivas de las herramientas quedan depósitos de savia y residuos vegetales, se descompone el reactivo y se puede perder la efectividad. Estos productos en solución pueden emplearse para el lavado de recipientes y de las mesas o instalaciones donde se cultivan las plantas.
- ♦ Procurar el uso de guantes de caucho o de látex, ya que la piel se afecta con la alcalinidad de las soluciones esterilizantes y es necesario lavar frecuentemente las manos del operario sin perjuicio de su salud. De esta forma también se evita que partículas de virus y residuos vegetales permanezcan infectivos y sean fuente de inóculo.
- ♦ Incinerar las plantas afectadas dependiendo del valor y de la importancia que ésta tenga para el cultivador, quien es el directo

responsable de la sanidad de su cultivo. Si se comprueba infección se recomienda incineración.

- ♦ Teniendo en cuenta que estos virus no se transmiten por semilla ni por polen, los cultivadores avanzados pueden utilizar plantas enfermas como padres o madres en los cruzamientos para obtener híbridos. Sin embargo, cuando se manipulan los órganos reproductivos y las plantas es muy fácil contaminarse y transmitir mecánicamente el virus a las plantas involucradas y otras plantas del cultivo.

- ♦ Mantener las plantas libres de áfidos o pulgones, aunque no se conoce de la transmisión de los virus CyMV y ORSV por medio de insectos. Los áfidos pueden llevar residuos de savia e incluso partículas de los virus que pueden adherirse a la superficie de sus aparatos bucales y otros órganos que introducen dentro de las plantas donde se alimentan (aún no comprobado para el caso de estas orquídeas). De esta forma pueden llegar partículas de virus desde una planta infectada a una sana. Cualquier causante de heridas y su contacto con fluidos de la planta puede causar transmisión sin ser necesariamente un vector natural.

Una de las metodologías más empleadas para la propagación masiva de orquídeas, es el cultivo de tejidos *in vitro*, en especial, de tejidos meristemáticos. Sin embargo, dada la circulación sistémica de los virus dentro de todos los tejidos de la planta, una gran parte de las células pueden estar afectadas, pero existe la posibilidad de que algunas células de activo o continuo crecimiento y división como las ubicadas en los meristemas, permanezcan libres del virus o los contengan en concentraciones muy bajas. Si se toman células del punto de crecimiento, se llevan a medios de cultivo con toda la asepsia y el cuidado de no contaminarlas con implementos del laboratorio, existe una alta posibilidad de obtener explantes y por tanto, plantas libres de virus. Todo esto requiere destreza y habilidad para ubicar estas células y no contaminarlas con savia de los tejidos adyacentes ya infectados (89). Trabajos como el realizado por Lawson (70) en *Cattleya*, mostraron la localización de partículas de CyMV en forma subcelular en los meristemas obtenidos para el cultivo de tejidos, siendo un factor inconveniente el tamaño del domo apical con 0,5 a 1,0mm, lo cual es muy grande para la técnica, siendo mayor el riesgo de contaminación en infección. Esta es una técnica de poca aplicabilidad en cultivos comerciales.

Dado que es verdaderamente difícil y en muchas ocasiones imposible, erradicar los virus de un explante con el fin de propagarlo masivamente, la anterior metodología se ha complementado con un procedimiento de quimioterapia en el cual se adiciona al medio de cultivo un producto de características antivirales. Albouy *et al.* (3), registran la erradicación exitosa de CyMV y ORSV y la obtención de plantas de *Cymbidium*



libres del virus, mediante el empleo de Virazole (Ribavirin) en dosis de 25ppm, adicionado al medio de cultivo sólido con carbón activado. Requirieron para ello 5 subcultivos sucesivos con intervalos cortos (cada 18 días).

Desde inicios de la década de los 90, el avance de las técnicas de ingeniería genética y transformación de plantas ha planteado la alternativa de realizar procesos biotecnológicos en las orquídeas y buscar resistencia o tolerancia a los virus. En efecto y como parte del proceso metodológico Belarmino y Mii (17), obtuvieron plantas de *Phalaenopsis* transformadas genéticamente mediante *Agrobacterium*. Estos autores también citan dentro de su trabajo algunos estudios de otros autores sobre transformación de protocormos mediante bombardeo de partículas con material genético, donde obtuvieron bajas frecuencias de regeneración de plantas transformadas de *Phalaenopsis*, *Dendrobium* y *Vanda*. Sin embargo, aún no se conocen materiales resistentes o tolerantes obtenidos por esta vía. El hecho de no conocerse materiales resistentes o con tolerancia comprobada a estos virus, justifica en gran medida la adaptación y el empleo de metodologías para la transformación genética de orquídeas de importancia comercial, lo cual abre la gran posibilidad de introducir genes que brinden éstas y otras características deseadas en estas valiosas plantas. No tardará mucho tiempo en conocerse la existencia de plantas transgénicas portadoras de genes de resistencia o tolerancia a los virus, teniendo en cuenta que son el principal problema fitosanitario en el mundo. Es posible que ya existan estas plantas, pero aún no se dispone de esa información.

Literatura Citada

1. ADAMS, E.M.; ALLISON, A.V. The specificity of ELISA for strains of TMV. *Phytopathology* 71 (1): 103. 1981.
2. AGRIOS, G.N. *Fitopatología*. 5 ed. México, Limusa, 1991. 756 p.
3. ALBOUY, J; FLOUZAT, C.; KUSIAK, C. y TRONCHET, M. Eradication of orchid viruses by chemotherapy from in vitro cultures of *Cymbidium*. *Acta Horticulturae* N° 234: 413-419. 1988.
4. ALI, S.; LAWSON, R.H.; ISHI, M. A bacilliform virus in white-streaked *Dendrobium phalaenopsis* flowers. *American Orchid Society Bulletin* 43 (6): 531. 1974.
5. ALLISON, A.V.; ADAMS, E.B.; STEINAGEL, L. Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) as a rapid method for screening for the presence of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ring spot virus. *Phytopathology* 71 (1): 109. 1981.
6. AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY - APS. Proposed list of common names for the diseases of *Cattleya* Lindl. spp. *Phytopathology News* 29 (12): 210. 1995.



7. AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY - APS. Proposed list of common names for the diseases of *Cattleya* Lindl. spp. *Phytopathology News* 33 (7): 113-114 1999.
8. ÁNGEL C., C.A.; TSUBOTA N., M. Reconocimiento e identificación de enfermedades y plagas en *Cattleyas* colombianas. Manizales, Programa de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, 1998, 390 p. (Tesis Ingeniero Agrónomo).
9. ANGEL C., C.A.; TSUBOTA N., M. Reconocimiento e identificación de enfermedades y plagas en *Cattleyas* colombianas. *In: Centro Nacional de Investigaciones de Café. Informe Final. Convenio Federacafé (Cenicafé), Colciencias, Orquídeas Eva Ltda. Chinchiná, CENICAFÉ, 2000 a, 250 p.*
10. ÁNGEL C., C.A.; TSUBOTA N., M.; LEGUIZAMÓN C., J.E. Reconocimiento del virus del mosaico del *Cymbidium* (CyMV - Potexvirus) y del virus de la mancha circular del *Odontoglossum* (ORSV - Tobamovirus) en *Cattleya* spp. Lindl. (Orchidaceae). *In: CONGRESO Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines, 20. Manizales, Junio 30 a Julio 2 de 1999. Resúmenes. Manizales, ASCOLFI, 1999. p. 43.*
11. ÁNGEL C., C.A.; TSUBOTA N., M.; LEGUIZAMÓN C., J.E. Estudios complementarios en el reconocimiento de los virus del mosaico del *Cymbidium* (CyMV - Potexvirus) y de la mancha circular del *Odontoglossum* (ORSV - Tobamovirus) en *Cattleya* spp. Lindl. (Orchidaceae) en Colombia. *In: CONGRESO Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines, 21. Palmira, Agosto 29 a Septiembre 1 de 2000. Resúmenes. CIAT - Palmira, ASCOLFI, 2000. p. 42.*
12. ARUNASALAM, G.; PEARSON, M.N. Elisa detection of *Odontoglossum* ringspot virus in mature plants and protocols of *Cymbidium* orchids: Potential solutions to problems of sample preparation time and low virus concentration. *Journal of Phytopathology* 126 (2): 160-166. 1989.
13. BAR JOSEPH, M; GARNSEY, S.M.; GONSALVES, D.; MOSCOVITZ, M.; PURCIFULL, D.E.; CLARK, M.F.; LOEBENSTEIN, G. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69 (2): 190-194. 1979.
14. BARRY, K.; HU, J.S.; KUEHNLE, A.R. ; SUGHI, N. Secuence analysis and detection using immunocapture- PCR of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus en Hawaiian orchids. *Journal of Phytopathology* 144 (4): 179-186. 1996.
15. BATCHELOR, S.R. Orchid culture 17: diseases Part 3. Victims of virus. *American Orchid Society Bulletin* 51 (7): 719-727. 1982c.
16. BATCHELOR, S.R. Problems in *Cattleya* culture. Part 1. Pests and diseases. *American Orchid Society Bulletin* 53 (2): p. 122-128. 1984.
17. BELARMINO, M.M.; MII, M. *Agrobacterium*- mediated genetic transformation of *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Reports* 19: 435-442. 2000
18. BERTSCH, W. Virus research and accomplishments. Part 1. Diagnosis. *American Orchid Society Bulletin* 51 (10): 1064. 1982.
19. BERTSCH, W. Virus research and accomplishments. Part 2. Serology and prevention. *American Orchid Society Bulletin* 51 (11): 1180. 1982.
20. BERTSCH, W. Virus research and accomplishments. Part 3. Conclusions. *American Orchid Society Bulletin* 51 (12): 1279. 1982.
21. BODNARUK, W.H.; HENNEN, G.R.; ZETTLER, F.W. Applicability of immunodiffusion technique in detecting *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ring spot viruses in orchids. *American Orchid Society Bulletin* 47 (12): 113-116. 1978.
22. BODNARUK, W.H.; HENNEN, G.R.; ZETTLER, F.W.; SHEEHAN, T.J. Incidence of *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ring spot viruses in wild

- and cultivated orchids of the *Cattleya* alliance surveyed in Florida. *American Orchid Society Bulletin* 48 (1): 26-27. 1979.
23. BOS, L. Viruses as physico- chemical particles. *In: BOS, L. Introduction to plant virology.* London, Longman, 1983. p. 45-57.
 24. BOS, L. Virus sintoms. *In: LOEBENSTEIN, G.; LAWSON, R. H. Virus and virus- like diseases of bulb and flower crops.* New York, John Wiley and Sons, 1995. p. 1-14.
 25. BRUNT, A.A. Purification of filamentous viruses and virus- induced noncapsid proteins. *In: MILNE, R.G. The plant viruses. The filamentous plant viruses.* New York, Plenum Press, 1988. p.85-110.
 26. BRUNT, A.; CRABTREE, K.; GIBBS, A. Viruses of tropical plants. Wallingford, CAB International - ACIAR, 1990. 707 p.
 27. BURNETT, H.C. Diseases caused by fungi and bacteria. *In: American Orchid Society - AOS. Handbook on orchid pests and diseases.* Cambridge, AOS, 1975. p. 15-36.
 28. BURNETT, H.C. Orchid diseases. Florida; Florida Department of Agriculture and Consumer Services, 1974. 66 p. (Bulletin N° 10).
 29. BURNETT, H.C. Diseases caused by fungi and bacteria. *In: American Orchid Societ -AOS. Handbook on orchid pests and diseases.* West Palm Beach, AOS, 1986. p. 71-91.
 30. CHAGAS, C.M.; NORONHA, A. ; JULY, J.R. Ocorrencia de um complexo viral em *Cymbidium* no Brasil. *O Biologico* 43 (3-4): 72-77. 1977.
 31. CHIA, T.F.; CHAN, Y.S.; CHUA, N.H. Detection and localization of viruses in orchids by tissue-print hybridization. *Plant Pathology* 41 (3):355-361. 1992. Original no consultado. Abstract In: CABPEST CD 1988-8/95
 32. CHRISTIE, R.G.; KO, N.J.; ZETTLER, F.W. Light microscopic techniques for detection an diagnosis of orchid virus diseases. *American Orchid Society Bulletin* 55 (10): 996-1007. 1986.
 33. CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34 (sn): 475-483. 1977.
 34. CONVERSE, R. H. Detection of Tomato ring spot virus in red raspberry by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Plant Disease Reporter* 62 (3): 189-192. 1978.
 35. CONVERSE, R.H.; MARTIN, R.R. ELISA methods for plant viruses. *In: HAMPTON, R.; BALL, E. y DE BOER, S. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: A laboratory manual.* St Paul, The American Phytophthological Society Press, 1990. p. 179-196
 36. CORBETT, M.K. Purification by density gradient centrifugation electron microscopy, and properties of *Cymbidium* mosaic virus. *Phytopathology* 50 (5): 346-351. 1960.
 37. CORBETT, M.K. Some distinguishing characteristics of the orchid strain of Tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 57 (2): 164-172. 1967.
 38. DIJKSTRA, J. ; DE JAGER, C.P. Practical plant virology; Protocols and exercises. Berlin, Springer, 1998. 853 p.
 39. DORE, I.; DEKKER, E. L.; PORTA, C.; REGENMORTEL, M. H. V. VAN. Detection by ELISA of two tobamoviruses in orchids using monoclonal antibodies. *Journal of Phytopathology* 120 (4): 317-326. 1987.
 40. ELLIOT, M.; ZETTLER, F.W.; ZIMMERMAN, M.T.; BARNETT Jr., O.W.; LE GRANDE, M.D. Problems with intpretation of serological assays in a virus survey of orchid species from Puerto Rico, Ecuador, and Florida. *Plant Disease* 80 (10): 1160-1164. 1996.
 41. FRANCKI, R.I.B.; MILNE, R.G.; HATTA, T. Atlas of plant viruses. Vol. 1. BocaRatón. CRC Press, 1987.

42. FROWD, J.D.; TREMAINE, J.H. Physical, chemical, and serological properties of Cymbidium mosaic virus. *Phytopathology* 67 (1): 43-49. 1977.
43. GOLD, A.H.; JENSEN, D.D. An electron microscope study of Cymbidium mosaic virus. *Phytopathology* 38 (7): 577-578. 1951.
44. HADLEY, G.; ARDITTI, M.; ARDITTI, J. Orchid diseases: A compendium. *In: ARDITTI, J. Orchid Biology: Reviews and perspectives. Vol. 4. Ithaca, Cornell University Press, 1987. p. 261-325.*
45. HAMOND, J.; LAWSON, R.H. A strain of bean yellow mosaic virus is aphid-transmitted from orchid. *Acta Horticulturae* N° 234: 365-369. 1988.
46. HANCHEY, P.; LIVINGSTON, C. H.; REEVES, B. Cytology of flower necrosis in *Cattleyas* infected by Cymbidium mosaic virus. *Physiological Plant Pathology* 6 (sn): 227-231. 1975.
47. HIRUKI, C.; CHEN, M. H.; RAO, D. V. Ultrastructure of *Cattleya* leaf cells infected with Cymbidium mosaic virus. *Acta Horticulturae* N° 110: 273-279. 1980.
48. HU, J. S.; FERREIRA, S. Orchid viruses. Detection, transmission and management of Cymbidium mosaic and Odontoglossum ring spot viruses in *Dendrobium* in Hawaii. *American Orchid Society Bulletin* 63 (8): 896-898. 1994.
49. HU, J. S.; FERREIRA, S.; WANG, M.; XU, M.Q. Detection of Cymbidium mosaic virus, Tomato spotted wilt virus and Potyviruses infecting orchids in Hawaii. *Plant Disease Reporter* 77 (5): 464-468. 1993.
50. HU, J.S.; XU, M.Q.; IHA, M.; PFLUM, E.; WANG, M. Transmission, movement and inactivation of Cymbidium mosaic and Odontoglossum ring spot viruses. *Plant Disease Reporter* 78 (6): 633-636. 1994.
51. HSU, H.T.; VONGSASITORN, D.; LAWSON, R.H. An improved method for serological detection of Cymbidium mosaic potexvirus infection in orchids. *Phytopathology* 82 (4):491-495. 1992.
52. JENSEN, D.D. Breaking of *Cattleya* orchid flowers by orchid mosaic virus its transmission by Aphids. *Phytopathology* 39 (12): 1056-1059. 1949.
53. JENSEN, D.D. Mosaic of *Cymbidium* orchids. *Phytopathology* 40 (10): 966-967. 1950.
54. JENSEN, D.D. Mosaic or black streak disease of *Cymbidium* orchids. *Phytopathology* 41 (5): 401-414. 1951.
55. JENSEN, D.D. Virus diseases of *Cymbidium*. *American Orchid Society Bulletin* 22 (sn): 800-804. 1953.
56. JENSEN, D.D.; GOLD, A.H. Hosts, transmission and electron microscopy of Cymbidium mosaic virus with special reference to *Cattleya* leaf necrosis. *Phytopathology* 45 (7): 327-334. 1955.
57. JENSEN, D.D.; GOLD, A.H. virus ring spot of *Odontoglossum* orchid: Symptoms, transmission and electron microscopy. *Phytopathology* 41 (7): 648-653. 1951.
58. KADO, C.I ; JENSEN, D.D. Cymbidium mosaic virus in *Phalaenopsis*. *Phytopathology* 54 (8): 974-977. 1964.
59. KADO, C.I. Mechanical and biological inoculations principles. *In: KADO, C.I ; AGRAWAL, H.D. Principles and techniques in plant virology. New York, Van Nostrand Reinhold, 1972. p. 3-32. 688 p.*
60. KAMINSKA, M.; MALINOWSKY, T. Some characteristics of Odontoglossum ring spot virus. *Folia Horticulturae* 4 (1): 23-38. 1992. Original no consultado. Abstract *In: CABPEST CD 1988-8/95.*
61. KAMJAIPAI, K. Diseases and pests of orchids. *In: Asia Pacific Orchid Conference. Tokyo, 1984. Proceedings. Tokyo, 1984. p. 45-52.*
62. KAMJAIPAI, K. Diseases and pests of orchids. *In: KASEEM BOONCHOO NURSERY. Catalog, Thailandia, s.f. 18 p.*



63. KO, N.J.; ZETTLER, F.W.; WISLER, G.C. A simplified bioassay technique for Cymbidium mosaic and Odontoglossum ring spot viruses. *American Orchid Society Bulletin* 52 (3): 255-261. 1983.
64. KO, N.J.; ZETTLER, F.W.; EDWARDSON, J.R.; CHRISTIE, R.G. Light microscopic techniques for detecting orchid viruses. *Acta Horticulturae* N° 164: 241-247. 1985.
65. KO, N.J.; ZETTLER, F.W.; EDWARDSON, J.R. Simple method for detecting orchid viruses. *World Orchid Conference*, 12th. Tokyo, March 18-25. Tokyo, 1987. Abstract L2-3 p. 15.
66. KO, N.J.; ZETTLER, F.W.; EDWARDSON, J.R. Immunocytochemical identification of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus in orchid tissues. *Acta Horticulturae* N° 234: 299-305. 1988.
67. LAWSON, R.H. Chemical inactivation of Cymbidium mosaic and Odontoglossum ring spot viruses. *American Orchid Society Bulletin* 36 (11): 998-1001. 1967.
68. LAWSON, R.H. Etiology of flower necrosis in *Cattleya* orchids. *Phytopathology* 60 (1): 36-40. 1970a.
69. LAWSON, R.H. Flower necrosis in *Cattleya* orchids. *American Orchid Society Bulletin* 39 (4): 306-312. 1970b.
70. LAWSON, R.H. Subcellular localization of mosaic virus in Cymbidium vegetative buds of *Cattleya*. *In: Conferencia Mundial de Orquídeas, 7. Medellín, Marzo de 1972: Anales / Proceedings. Medellín. Sociedad Colombiana de Orquideología, 1972. p. 247- 253.*
71. LAWSON, R.H. Virus induced color breaking in *Cattleya* orchid flowers. *American Orchid Society Bulletin* 39 (5): 395-400. 1970c.
72. LAWSON, R.H. Viruses and their control. *In: American Orchid Society - AOS. Orchid pests and diseases. Edición revisada. West Palm Beach, AOS, 1995. p. 74-104.*
73. LAWSON, R.H.; ALI, S. Orchid viruses and their detection by bioassay, serology and electron microscopy. *In: American Orchid Society - AOS. Handbook on orchid pests and diseases. Cambridge, AOS, 1975. p. 62-103.*
74. LAWSON, R.H.; BRANNIGAN, M. Virus diseases of orchids. *In: American Orchid Society - AOS. Handbook on orchid pests and diseases. West Palm Beach, AOS, 1986. p. 2-49.*
75. LAWSON, R.H.; HEARON, S.S. Simptomatology of *Cattleya* mericlones infected with Cymbidium mosaic virus. *American Orchid Society Bulletin* 42 (12): 1071-1074. 1973.
76. LAWSON, R.H.; HSU, H. Orchid. *In: LOEBENSTEIN, G. ; LAWSON, R. H. Virus and virus- like diseases of bulb and flower crops. New York, John Wiley and Sons, 1995. p. 409-420.*
77. LESEMANN, D.E. Cytopathology. *In: MILNE, R.G. The plant viruses. The filamentous plant viruses. New York, Plenum Press, 1988. p. 179-236.*
78. LIM, S.T.; WONG, S.M.; YEONG, C.Y.; LEE, S.C.; GOH, C.H. Rapid detection of Cymbidium mosaic virus by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 41 (1):37-46. 1993. Original no consultado. Abstract *In: CABPEST CD 1988-8/95.*
79. LISTER, R.M. Application of the enzyme-linked immunosorbent assay for detecting viruses in Soybean seed and plants. *Phytopathology* 63 (10): 1393-1400. 1978.
80. MATTHEWS, R.E.F. *Plant virology*. 3 ed. San Diego, CA, Academic Press, 1991a. 853 p.
81. MATTHEWS, R.E.F. Inactivation. *In: MATTHEWS, R.E.F. Plant virology*. 2 ed. New York, Academic Press, 1981a. p. 515-560.

82. MATHEWS, R.E.F. Isolation. *In: MATTHEWS, R.E.F. Plant virology*. 2 ed. New York, Academic Press, 1981b. p. 49 - 68.
83. MATHEWS, R.E.F. Transmission and movement. *In: MATTHEWS, R.E.F. Plant virology*. 2 ed. New York, Academic Press, 1981c. p. 275-313.
84. McCAIN, A.H. *Cattleya* orchid diseases control guide. Davis, CA, University of California. Division of Agricultural Sciences, 1980. 4 p. (Leaflet N°. 2600).
85. MENEZES, L.C. Cultivation: Insect pests and diseases. *In: MENEZES, L.C. Cattleya labiata* Lindley. Rio de Janeiro, Editorial Expressao e Cultura, 1987. p. 40-43.
86. MENEZES, L.C. Cultivo, pragas e doenças. *In: MENEZES, L.C. Cattleya warneri*. Paris, Naturalia Publications, 1994. p. 106-119.
87. MESNILDREY, L.; BAYART, J. D.; BERLING, A.; ROTT, P. Dans les collections d'orchidées de Guadeloupe. Étude des virus de la mosaïque du *Cymbidium* et du ring spot de l'*Odontoglossum*. *Phytoma* N° 445: 56-60. 1992.
88. MILNE, R.G. Taxonomy of the rod -shaped folamentous viruses. *In: MILNE, R.G. The plant viruses. The filamentous plant viruses*. New York, Plenum Press, 1988. p.3-51.
89. MOREL, G.M. Producing virus-free *Cymbidium*s. *American Orchid Society Bulletin* 29 (7): 495-497. 1960.
90. MURAKISHI, H.H. Two new virus diseases in Hawaii. *Phytopathology* 42 Pacific Division Abstracts (sn): 517. 1952.
91. MURAKISHI, H.H. Host range, symptomatology, physical properties, and cross protection studies of orchid virus isolates. *Phytopathology* 48 (3): 132-137. 1958a.
92. MURAKISHI, H.H. Serological and morphological relationships among orchid viruses. *Phytopathology* 48 (3): 137-140. 1958b.
93. NAMBA, R.; ISHI, M. Failure of Aphids to transit the *Odontoglossum* ring spot and *Cymbidium* mosaic viruses to orchid plantlets derived from meristem cultures. *Phytopathology* 61 (5): 582-583. 1971.
94. NEWTON, N.; ROSBERG, D.W. Electron microscope studies of a new orchid virus complex. *Phytopathology* 42 (2): 79-82. 1952.
95. NOBREGA, N.R. Una doença de virus em orquidea. *O Biologico* 12 (3): 62-63. 1947.
96. PEARSON, M.N.; COLE, J.S. The effects of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ring spot virus on the growth of *Cymbidium* orchids. *Journal of Phytopathology* 117 (3): 193-197. 1986.
97. PEARSON, M.N.; COLE, J.S. Further observations on the effects of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ring spot virus on the growth of *Cymbidium* orchids. *Journal of Phytopathology* 131 (3): 193-198. 1991.
98. PEREZ, J.E.; ADSUAR, J.; SALA, O. Tobacco mosaic virus in orchids in Puerto Rico. *Phytopathology* 46 (12): 650-654. 1956.
99. PIRONE, P.P.; DODGE, B.O. ; RICKETT, H.W. Diseases and pests of ornamental plants. 3 ed. New York, The Ronald Press, 1960. 776 p.
100. RYU, K.H., YOON, K.E.; PARK, W.N. Detection by RT-PCR of *Cymbidium* mosaic virus in orchids. *Journal of Phytopathology* 143 (11-12): 643-646. 1995.
101. SCHELPE, E.A. An early appearance of *Cattleya* colour break virus. *American Orchid Society Bulletin* 52 (11): 1161-1162. 1983.
102. SCOPES, R. K.. Separation in solution. *In: SCOPES, R. K. Protein purification, principles and practice*. 2 ed. New York, Springer-Verlag, 1987. p. 186-198.
103. SIMONE, G. C.; BURNETT, H. C. Diseases caused by bacteria and fungi. *In: AMERICAN ORCHID SOCIETY - AOS. Orchid pests and diseases*. Edición revisada. West Palm Beach, AOS, 1995. p. 50-73.

104. SPROLES, T. An effort to eradicate *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ringspot viruses from a private collection - Results of a four-year study. *American Orchid Society Bulletin* 52 (3): 261-265. 1983.
105. SUTULA, C. L.; GILLETT, J. M.; MORRISSEY, S. M.; RAMSDELL, D. C. Interpreting ELISA data and establishing the positive - negative threshold. *Plant Disease* 70 (8): 722-726. 1986.
106. TAKAHASHI, W.N. Increasing the sensitivity of the local lesion method of virus assay. *Phytopathology* 46 (12): 654-656. 1956.
107. THIBAUT, J. Fundamental research on orchid viruses. *American Orchid Society Bulletin* 36 (10): 875-880. 1967.
108. UCHIDA, J.Y. Diseases of orchids in Hawaii. *Plant Disease Reporter* 78 (3): 220-224. 1994.
109. VEJARATPIMOL, R.; CHANNUNTAPIPAT, C.; KLUDPAN, S.; PEWNIM, T. HUMMERING, P.; MINAMIURA, N. Production of monoclonal antibodies against *Cymbidium* mosaic virus in orchid. Microbial utilization of renewable resources Vol. 7. NCRT, NUS, DOST-JSPS Joint seminar on biotechnology, December 22-26, 1990, Songkla, Thailand and Singapore, 1991, 489-492. Osaka, Japan, International Center of Cooperative Research in Biotechnology Original no consultado. Abstract *In: CABPEST CD 1988-8/95*
110. VELASCO, A.C., HERNÁNDEZ, F.; GÁMEZ, R. Una doble infección viral en orquídeas del género *Cymbidium*. *Revista de Biología Tropical* 34 (2): 171-179. 1986.
111. WALKEY, D. *Applied plant virology*. 2 ed. London, Chapman and Hall, 1991. 338 p.
112. WISLER, G.C. *How to control orchid viruses: the complete guidebook*. Gainesville, FL, Maupin House, 1989. 119 p.
113. WISLER, G.C.; ZETTLER, F.W.; MU, L. Virus infections of *Vanilla* and other orchids in french polynesia. *Plant Disease Reporter* 71 (12): 1125-1129. 1987.
114. WISLER, G.C.; ZETTLER, F.W.; PURCIFULL, D.E. A serodiagnostic technique for detecting *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ring spot viruses. *Phytopathology* 72 (7): 835-837. 1982.
115. WISLER, G.C.; ZETTLER, F.W.; SHEEHAN, T.J. A diagnostic technique developed for orchid growers to detect *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ring spot viruses. *American Orchid Society Bulletin* 52 (3): 255-261. 1983.
116. WISLER, G.C.; ZETTLER, F.W.; SHEEHAN, T.J. Common questions and misconceptions concerning orchid viruses. *American Orchid Society Bulletin* 55 (5): 472-479. 1986.
117. WONG, S. M.; CHNG, C. G.; LEE, Y. H.; TAN, K. and ZETTLER, F. W. Incidence of *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ring spot viruses and their significance in orchid cultivation in Singapore. *Crop Protection* 13 (3): 235-239. 1994. Original no consultado. Abstract *In: CABPEST CD 1988-8/95*.
118. ZAITLIN, M.; SCHECHTMAN, A.M.; BALD, J.G.; WILDMAN, S.G. Detection of virus in *Cattleya* orchids by serological methods. *Phytopathology* 44 (6): 314-318. 1954.
119. ZETTLER, F.W.; HENNEN, G.R.; BODNARUK Jr, W.H.; CLIFFORD, H.T.; SHEEHAN, T.J. Wild and cultivated orchids surveyed in Florida for the *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ring spot viruses. *Plant Disease Reporter* 62 (11): 949-952. 1978.
120. ZETTLER, F.W.; KO, N.J.; WISLER, G.C.; ELLIOT, M.S.; WONG, S.M. Viruses of orchids and their control. *Plant Disease Reporter* 74 (9): 621-626. 1990.

121. ZETTLER, F.W.; WISLER, G.C.; ELLIOT, M.S.; KO, N.J. Some new, potentially significant viruses of orchids and their probable means of transmission. American Orchid Society Bulletin 56 (10): 1045-1051. 1987.

Agradecimientos

Al Dr. Álvaro L. Gaitán B. (PhD), de Cenicafé por la revisión de éste capítulo, a la Unidad de Virología del Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT Cali, Colombia; en especial al Ing. José Arroyave por la colaboración de microscopía electrónica. Al Dr. Gerardo Martínez L. (PhD) profesor de la Universidad de Caldas por sus valiosos consejos y aportes.

