

8. Apéndice metodológico

Carlos Ariel Ángel C.
Masanobu Tsubota N.
Jairo E. Leguizamón C.
Reinaldo Cárdenas M.
Bernardo Chaves C.
Gabriel Cadena G.
Alex E. Bustillo P.



Cómo Citar:

Ángel, C. A., Tsubota, M., Leguizamón, J. E., Cárdenas, R., Chaves, B., Cadena, G., & Bustillo, A. E. (2001). Apéndice metodológico. En C. A. Ángel, M. Tsubota, J. E. Leguizamón, R. Cárdenas, B. Chaves, G. Cadena, & A. E. Bustillo (Eds.), *Enfermedades y Plagas en Cattleias*. (pp. 279–320). Cenicafé. https://doi.org/10.38141/10791/0024_8

Este apéndice o anexo metodológico, incluye los procedimientos utilizados para la realización del «Reconocimiento e identificación de enfermedades y plagas en Cattleyas colombianas», efectuado por Angel y Tsubota (4, 5), en Cenicafé. Los materiales y los métodos que a continuación se describen son procedimientos generales de común utilización en los diagnósticos fitosanitarios. Sin embargo, para el caso de las orquídeas, éste es un ejemplo de las metodologías con las cuales se obtuvieron diversos resultados, los cuales ya se presentaron en el contenido de los distintos capítulos de este documento y algunos otros que se presentan en el análisis estadístico de la información, como es el caso del Prediagnóstico, información que se recopila antes y durante la ejecución de la visita.

Esta parte metodológica está dividida en:

Reconocimiento fitopatológico.

- ♦ Características, recolección y manejo de las muestras.
- ♦ Preselección, clasificación y codificación de problemas.

Hongos

- ♦ Aislamiento y cultivo de hongos fitopatógenos.
 - Metodología general.
 - Metodologías específicas.
- ♦ Conservación de hongos.
- ♦ Pruebas de patogenicidad.
 - Aspectos Generales.
 - *Fusarium* spp.
 - *Colletotrichum* spp.
 - *Botryodiplodia* spp.
 - *Trichotecium* spp..
 - *Pestalotia* sp.
- ♦ Material vegetal para las pruebas de patogenicidad.
 - Etapa de laboratorio.
 - Etapa de endurecimiento.
 - Etapa de vivero.
- ♦ Aislamiento de los patógenos inoculados.
- ♦ Identificación.

Bacterias

- ♦ Aislamiento y cultivo de bacterias fitopatógenas.
 - Metodología general.
 - Metodología específica para la Identificación Parcial.
- ♦ Conservación de bacterias.
- ♦ Pruebas de patogenicidad.

- ♦ Aislamiento de las bacterias inoculadas.
- ♦ Identificación.

Nematodos

- ♦ Extracción y montaje de nematodos.
 - ♦ Aspectos generales:

Virus

- ♦ Determinación de la presencia y diagnóstico previo de virus.
 - ♦ Aspectos generales.
 - ♦ Plantas indicadoras.
 - ♦ Inoculaciones mecánicas en plantas indicadoras.
 - ♦ Primera inoculación.
 - ♦ Segunda inoculación.
 - ♦ Tercera inoculación.
 - ♦ Cuarta inoculación.
 - ♦ Microscopía electrónica de transmisión.
- ♦ Identificación de virus CyMV y OSRV mediante ELISA.
 - ♦ Aspectos generales.
 - ♦ Pruebas y Procedimientos.
 - ♦ Primer grupo.
 - ♦ Segundo grupo.
 - ♦ Tercer grupo.
 - ♦ Cuarto grupo.
 - ♦ Quinto grupo.
 - ♦ Sexto grupo.
 - ♦ Séptimo grupo.
 - ♦ Repetición adicional.
 - ♦ Procedimientos ELISA.
 - ♦ Microscopía electrónica de transmisión.

Histología

- ♦ Método manual.
- ♦ Inclusión vegetal en resina Spurr y cortes el ultramicrotomo.

Reconocimiento entomológico

- ♦ Características, recolección y manejo de las muestras.
- ♦ Preselección, clasificación y codificación de problemas.
- ♦ Procesamiento de artrópodos en el laboratorio.
- ♦ Conservación de muestras y artrópodos.
- ♦ Determinación y/o Identificación.

Literatura citada



Reconocimiento fitopatológico.

Características, recolección y manejo de las muestras

Se recolectaron órganos de la planta con tejido enfermo y tejido sano circundante, incluyendo la mayor cantidad posible de muestra vegetal con los diversos estados de la enfermedad. También se tomaron muestras testigo (tejidos sanos), para observar si se presentaban cambios o alteraciones producto de la colección, transporte y manipulación, que puedan desviar el procesamiento de las muestras (55, 57, 60). Es importante la limpieza en la toma de la muestra, evitando la mezcla con residuos de otras muestras, suelo o sustrato, productos químicos, residuos orgánicos e inorgánicos, etc., que favorecen el crecimiento de organismos saprofitos, o que afectan el crecimiento del agente causante. Las muestras del sistema radical afectado por un problema de posible origen patológico incluyen tanto las raíces como el sustrato en el que crecen o están en contacto (rizósfera). Lo anterior permite que en los procesos de aislamiento se puedan obtener patógenos como hongos, bacterias y nematodos que tienen su nicho ecológico en esta zona, al igual que organismos saprofitos que pueden o no perjudicar el crecimiento y desarrollo de la planta (43, 45, 46, 47, 57, 60). En el caso de plantas con posible presencia de un agente viral, se recolectan hojas jóvenes y sintomáticas totalmente desarrolladas o maduras de dichas plantas. En algunos casos se incluyeron las plantas completas dentro de la muestra, para así disponer del material suficiente en el diagnóstico y seguimiento del problema. Las muestras de orquídeas se tomaron con herramientas desinfectadas con hipoclorito de sodio entre 2 y el 5%, o con etanol al 90%; además, se flamearon en mecheros de alcohol de 90% antes y después de hacer los cortes en las plantas para esterilizar y cauterizar las heridas (32, 36). Las medidas antes mencionadas sirven para evitar la contaminación de muestras y diseminación de patógenos en el cultivo (57, 60).

Las muestras se empaclaron para evitar su contaminación y deterioro. Se utilizaron materiales limpios, secos, desechables, como el papel de aluminio, las bolsas de papel y las bolsas plásticas, debidamente rotuladas. En la manipulación y el transporte se utilizaron recipientes (neveras o cajas de icopor), con o sin refrigerantes, para reducir la humedad y la temperatura y reducir el riesgo del material recolectado. Las muestras se empaclaron individualmente y se almacenaron en nevera a 4-5°C, ó en lugares frescos, bien limpios, aireados y protegidos de la acción directa del calor, la humedad y las radiaciones (15, 55, 57). Las muestras posiblemente infectadas de virus que se someterían a ELISA, se almacenaron a -20°C para evitar la oxidación, proceso que ocurre fácilmente en tejidos de orquídeas.

Preselección, clasificación y codificación de problemas.

Para ordenar la descripción y procesamiento de las muestras en el campo y en el laboratorio y orientarlas hacia determinados procedimientos de diagnóstico se establecieron códigos para los distintos tipos de problemas en estudio, facilitando su manejo ordenado (15, 55). De forma cualitativa se agruparon aquellas muestras con síntomas similares, y con base en la información bibliográfica se clasificaron y codificaron los problemas con posible origen patológico (Tabla 58).

Para la realización de los análisis estadísticos estos códigos pueden cambiar, pero no se varían las clasificaciones de los problemas. Al establecer códigos numéricos o alfanuméricos se pueden sistematizar y construir bases de datos con cada uno de los problemas de interés y agilizar el manejo e interpretación en el laboratorio (4, 5, 6, 7). La codificación propuesta de cada muestra se realizó de la siguiente manera:

- A y B : Código del cultivo o predio.
C : Código de la especie hospedante.
D y E : Código del problema.
F, G, H, I : Código de la muestra. Número de orden.

|_A_|_|_B_|_|_C_|_|_D_|_|_E_|_|_F_|_|_G_|_|_H_|_|_I_|_|

Tabla 58. Codificación utilizada para los distintos problemas con posible origen patológico

PROBLEMA	CÓDIGO
Pudriciones húmedas	01
Pudriciones secas	02
Marchitamientos	03
Manchas foliares	04
Royas	05
Hongos de manto	06
Manchas florales	07
Agallas o deformaciones	08
Lesiones radicales	09
Mosaicos o moteados	10
Alteraciones del sustrato o medio	11
Otros problemas de índole patológico	12

Los códigos de las especies hospedantes estudiadas fueron:

ESPECIE	CÓDIGO
<i>Cattleya aurea</i> .	a
<i>Cattleya mendelii</i> .	m
<i>Cattleya quadricolor</i> .	q
<i>Cattleya schroderae</i> .	s
<i>Cattleya trianaei</i> .	t
<i>Cattleya warszewiczii</i> .	w
<i>Cattleya</i> spp. (desconocida colombiana)	x

Hongos

Aislamiento y cultivo de hongos fitopatógenos.

Metodología general. Para este tipo de investigaciones se acudió a adaptaciones de varias de las técnicas de diagnóstico reconocidas con el fin de establecer un sólo procedimiento de trabajo en el laboratorio. Se utilizaron entonces los siguientes procedimientos para el aislamiento y cultivo de hongos fitopatógenos basados en la literatura disponible (15, 23, 50, 55, 57, 58, 60, 62).

- ♦ Realizar observaciones al estereomicroscopio del área enferma para determinar la presencia de estructuras vegetativas o fructíferas de hongos.
- ♦ Cortar pequeños trozos de 0,5cm aproximadamente, de manera que la porción incluya tejido enfermo y tejido sano donde está activo el patógeno.
- ♦ Lavar las porciones o desinfectarlas superficialmente con hipoclorito de sodio al 0,5% por 1 a 2 minutos y luego enjuagarlas con agua destilada estéril por igual tiempo y en agitación.
- ♦ Sembrar las porciones de muestra vegetal desinfectadas en cajas de Petri con medios de cultivo generales como Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Jugo V-8 Agar (AV-8) y Harina de Maíz Agar (HMA) según la sintomatología presentada por la muestra. Estos medios se preparan previamente, se pueden acidificar con ácido láctico (40%) hasta tener un pH de 4,5 a 5,0 para reducir el crecimiento de bacterias contaminantes o no acidificarlos, caso en el cual el pH es de 5,5 a 6,0. La siembras se realizan en áreas asépticas y en cámaras de flujo laminar para evitar contaminaciones.
- ♦ Ubicar las cajas con medio de cultivo sembradas y selladas con vinilpel en el laboratorio o cuarto de crecimiento para incubarlas a

23-25°C, con períodos de luz artificial de 12 horas aproximadamente. Las colonias obtenidas se señalan y codifican para su aislamiento y purificación.

Para la identificación parcial de los géneros de los hongos aislados se utilizan claves especializadas (9, 21, 30). Como fase inicial de la conservación de organismos propuesta para los cultivos puros se pueden realizar siembras de los aislamientos en viales con medio de cultivo para utilizarlos como inóculo en las pruebas de patogenicidad y/o almacenamiento. En el caso de problemas como manchas foliares y otros en los que se pudieron apreciar de manera evidente las estructuras del hongo, se realizaron montajes temporales de placas con y sin colorantes (azul de lactofenol), para la observación de dichas estructuras al microscopio. Igualmente, se pueden realizar cortes en micrótopo manual para determinar la presencia de estructuras en los tejidos de la muestra. La identificación para algunas muestras se realizó de manera rápida para establecer el género y se inició el proceso de aislamiento y cultivo como antes se explicó. Las muestras que no presentaron estructuras del hongo al observar en estereoscopio se sometieron a condiciones de cámara húmeda en caja Petri plástica, durante 5 o 10 días para promover el crecimiento y esporulación de los hongos. Para hongos de manto o fumaginas el diagnóstico e identificación se hace directamente por medio de observación de placas al microscopio, por su facilidad en el manejo al desprenderse la película micelial superficial que las forma.

Metodologías específicas. Como no existen técnicas o procedimientos adaptados o aplicables para todos los microorganismos al mismo tiempo, se utilizaron algunas metodologías específicas adicionales a las descritas en forma general, que sirven para obtener y mantener en cultivo determinados géneros de hongos que garantizan en lo posible un adecuado diagnóstico, identificación y cultivo. Después de verificar la pureza de los aislamientos algunos de estos géneros identificados se cultivan en los siguientes medios específicos:

Medio CLA (Hojas de clavel agar). Medio específico para *Fusarium* sp., utilizado para la identificación de especies, activación de la patogenicidad y producción de esporas viables. Existe una preparación básica (27), pero se pueden hacer cambios de acuerdo con las necesidades o recursos disponibles, como se hizo en este trabajo modificando el proceso de desinfección de las porciones de hojas de clavel. Con este propósito se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 0,5% durante 1 minuto y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril por 2 minutos. También se probó un medio con 40g de hojas de clavel maceradas (sin filtrar) y 20g de agar por litro de agua; el crecimiento del hongo en este medio fue muy similar al medio CLA normal.



Sustrato Trigo. Este sustrato consta de semillas de trigo contenidas en proporción de volumen 1:1 (trigo : agua destilada estéril) y esterilizados en autoclave. Se utiliza para la reactivación de la patogenicidad de aislamientos de *Fusarium* a utilizar en las pruebas de patogenicidad. Este sustrato también sirve como medio para el incremento de este hongo.

Medio CM (Medio *Colletotrichum*). Específico para la producción de conidias de *Colletotrichum* sp. Se colocan los cultivos bajo condiciones de 12 horas de exposición a lámparas de luz negra. Sin embargo, se puede modificar la técnica al no realizar esta incubación, manteniendo los cultivos en las condiciones ambientales del laboratorio. Los componentes y la preparación de este medio son citados por Gil (28).

Conservación de hongos.

Para el almacenamiento de hongos cultivados se utilizó la conservación en aceite mineral. La viabilidad de los hongos así conservados debe evaluarse periódicamente por la heterogeneidad en el crecimiento y desarrollo en los medios de cultivo, adicionado esto a los procesos de identificación parcial de los mismos (26, 51, 52). En trabajos de diagnóstico es recomendable realizar las pruebas de patogenicidad para hongos ya identificados de manera consecutiva, sin recurrir a los hongos almacenados para no perder viabilidad y patogenicidad de aislamiento fúngico durante los subcultivos o en el almacenamiento.

En este trabajo se efectuaron algunos procesos de almacenamiento temporal, mas no se evaluó su viabilidad en el tiempo utilizando el siguiente procedimiento: los cultivos puros activos y maduros de los microorganismos de interés se sembraron en tubos de ensayo de 25ml con estrías cortas o en viales de 6,0ml que contenían medio de cultivo. Luego, el aceite mineral o parafina líquida (0,83 a 0,89 de gravedad específica), se esterilizó a 15 libras de presión y 121°C durante 15 minutos.

Después de enfriado el aceite se adicionó a cada tubo hasta un nivel de 1cm por encima de la superficie del medio cultivado de manera indirecta, evitando el arrastre brusco del microorganismo. Este tubo con el hongo en aceite se localizó en el laboratorio a temperatura ambiente o refrigerado a 4°C.

De manera alterna, se puede utilizar un método de conservación de microorganismos utilizando viales con agua destilada estéril, donde se depositan las estructuras vegetativas (micelio) y fructíferas (conidias o esporas) del hongo. Estos viales herméticamente cerrados se

almacenan a temperatura ambiente del laboratorio y en nevera a 4°C, pero deben utilizarse rápidamente para evitar pérdidas de viabilidad y patogenicidad.

Pruebas de patogenicidad

Aspectos Generales. Para confirmar si un hongo aislado de alguna lesión o disturbio era el verdadero causante del mismo, debían cumplirse los postulados de Koch, los cuales son aplicables a algunos de los organismos estudiados (2, 59). En esencia, estos postulados indican que el hongo debe aislarse y cultivarse puro en medios artificiales, luego se debe inocular en plantas de la misma especie de donde se aisló y reproducir los mismos síntomas a los originales, pudiendo posteriormente reaislarse y cultivarse a partir de estos tejidos enfermos. Se realizaron 53 pruebas de patogenicidad para los hongos obtenidos en medios generales y/o específicos siguiendo varios procedimientos:

A estos cultivos mantenidos en forma pura y activos en caja de Petri se les adicionó agua destilada estéril, agitando suavemente con un asa para incorporar el hongo. La suspensión se depositó en un tubo de ensayo esterilizado, con 0,5ml de Tween 80 por 100ml de suspensión para dispersar estructuras, se tapó y se almacenó en nevera a 4-5°C. A cada suspensión fúngica se le determinó la concentración de esporas mediante el conteo en hemocitómetro (cámara de Neubauer) antes de la inoculación (59, 62). Las plantas u órganos por inocular se desinfectaron previamente con alcohol al 70% y se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril. A su vez, se colocaron tratamientos testigos donde se utilizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, reemplazando la suspensión fúngica por agua destilada estéril. Cada metodología para la inoculación de cada uno de los aislamientos se debe practicar mínimo en dos plantas de orquídeas, al igual que los testigos de agua destilada estéril.

Teniendo en cuenta la procedencia del microorganismo aislado, en cuanto al órgano que afecta y las características biológicas principales de los géneros a los cuales pertenecen los respectivos hongos, se realizaron las inoculaciones buscando reproducir las condiciones en las cuales ocurre la enfermedad en forma natural. Las inoculaciones se efectuaron colocando gotas de la suspensión sobre heridas hechas en el órgano por infectar en la planta. Luego estas plantas se ubicaron en cámara húmeda para favorecer el crecimiento del hongo inoculado, la expresión de síntomas y el desarrollo de los signos del patógeno. La evaluación de la presencia de síntomas y signos se hizo constantemente hasta los 60 días después de inoculados en las plantas. Simultáneamente con la inoculación de las suspensiones fúngicas, se establecieron

controles de germinación y de viabilidad de las esporas y/o micelio utilizados. Estos controles se efectuaron depositando gotas de la suspensión fúngica en láminas portaobjetos colocadas dentro de cajas de Petri esterilizadas como cámaras húmedas. Estas láminas se evaluaron posteriormente al microscopio, donde se registró la presencia de tubos germinativos y/o hifas del micelio del hongo utilizando como colorante el azul de lactofenol. De acuerdo con los géneros de hongos por inocular se debe consultar en la literatura la forma de penetrar a la planta, las concentraciones de esporas o micelio, las condiciones ambientales y el tiempo requerido para producir enfermedad. En Cenicafé se realizaron pruebas para algunos hongos fitopatógenos, teniendo en cuenta las siguientes características:

Fusarium spp. Se hicieron inoculaciones para 35 aislamientos, donde para cada uno de ellos se empleó una planta con su repetición para las distintas suspensiones del mismo aislamiento. Las concentraciones utilizadas fueron la recomendada por Turner and Van Alfen (63), (6×10^4 esp/ml), y la concentración obtenida al realizar en forma directa la suspensión. Algunos aislamientos se inocularon usando el crecimiento obtenido sobre los granos de trigo y en otros, se utilizó el crecimiento de la caja de Petri, ubicándolos directamente sobre las heridas efectuadas. También se realizaron pruebas con ambos tipos de inóculo para algunas de las inoculaciones.

Colletotrichum spp. Se inocularon 52 aislamientos utilizando la siguiente metodología: suspensión de esporas del hongo en agua destilada estéril centrifugada dos veces a 3.000rpm durante dos minutos, cambiando el agua sobrenadante entre centrifugaciones (28). Esto se efectúa para eliminar autoinhibidores de germinación. Después de esta centrifugación se realizó el conteo de esporas y el ajuste de la concentración a 5×10^5 esp/ml. También se realizaron inoculaciones de suspensiones fúngicas de algunos aislamientos integrados principalmente por micelio, y para otros aislamientos utilizaron ambas metodologías.

El método de inoculación fue el mismo utilizado para la inoculación de *Fusarium*, en el cual se hacen heridas.

Botryodiplodia spp. De este hongo se inocularon 2 aislamientos utilizando porciones del micelio cultivado en medio artificial. El micelio se ubicó directamente sobre la herida efectuada en el órgano inoculado. Se utiliza cuando no es posible hacer las suspensiones en agua destilada por la producción reducida de picnidios y esporas en el medio de cultivo.

Trichotecium spp. Se inocularon 2 aislamientos de este hongo empleando suspensiones con una concentración de 5×10^5 esporas/ml. Se inocularon hojas mediante la técnica de punción.

***Pestalotia* sp.** De igual forma que el anterior hongo se inoculó un aislamiento de éste en hojas de *Cattleya* sp., utilizando una suspensión de 5×10^5 esporas/ml.

***Macrophoma* sp y *Alternaria* sp.** Se inoculó un aislamiento para cada uno, empleando micelio cultivado en medio artificial. El primero de ellos se inoculó en *C. trianaei* y el segundo en *C. mendelii*. Ambos se habían obtenido de manchas foliares.

Material vegetal para las pruebas de patogenicidad.

Para verificar la patogenicidad de los microorganismos de interés mediante inoculaciones, se deben utilizar plantas de las mismas especies de las cuales se aislaron. Para este caso se utilizaron *Cattleya aurea*, *C. quadricolor*, *C. mendelii*, *C. schroderae*, *C. trianaei* y *C. warszewiczii*, obtenidas por el vivero Orquídeas Eva Ltda., ubicado en la vereda Castilla, municipio de Pereira (Risaralda), a una altitud de 1.200m, en condiciones de cultivo con temperaturas nocturnas de 18°C y diurnas de 30°C aproximadamente, una humedad relativa nocturna del 90% y diurna del 50% en promedio y cultivos bajo invernadero. Para garantizar la confiabilidad de las pruebas se emplearon plantas de 12 a 24 meses de edad con estructuras verdaderas (hojas y pseudobulbos), obtenidos *in vitro* en el laboratorio. Dichas plantas se transportaron a las instalaciones de Planalto de Cenicafé en Chinchiná, Caldas y se ubicaron en “casas de mallas” con la debida anticipación, para la aclimatación y adaptación a las condiciones donde se realizaron las pruebas.

Etapas de laboratorio. Las semillas de las seis especies del género *Cattleya* se sembraron en el laboratorio 9 - 12 meses después de la polinización artificial en los medios de cultivo esterilizados Murashige & Skoog MS (sin hormonas) servido en recipientes de vidrio e incubados bajo luz artificial con fotoperíodo de 16 horas a una temperatura promedio de 26°C. Luego de la germinación se realizaron dos trasplantes para obtener plántulas ideales, aptas para llevarlas a condiciones de vivero. Las plántulas de tamaño óptimo se caracterizaron por tener raíces funcionales sanas y vigorosas, 4-6 primordios foliares, hojas más jóvenes con una longitud de 2-3 cm y una altura de 3 a 4cm. La duración de la etapa fluctuó entre 18 y 24 meses. (Figura 176-177).

Etapas de endurecimiento. Las plántulas extraídas de los frascos se sembraron en bandejas con marco de madera y un fondo de malla metálica o en materos plásticos en forma comunitaria. Se utilizó como sustrato una mezcla de corteza de pino pátula picada en tamaño fino (0,5-1cm) y corteza de coco picado finamente (0,5-1cm) en proporción

1:1. Las plántulas sembradas se ubicaron sobre mesas con luminosidad del 50%, humedad del 90% en la noche y 50% en el día y temperaturas nocturnas de 18°C y diurnas de 30°C, en promedio. En el manejo de las plántulas el riego manual se realizó de acuerdo con la humedad del sustrato en el transcurso del día, intensificándose en verano y reduciéndose en invierno. Se utilizó un fertilizante de fórmula 30-10-20-4, aplicado en forma líquida en concentración de 0,1% p/v, semanalmente. No se utilizaron cámaras húmedas y/o los sistemas de nebulización para el endurecimiento de plántulas como se requiere normalmente en la adaptación al campo, ya que las plántulas se transplantaron de los frascos en una fase avanzada, con estructuras foliares y radicales en pleno funcionamiento que permitieron una rápida adaptación.

Etapas de vivero. Se individualizaron las plantas cultivadas en forma comunitaria. Se hizo el mismo manejo que en el vivero y en el momento del trasplante se desinfectaron las plántulas con un fungicida protector (Mancozeb 1g/L) en aspersión e inmersión en el insecticida clorpirifos (Lorsban 1ml/L), adicionándole 5ml/L de aceite agrícola. Se utilizó el sustrato de corteza de pino pátula (*Pinus patula*) de tamaño medio (1-2cm) y “capacho” de coco (*Cocos nucifera*) de tamaño medio en proporción 2:1. Las plantas sembradas se colocaron en mesas dentro del vivero bajo las mismas condiciones de luminosidad, temperatura y humedad antes mencionadas. Se realizaron de 2 a 3 aplicaciones de riego semanal en verano y de 1 a 2 en invierno.



Figura 176.
Laboratorio *in vitro*
en Orquídeas Eva.



Figura 177.
Planta de *Cattleya trianaei* *in vitro*



Figura 178.
Cattleyas en
“Casa de
Mallas”

Se hizo similar fertilización que en la etapa de endurecimiento. La frecuencia de trasplante dependió de la adaptación y del crecimiento de la planta, la cual no fue homogénea en las seis especies, pero si similar.

Para evitar los posibles problemas sanitarios durante el proceso de adaptación de las plantas y la realización de las pruebas en las condiciones de Cenicafé, se trasladaron a la «casa de mallas» que tenía las siguientes condiciones: temperatura máxima promedio de 34°C±2°C, temperatura mínima promedio de 15°C±2°C), temperatura media promedio de 24°C±2°C, promedio de humedad relativa máxima del 100%, promedio de humedad relativa mínima del 30%, humedad relativa media del 75% en promedio y luminosidad interna de un

40 a 60% respecto al exterior. Se efectuaron limpiezas periódicas de pisos y paredes de la “casa de mallas” (Figura 178) y del cuarto de inoculaciones, con agua, jabón e hipoclorito de calcio. Igualmente se tuvo un manejo preventivo para las prácticas de cultivo sobre estas plantas.

Aislamiento de los patógenos inoculados

Para dar cumplimiento al cuarto postulado de Koch, se reaislaron los patógenos inoculados (aislamientos de hongos), de aquellas plantas de *Cattleya* spp., que manifestaron los síntomas de la enfermedad y los signos del patógeno en las pruebas de patogenicidad. Dichos aislamientos se efectuaron una vez finalizadas las pruebas de patogenicidad; por tanto, se utilizaron las mismas metodologías empleadas para el aislamiento de hongos fitopatógenos descritas en la etapa de procesamiento.

Identificación. Para la identificación definitiva del género de los hongos que resultaron patógenos en las pruebas realizadas se utilizaron claves especializadas (9, 21, 30) de acuerdo al grupo taxonómico del hongo por identificar. Además, se recurrió a la información bibliográfica.

Bacterias

Aislamiento y cultivo de bacterias fitopatógenas.

Metodología general. Teniendo en cuenta los aspectos generales en cuanto a la toma y manejo de las muestras dado anteriormente, se inició el proceso de aislamiento, recurriendo a procedimientos generales (15, 45, 47, 55, 49, 62).

- ♦ Se efectuaron observaciones al estereoscopio para determinar la presencia de exudados u otra sintomatología característica.
- ♦ Se seleccionaron porciones de la muestra, que incluyeran estados iniciales de la infección, cortando porciones más pequeñas de 0,5 a 1cm de largo. Estas se sometieron a los procedimientos de desinfección y de lavado descritos para hongos. En algunos, se omitió la utilización del hipoclorito de sodio al 0,5% y se lavaron las porciones de muestra en agua corriente y/o agua desionizada durante 5 o 10 minutos y hasta 30, dependiendo del estado de la muestra.
- ♦ Las siembras de pequeñas porciones de tejido vegetal afectado, se efectuaron asépticamente en el medio de cultivo bacteriológico general

Agar Nutritivo (AN) esterilizado y servido en cajas Petri, al igual que en los otros medios generales utilizados para hongos, específicamente los no acidificados. Cuando las muestras presentan exudados acuosos puede emplearse la técnica de siembra por superficie.

- ♦ Las cajas sembradas y selladas con vinilpel se incubaron en el laboratorio. Las diferentes colonias formadas a las 24 a 48 horas de sembradas, se marcaron, para iniciar la purificación realizando nuevas siembras y aislamientos en medio AN.

Los cultivos puros y activos de las distintas bacterias posiblemente causantes del problema de interés se utilizaron para la identificación inicial de géneros comunes de bacterias fitopatógenas (49), que se explica en forma general a continuación.

Metodología específica para la identificación parcial. Consiste en la utilización de medios de cultivo diferenciales en forma sistemática, para la determinación de bacterias con antecedentes fitopatógenos. La identificación depende del crecimiento positivo o negativo de la bacteria en los medios, resultando el género al cual puede pertenecer la misma (Figura 179).

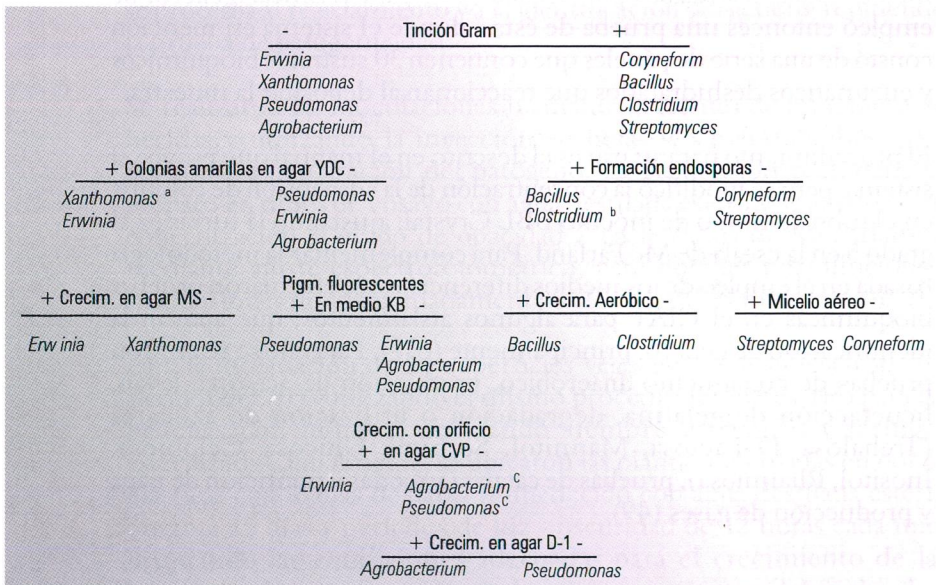


Figura 179. Representación esquemática de la metodología para la identificación de géneros comunes de bacterias fitopatógenas (49).

^a Colonias usualmente mucoides.

^b Las células de *Clostridium* que contienen esporas son hinchadas, mientras que las células de *Bacillus* no lo son.

^c Algunas especies de *Agrobacterium* y *Pseudomonas* pueden producir hoyos profundos en CVP.

Adicional a los aislamientos de bacterias obtenidos directamente de las siembras en AN, se aíslan, purifican e identifican aquellos crecimientos bacteriales que se presentaron en las siembras de tejidos enfermos en los medios de cultivo generales (PDA, HMA y AV-8), utilizados para el aislamiento de hongos fitopatógenos. Se tuvo en cuenta que una misma sintomatología expresada por la planta puede deberse al ataque de hongos y/o bacterias.

La tinción de Gram es la primera técnica empleada para determinar si una bacteria es fitopatógena, ya que éstas son Gram negativas en los géneros registrados (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium* y *Erwinia*). Se recomienda su complemento con la prueba en solución de KOH al 3% para separar las bacterias según su filancia y definir bien el tipo de Gram. De esta manera se seleccionan cuáles son los aislamientos de bacterias por almacenar y por utilizar en las pruebas de patogenicidad, en los medios diferenciales y en las pruebas bioquímicas.

Existen en el mercado dispositivos o kits para la identificación de bacterias, especialmente aquellas de importancia clínica (humana o animal) e industrial. Uno de éstos es el BBL Crystal para la identificación de enterobacterias no fermentativas y puede utilizarse en el caso de géneros fitopatógenos como técnica adicional a las metodologías planteadas por Schaad (49), para clasificar género. Se empleó entonces una prueba de éstas, donde el sistema en mención constó de una serie de paneles que contienen 30 sustratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados que reaccionan al depositar la muestra.

El procedimiento para su uso es el descrito en el manual que provee el sistema, pero se modificó la concentración de la suspensión de colonias en el tubo de fluido de inóculo BBL Crystal, ajustando la turbidez al grado 5 en la escala de Mc Farland. Para complementar la metodología basada en el empleo de los medios diferenciales, se efectuaron pruebas bioquímicas en el CIAT para algunos aislamientos, que apoyan la identificación de género, principalmente (6, 7). Para ello se realizaron pruebas de crecimiento anaeróbico, producción de acetona, levan, licuefacción de gelatina, degradación o utilización de azúcares (Trehalosa, D-Lactosa, Mannitol, Sorbitol, Glucosa, Celobiosa, Inositol, Rhamnosa), pruebas de catalasa y oxidasa, pudrición de papa y producción de gases (49).

Conservación de las bacterias.

Existen diversos métodos de conservación entre los que están las diluciones en agua destilada estéril, cultivos en medios cubiertos con

aceite mineral o glicerol y papel filtro con suspensiones bacteriales, entre otros. Sin embargo, en Cenicafé se utilizaron las suspensiones en agua destilada estéril y refrigeradas, como principal método de conservación temporal y en menor grado, el método de cubrir los cultivos con aceite mineral, ambos descritos en el capítulo de hongos.

Pruebas de patogenicidad.

En este caso también se deben cumplir los postulados de Koch, ya que las bacterias permiten ser aisladas y cultivadas en medios artificiales, luego se inoculan para reproducir síntomas y pueden aislarse de los tejidos enfermos inoculados (2, 59). Las pruebas de patogenicidad se realizaron siguiendo los procedimientos básicos.

Para estos microorganismos se efectuaron 14 pruebas de patogenicidad (4, 5) y posteriormente otras 34, utilizando los aislamientos purificados y cultivados (6, 7). Algunos de estos aislamientos ya estaban identificados en su género; sin embargo, también se realizaron inoculaciones de aislamientos a los cuales sólo se les conocía que eran Gram negativos, previos a la identificación del género para agilizar el procedimiento de las pruebas de patogenicidad. Si éstas eran positivas se procedía al reaislamiento y a la identificación del género, repitiendo la prueba de patogenicidad.

Se realizaron las inoculaciones mediante la técnica de punción o de heridas y utilizando la inyección en hojas y/o pseudobulbos, para permitir la penetración del patógeno. La suspensión bacteriana se preparó en tubos de ensayo con agua destilada estéril y se ajustó en su concentración al grado de opacidad 2 en la escala de McFarland o mediante ajuste espectrofotométrico, para obtener por diluciones, suspensiones de aproximadamente 6×10^7 a 1×10^8 células/ml (46, 63).

Para la inoculación de las superficies vegetales se desinfectaron con alcohol del 70% utilizando el mismo procedimiento descrito para las pruebas con hongos, utilizando siempre utensilios y jeringas esterilizadas. Igualmente, se ubicaron las plantas inoculadas en bolsas plásticas con toallas de papel humedecido con agua destilada estéril, durante 15 días y períodos de luz - oscuridad de 12 horas cada uno, brindando las condiciones adecuadas para el crecimiento de las bacterias y la manifestación de los síntomas (cámara húmeda). Los tratamientos testigo se inocularon con agua destilada estéril. Para cada aislamiento inoculado se utilizaron mínimo dos plantas con distintas concentraciones, como en las pruebas para hongos. Las observaciones y evaluaciones se hicieron cada 3 días durante 2 semanas. También se utilizaron cámaras húmedas del CIAT, a 26-28°C, con humedad

relativa cercana al 100% y luz oscuridad en forma alterna, con el fin de acelerar la aparición de síntomas. Otra técnica rápida empleada para probar la patogenicidad de algunos aislamientos de bacterias se realizó en hojas desprendidas sanas de *Cattleya* sp., que se ubicaron sobre láminas portaobjetos esterilizados dentro de cajas de Petri esterilizadas, como cámara húmeda. Las hojas se inocularon con la suspensión bacteriana mediante punción o herida y se evaluó diariamente la aparición de manchas y pudriciones. El material vegetal empleado tuvo como origen el vivero Orquídeas Eva Ltda., propagado por vía sexual *in vitro*, con una edad entre 12 y 24 meses, totalmente sano.

Aislamiento de las bacterias inoculadas.

Para cumplir con el cuarto postulado de Koch, se reaislaron las bacterias inoculadas de aquellas plantas y/u hojas de *Cattleya* spp., que manifestaron los síntomas de la enfermedad, después de terminadas las pruebas. Se utilizaron las mismas metodologías empleadas para el aislamiento inicial descritas en la etapa de procesamiento.

Identificación.

Se utilizó la metodología básica (49), con la cual se pueden identificar los géneros de bacterias fitopatógenas que afectan *Cattleya* spp. complementada con pruebas bioquímicas. Éstas se realizaron para aquellas bacterias Gram negativas de géneros reconocidos como fitopatógenos (*Erwinia*, *Xanthomonas* y *Pseudomonas*, principalmente). Se hizo después de las pruebas de patogenicidad, para agilizar la identificación llegando en lo posible a especie o grupo para un aislamiento patógeno.

Nematodos

Extracción y montaje de nematodos.

Aspectos generales. La sintomatología descrita para plantas posiblemente afectadas por nematodos incluye agallas o tumefacciones, lesiones en el sistema radical, oxidación de haces vasculares, heridas o perforaciones corticales, atrofiamiento de coñas y de las raíces en formación, entre otros. (45, 55), para los cuales se han empleado diversos métodos para la extracción de los nematodos (44). Sin embargo, existen otros organismos que pueden causar estas agallas o deformaciones, como algunos estados inmaduros y adultos de insectos del orden Hymenoptera.

Para determinar si una muestra de tejido vegetal está afectada por nematodos se debe realizar inicialmente una observación minuciosa en el estereoscopio, complementada con técnicas como la centrifugación y flotación en soluciones azucaradas, filtración por papel absorbente y tamizados, entre otras. Estas pruebas deben hacerse tanto a las plantas como a los sustratos o medios donde se cultivan. La identificación de orden y género puede lograrse mediante documentos básicos (61).

Virus

Determinación de la presencia y diagnóstico previo de virus.

Aspectos generales. Como en los anteriores problemas fitopatológicos, para la clasificación y ordenamiento de las muestras se tuvo en cuenta la sintomatología producida por los virus registrada en la literatura, tales como mosaicos, moteados, manchas necróticas o cloróticas, manchas de formas definidas, distorsión o ruptura del color en las flores y deformaciones en distintos órganos, entre otros (12, 37, 39, 67).

Para el diagnóstico de problemas de origen viral en orquídeas existen metodologías ampliamente conocidas como son el uso de plantas indicadoras, la prueba de aglutinación de cloroplastos, la doble difusión en agar, la prueba inmunoabsorbente de enzimas en cadena (ELISA), microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión y la inmuno-microscopía electrónica y anticuerpos monoclonales, entre otras (10, 17, 24, 38, 67, 68). Sin embargo y teniendo en cuenta que se buscaba un reconocimiento general, se utilizaron las plantas indicadoras y ELISA, metodologías que se presentan a continuación:

Plantas indicadoras. Esta metodología biológica se puede emplear para el diagnóstico en su fase inicial, según la expresión de síntomas o lesiones específicas (locales o sistémicas) producidas por los virus inoculados. Para el caso de *Cattleya* spp., la literatura registra al Virus del Mosaico del Cymbidium (CyMV - Potexvirus) y al Virus de la Mancha Anular del Odontoglossum (ORSV - Tobamovirus antes TMV-O), como los únicos que afectan este género. Estas plantas indicadoras y el tipo de lesión que se producen se mencionan por Lawson y Brannigan (38), Wisler (67) y Lawson (37). A continuación, en la Tabla 59, se presentan los materiales de semilla obtenidos y su procedencia, teniendo en cuenta que no todos ellos se utilizaron para las inoculaciones. Como no se contaba con la información detallada para el cultivo de las plantas indicadoras, se realizaron algunas pruebas y observaciones preliminares en aspectos como: germinación, trasplantes, sustratos, levante en vivero, sanidad y fertilización, entre

Tabla 59. Material de semilla de plantas indicadoras obtenido para la producción de lesiones mediante la inoculación de muestras de *Cattleya* spp., con posibilidad de estar afectadas por virus, y su procedencia (4- 5)

PLANTA INDICADORA (SEMILLA)	TIPO DE LESIONES ESPERADAS AL INOCULAR	PROCEDENCIA
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Lesiones locales	Unidad de Virología CIAT (Palmira, Valle) Dr. Antonio Angarita U. Nacional (Bogotá, D.C.)
<i>Gomphrena globosa</i>	Lesiones locales en hojas maduras	Orquídeas EVA Ltda (Pereira, Risaralda) Unidad de Virología CIAT (Palmira) La Cabaña (Manizales, Caldas)
<i>Cassia tora</i>	Lesiones locales en cotiledones y hojas jóvenes	Santágueda (Palesina, Caldas))
<i>Datura stramonium</i>	Lesiones locales en hojas maduras	Unidad de Virología CIAT (Palmira)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Lesiones locales	Dr. Juan C. Herrera CENICAFÉ (Chinchiná, Caldas) Unidad de Virología CIAT (Palmira)
<i>Cassia (Zenna) occidentalis</i>	Lesiones locales en cotiledones y hojas jóvenes	Unidad de Virología CIAT (Palmira)
<i>Chenopodium quinoa</i>	Lesiones locales	Unidad de Virología CIAT (Palmira) Dr. Gerardo Martínez. U. Caldas (Manizales)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Lesiones locales	Dr. Juan C. Herrera CENICAFÉ (Chinchiná)
<i>Nicotiana glutinosa</i>	Lesiones locales	Dr. Gerardo Martínez. U. Caldas (Manizales)

otros. Con los resultados obtenidos en estas pruebas, algunos de los cuales se presentan a continuación como parte del componente metodológico, se obtuvieron plantas indicadoras de *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa* y *Gomphrena globosa*.

En términos generales, se obtuvo lo siguiente: La germinación se logró en suelo franco arenoso (1:1) esterilizado, a excepción de *G. globosa* que germinó mejor en cámara húmeda con papel absorbente. El trasplante se hizo entre 5 a 10 días después de la germinación a un sustrato de suelo de cenizas volcánicas (Unidad Chinchiná) franco arenoso, complementado con materia orgánica bien descompuesta (pulpa de café), en proporción 2:1. Los mejores recipientes fueron vasos plásticos desechables de 400-450g de capacidad, excepto las plantas para producción de semilla de *D. stramonium* que requieren recipientes con capacidad hasta de 2,0kg.

La fertilización se efectuó por lo general a los 30 y 60 días después de germinación con DAP (fosfato di-amónico), en dosis de 2,0 g por planta, pero en *Cassia (Zenna) occidentalis*, es necesario reducir el tiempo entre fertilizaciones. Las plantas de *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum* aparentemente no responden a esta fertilización, ya que siempre manifestaron clorosis, área foliar reducida y un aspecto débil y quebradizo. Las plantas para la inoculación se obtuvieron en invernadero “casa de mallas” con 60% de luminosidad respecto al exterior, mientras que plantas para producción de semilla de *Ch. amaranticolor* y *G. globosa*, se obtuvieron con 80% de luminosidad para la primera y a plena exposición solar y fuera de la “casa de mallas” para la segunda, mejorando la fecundación.

Las condiciones aproximadas del la «casa de mallas» donde se cultivaron la mayoría de las plantas destinadas a las pruebas de patogenicidad fueron: temperatura máxima de $34^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en promedio, temperatura mínima de $15^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, temperatura media de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa máxima del 100%, humedad relativa mínima promedio del 30%, humedad relativa media del 75% y luminosidad interna de un 40 a 60%, respecto al exterior.

Inoculaciones mecánicas en plantas indicadoras. Se realizaron cuatro inoculaciones en distintas épocas y con distintos grupos de muestras utilizando para ellas las metodologías propuestas por Ko *et al.* (35), con algunas modificaciones en la preparación del extracto de savia en tampón fosfato de acuerdo a Lawson y Brannigan (38) y la metodología general propuesta por Wisler (67). Estas inoculaciones y la metodología utilizada consistieron en:

Primera inoculación. Se utilizaron 31 (muestreos 1 al 5), almacenadas a temperatura ambiente y en nevera, aproximadamente

60 días. La planta indicadora seleccionada fue *C. amaranticolor*, utilizando una planta por muestra y 4 hojas por planta en el tercio medio, inoculando la mitad de la hoja longitudinalmente. Se varió en la metodología de inoculación la hidratación en buffer fosfato (fosfato dibásico de potasio al 0,5 % pH 7,4 - 7,6) del tejido afectado, frotando la lámina foliar de la muestra con la hoja por inocular, con y sin presencia del abrasivo carborundum de 600 mallas y lavado superficial con agua destilada estéril.

Se complementó con la inoculación recomendada por Lawson y Brannigan (38) y Wisler (67), donde se modifica la forma de utilizar el tejido vegetal, macerando éste en presencia del buffer fosfato al 0,5 %, filtrándolo por capas de gasa e inoculándolo en las hojas de la planta indicadora.

Segunda inoculación. Se utilizaron 52 muestras correspondientes (muestreos del 6 al 10); no se utilizó el material de los muestreos anteriores por su oxidación. Las muestras se almacenaron en nevera a 4-5°C durante 2 a 5 meses. Se seleccionó *Gomphrena globosa* como planta indicadora y se inocularon 2 hojas por muestra en forma alterna, inoculando longitudinalmente la mitad de la hoja en plantas de 4 a 7 pares de hojas y una planta para 2 muestras. Se utilizó la misma metodología con y sin el abrasivo carborundum (38, 67).

Tercera inoculación. Se utilizaron las 52 muestras (muestreos del 6 al 10) registradas como posibles portadoras de los virus de acuerdo con la sintomatología, almacenadas en nevera a 4-5°C durante 9 a 12 meses. La inoculación se realizó en *C. amaranticolor*, utilizando de 4 a 6 hojas del tercio medio por planta, una planta por muestra y la mitad de la hoja longitudinalmente. La metodología básica fue la misma modificando el extracto macerado por el mismo utilizado para la prueba ELISA (38, 67). Las observaciones y evaluaciones se realizaron periódicamente hasta los 30 días después de la inoculación, teniendo en cuenta la presencia de lesiones locales que indican el resultado positivo de la prueba (presencia de un virus). Para cada inoculación se ubicaron 5 plantas como tratamientos testigo inoculadas con el buffer utilizado y con agua destilada estéril.

Cuarta inoculación. Teniendo en cuenta que uno de los principales problemas en las anteriores inoculaciones, probablemente fue la oxidación de los tejidos, las muestras recolectadas en los muestreos 16, 17 y 18 se almacenaron a -20°C. Se inocularon 50 muestras y se maceraron (en proporción peso : volumen) 1:10 tejido vegetal: buffer fosfato dibásico de potasio al 0,5% de pH 7,4 (38, 67).

Las inoculaciones se realizaron inmediatamente después de macerada la muestra, utilizando copitos de algodón y abrasivo carborundum

sobre la lámina foliar de la planta indicadora por inocular, lavando la superficie seguidamente después de inocularla con agua destilada estéril.

Las plantas indicadoras seleccionadas fueron *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor* y *Nicotiana glutinosa*. Éstas se encontraban en estado avanzado de desarrollo y próximas a prefloración y se practicó una poda terminal del ápice de la planta para mantenerlas en etapa vegetativa, suministrándoles fertilización con DAP a razón de 2,0g/planta para prevenir las situaciones ya conocidas de deficiencias nutritivas.

Por cada muestra se inocularon dos hojas a distintas alturas, aplicando el macerado en la mitad longitudinal de la hoja por inocular y dejando como testigo la otra mitad de la hoja. Los testigos negativos estuvieron constituidos por cuatro plantas inculadas con agua destilada estéril y cuatro con el buffer de extracción o de macerado utilizado. Cada planta inculada con 2 a 3 muestras contó con dos hojas testigo inculadas con agua destilada estéril. Las plantas inculadas se mantuvieron en casa de malla y las evaluaciones se realizaron hasta los 30 días después de la inculación, haciendo observaciones permanentes.

Mediante la inculación mecánica de las plantas indicadoras con la savia o extractos de la planta muestra se hicieron las pruebas de patogenicidad para patógenos obligados como los virus, ya que estos no pueden cultivarse en medios artificiales.

Lo ideal es realizar las pruebas en plantas de *Cattleya* spp., pero la expresión de los síntomas pueden variar o no darse por la lentitud en el crecimiento de las plantas, por características genéticas propias del material, como también por factores ambientales y nutritivos a los cuales está expuesta la planta. Es más fácil técnicamente trabajar con plantas hospedantes indicadoras.

Microscopía electrónica. Es una de las más eficaces herramientas para visualizar si existen o no partículas virales en el interior de un tejido, especialmente la de transmisión. Para ello se tomaron muestras de las plantas de *G. globosa* que resultaron positivas en la producción de lesiones locales y de plantas que presentaron sintomatología de deficiencias de fósforo, para observación al microscopio electrónico de transmisión en la Unidad de Virología -CIAT- (Palmira, Valle del Cauca). La técnica empleada fue el macerado del tejido vegetal en tinción negativa modificada por CIAT.

La tinción negativa consiste en tomar las rejillas de cobre de 200 mallas recubiertas de carbono, las cuales se incuban durante aproximadamente 30 minutos en una solución acuosa de glutaraldehído al 1%, luego se

lavan con buffer fosfato 0,01M y se colocan durante 30 minutos una gota del extracto de la muestra sobre la rejilla. Luego se lavó y se tiñó con una solución acuosa al 2% de acetato de uranilo pH 3,7. Estas rejillas se observaron en el microscopio electrónico (16, 42).

La citopatología consiste en realizar cortes muy finos en ultramicrotomo de los tejidos vegetales, para apreciar partículas y viroplasmias en el interior de las células. La técnica se inicia tomando pequeñas muestras del tejido, las cuales se fijan en Karnowsky, entre otros. Luego se deshidratan las muestras con cambios sucesivos en alcohol de diferentes grados y acetona y, finalmente, se realiza la inclusión en resina epóxica de baja viscosidad como Spurr. Este método de inclusión en resina Spurr se presentará más adelante en la parte de histología. El tejido totalmente fijo en el interior del bloque de resina dura queda dispuesto para ser cortado con el ultramicrotomo.

Identificación de virus CyMV y ORSV mediante ELISA.

Aspectos generales. Esta prueba inmunoenzimática es útil para las etapas de identificación definitiva, ya que las plantas indicadoras no brindan certeza o seguridad en la detección de la presencia del agente viral, siendo por tanto necesaria una prueba de mayor sensibilidad y confiabilidad. Se seleccionó ésta después de analizar las características básicas de cada una de las metodologías generales recomendadas para la identificación de virus de orquídeas y específicamente, los que afectan a *Cattleya* spp. (3, 33, 34, 38, 39, 67).

Pruebas y Procedimientos. Aunque en la literatura se plantean en forma clara los procedimientos paso por paso para la realización de la prueba ELISA (18, 20), en Cenicafé se realizó utilizando "kits" comerciales para la identificación de CyMV y ORSV (TMV-O), siguiendo los procedimientos encontrados en la literatura y por la firma Agdia Inc., proveedora de los mismos (38, 39, 67). Todas las pruebas se efectuaron en los laboratorios de Fitopatología de CENICAFÉ, con condiciones aproximadas de temperaturas máxima de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, mínima de $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y media promedio de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (4, 5, 6, 7). En cuanto a la humedad relativa de los laboratorios, ésta oscila entre el 70 y el 90%.

A continuación se presenta el procedimiento utilizado para la realización de la prueba ELISA de acuerdo con Agdia Inc. (Elkhart, IN, USA), teniendo en cuenta que se procesaron tres grupos de muestras, realizando algunas modificaciones en los procedimientos, y cuatro grupos más de pruebas (del cuarto al séptimo), y una

repetición adicional para todos los que se hicieron con fosfatasa alcalina. Básicamente los grupos de muestras y las características de las pruebas fueron los siguientes:

Primer grupo. Se utilizaron 54 muestras, adicionándole a las 52 recolectadas en los muestreos 6 al 10, una de *C. trianaei* de Orquídeas Eva y una muestra de *G. globosa* proveniente de la segunda inoculación, ambas como testigos.

Segundo grupo. Éste incluyó cuatro subgrupos: el primero de 45 muestras de los muestreos 11 al 15 almacenadas en nevera a 4 – 5°C por un período de 55 días y encontradas en proceso de deshidratación y oxidación. El segundo subgrupo, de 6 muestras del muestreo 7 con síntomas en hojas y especialmente en las flores como manchas pardo necróticas y/o distorsión del color, almacenadas en nevera por 16 meses. El tercer subgrupo, de 3 muestras de referencia, con base en pruebas ELISA previamente efectuadas (muestras 310, 240 y 297) y el cuarto subgrupo, de muestras que fueron los testigos de *C. trianaei* de Orquídeas Eva (CTE) y *Ch. amaranticolor* del lote ubicado en casa de mallas y los testigos negativos (buffer de extracción) y positivos (control Agdia). En este grupo de pruebas se evaluó el extracto almacenado de la muestra 328, el cual llevaba 170 días aproximadamente a 4-5°C. Adicionalmente, se procesaron muestras filtradas a través del gel en la columna Econo - Pac 10 DG (muestras almacenadas 240, 433 y fresca CTE), como se explicará dentro de los procedimientos ELISA.

Tercer grupo. En éste se procesaron 50 muestras procedentes de los muestreos 16, 17 y 18, la muestra de referencia 433 (almacenada a 4-5°C y oxidada), que por pruebas ELISA anteriores fue positiva para CyMV y ORSV. Las muestras frescas testigos de *C. trianaei* de Orquídeas EVA (CTE-1 de 4 años y CTE-2 de 2 años de edad), procedentes de cultivo *in vitro*. Adicionalmente se procesó una muestra de *Gomphrena globosa* que presentó síntomas de posibles deficiencias de fósforo (lesiones locales pardo rojizas).

Cuarto grupo. Contó con 64 muestras recolectadas en los muestreos 19, 20 y algunas del muestreo 21. Se emplearon como muestras de testigos positivos para CyMV la muestra fresca CTVE (planta con síntomas reconocidos de virus y probada anteriormente en ELISA y microscopía electrónica), y para ambos virus CyMV y ORSV, la N° 433 (12w10433, almacenada a 4 °C, seca y oxidada). Como muestras negativas CTE-1 y CTE-2, se utilizaron tejidos frescos de plantas de *Cattleya sp.* cultivadas en Cenicafé, procedentes de propagación sexual *in vitro* de Orquídeas Eva Ltda., probadas anteriormente en ELISA y microscopía electrónica.

Este grupo de pruebas se dividió en tres subgrupos para evaluarlas en pares de Kits, (kits 13 y 14, 15 y 16, 17 y 18, uno para cada CyMV y



otro para ORSV, usando igual formato o diagrama de carga), procesados simultáneamente. Se utilizaron kits Agdia con peroxidasa como enzima. Para los dos primeros subgrupos o pares del cuarto grupo de pruebas se conservaron los testigos y muestras de referencia antes citados. Para el tercer par de kits (17 y 18), se utilizaron muestras adicionales de *Cattleya* como referencia o testigos positivos (la N° 536 y 540 para ambos virus y la N° 461 y 462 para CyMV). Además, se incluyó una muestra de *Chenopodium quinoa* cultivada en el invernadero.

Quinto grupo. Se evaluó con los mismos kits comerciales Agdia, empleando fosfatasa alcalina como enzima en vez de peroxidasa. La enzima fosfatasa alcalina se evaluó a una longitud de onda de 405nm, a diferencia de peroxidasa que se lee a 490nm, para obtener así los valores de absorbancia respectivos y por lo regular, genera coloraciones amarillas claras a la vista cuando la reacción es positiva. En este grupo también se evaluaron como muestras de referencia negativas o sanas las muestras CTE-1 y CTE-2, como muestra fresca con CyMV (CTVE) y como referencia para CyMV y ORSV, la muestra 433 (almacenada a 4°C, seca y oxidada). De igual forma como se efectuó para el cuarto grupo de pruebas, las 76 muestras evaluadas se dividieron en tres subgrupos y en tres pares de kits respectivos (kits 20 y 21, 22 y 23, 24 y 25), uno para cada virus, usando igual formato o diagrama de carga por par. Para los dos primeros subgrupos de este quinto grupos de pruebas no se efectuaron modificaciones a los testigos y muestras de referencia utilizados anteriormente. En el tercer par de kits (23 y 24), se adicionaron otras muestras de referencia, las muestras 536 y 540 (almacenadas a 4°C, secas y oxidadas, y para CyMV y ORSV la 461 y la 462 (almacenadas a 4°C, secas y oxidadas). Para CyMV se utilizó además la 681, la cual indicó una alta posibilidad de presentar CyMV en pruebas de ELISA anteriores y según observaciones efectuadas en el microscopio electrónico de transmisión mediante tinción negativa, comprobando la presencia de un virus de partículas alargadas flexuosas.

Sexto grupo. Se procesaron las muestras mediante los kits Agdia con fosfatasa alcalina, incluyendo 72 muestras agrupadas en tres subgrupos, cada uno con un par de kits (25 y 26, 27 y 28, 29 y 30), uno para cada virus, con igual diagrama y forma como se realizaron las pruebas para el quinto grupo.

Séptimo grupo. El último grupo de muestras evaluadas para CyMV y ORSV mediante los kits Agdia con Fosfatasa alcalina, incluyó 72 muestras, las cuales se dividieron en tres subgrupos para procesarlas en tres pares de kits (kits 31 y 32, 33 y 34, 35 y 36) con igual diagrama y forma como se efectuaron las anteriores pruebas. Para este grupo se utilizaron las mismas muestras de referencia o testigos que para el sexto grupo.

Repetición adicional. Debido a inconsistencias, contaminaciones y/o dudas en algunos de los resultados obtenidos con la enzima fosfatasa alcalina, se realizó la repetición de las pruebas que utilizaron fosfatasa alcalina (principalmente los grupos quinto, sexto y séptimo), pero utilizando para la repetición la enzima peroxidasa (7).

Procedimientos ELISA. Los procedimientos utilizados en todos estos trabajos fueron los siguientes:

- ◆ Buffer de extracción: (1000 ml de buffer PBST 1X + 1,3 g de sulfito de sodio anhidro + 20g de polivinilpirrolidona P.M. 10.000 - 40.000 + 0,2g de azida de sodio + 2,0g de albúmina pulverizada de huevo de pollo + 20g de tween 20). Se ajusta a pH 7,4 7,6 y se almacena a 4°C. El buffer PBST 1X es el mismo utilizado para los lavados y se prepara utilizando los 50ml de buffer PBST 20X provistos en el kit, adicionando 950ml de agua destilada desionizada estéril. Para los dos primeros grupos se sustituyeron el sulfito de sodio por metabisulfito de sodio y la albúmina pulverizada por 4,0g de albúmina fresca. Para el tercer grupo de pruebas, se utilizaron la albúmina pulverizada de huevo grado II y el sulfito de sodio.

- ◆ Extracción de la muestra: Consiste en macerar el tejido vegetal en presencia del buffer de extracción, con el fin liberar el virus (partícula viral cubierta de proteína) de las células vegetales. La metodología básica recomienda extraer la muestra en tejido fresco en proporción 1:10 (muestra: buffer), justo antes de servirla en los platos, para evitar procesos de oxidación que pueden degradarla. Sin embargo, se hicieron las siguientes modificaciones:

Para el primer grupo de pruebas, el material vegetal almacenado en nevera a 4-5°C, oxidado y deshidratado, se cortó en pequeñas porciones y se colocó en hidratación en el buffer de extracción durante varias horas, conservando una relación 1 : 10 (peso de la muestra: volumen buffer de extracción). Después de esta hidratación se realizó el macerado en bolsas plásticas individuales utilizando el mortero. Para el segundo grupo de pruebas el material oxidado y deshidratado se maceró inmediatamente antes de servirlo en los platos. A partir del tercero hasta el séptimo grupo de pruebas, las muestras se conservaron a -20°C, con menor oxidación y deshidratación. Estas se maceraron inmediatamente antes de servirlos en los platos microtitulables, sin necesidad de rehidratarlas en el buffer de extracción. El macerado de las muestras inmediatamente antes de servirlos en los platos reduce el efecto de taninos, fenoles y enzimas degradantes, que han causado un alto grado de oxidación en las muestras, aún estando éstas en condiciones de refrigeración (11).

Para la realización de varias de las pruebas ELISA (segundo grupo, Kits 5, 6, 7 y 8), se adicionaron a la parte de la preparación de la muestra,

una etapa de “limpieza del extracto”, donde por medio de la centrifugación a 14.000rpm por 15 minutos a 4°C, en tubos eppendorf de 1,5ml se retiraron partículas o fibras vegetales que estaban presentes en el macerado preparado con el buffer de extracción. El retirar del extracto las fibras vegetales fue de gran ayuda, evitó el taponamiento de las micropipetas y se suprimieron los residuos del fondo de los platos microtitulables, que podría haber alterado las reacciones de desarrollo de color. A partir del tercer grupo de pruebas hasta el séptimo y la repetición adicional, la limpieza por centrifugación se realizó a 3.500rpm durante 15 minutos y a 4°C, mejorando calidad del extracto obtenido.

Como un ensayo sugerido por Riaño* en Cenicafé, en el segundo grupo de pruebas se realizó una comparación entre una muestra fresca de *Cattleya* sp. sana (CTE) y dos muestras oxidadas almacenadas a 4°C durante distintos períodos (muestras 240 y 433). Éstas se sometieron a una filtración en columnas de sepharosa (cromatografía de exclusión molecular), con la cual se retiró una alta cantidad de los fenoles del extracto vegetal, quedando en el buffer de extracción las proteínas y partículas virales. Esta prueba se efectuó con base en argumentos prácticos, donde teóricamente se planteó que los fenoles y demás proteínas oxidantes y degradantes que contienen los tejidos vegetales y con mayor razón, las orquídeas, pueden estar afectando la metodología ELISA, adhiriéndose a las proteínas y partículas virales (antígenos) e impidiendo su reconocimiento al entrar en contacto con los anticuerpos depositados en el fondo del plato. Por tal razón, es conveniente evitar que se produzcan y/o retirar del extracto la mayor cantidad posible de fenoles, quinonas, taninos y proteínas degradadas.

El resultado de esta posible interferencia puede ser probablemente falsos negativos, especialmente cuando la concentración del virus en la muestra es baja, o falsos positivos cuando la estructura de proteínas degradadas se hace compatible con los terminales de los anticuerpos, enlazándose.

- Preparación de controles positivos: Al vial provisto por el Kit que contenía extractos liofilizados de plantas, se le adicionaron 2,0ml del buffer de extracción y luego de mezclar muy bien el contenido, se dividió en alícuotas de 120ml, suficientes para una celda del plato. Las alícuotas restantes se almacenaron en tubos Eppendorf a -20°C.
- Diagrama de carga: Para el llenado de los platos compuestos por 96 celdas (8 filas X 12 columnas), se sorteó aleatoriamente la ubicación de las distintas muestras. Se dispusieron dentro del sorteo de cada

*Riaño, N. Comunicación personal. 1998.

plato, 3 a 4 controles positivos, 3 a 4 negativos (buffer de extracción), al igual que 3 a 4 repeticiones por muestra en la totalidad de las pruebas, según el número de ellas por procesar. De igual forma se ubicaron muestras de referencia y otros controles, como se explicó antes en la descripción de los grupos de pruebas efectuadas.

- ♦ Adición de la muestra: Se tomó el plato microtitulable de 96 celdas que provee el kit y con los antisueros específicos para cada virus, se sirvieron 100 - 120ml del extracto de la muestra por cada celda e igual volumen para los controles. Ésto, cuando las celdas del plato ya vienen cubiertas con el antisuero específico para el virus. Sin embargo, se pueden adquirir los anticuerpos concentrados, luego se diluyen diluidos en buffer carbonato de cubrimiento y se adicionan 100 μ l por celda, dejando incubar mínimo 4 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

Primer lavado. Luego de esta incubación se vacían las celdas y se efectúa un lavado (4 a 6 veces) con PBST 1X, con el fin de retirar el exceso de antisuero, quedando de esta forma cubierto el fondo de la celda. Después de cubierto, ya se pueden servir las muestras.

Primera incubación: Este plato servido con las muestras se incubó en cámara húmeda por 2 horas a temperatura ambiente o por toda la noche a 4°C, con el fin de que se enlacen las proteínas del virus con los anticuerpos ubicados en el fondo de la celda.

Conjugado enzimático: Justo antes al primer lavado se preparó el solvente para el conjugado enzimático (Componente MRS : Buffer PBST 1X en proporción 1:4), siendo necesarios 100 - 120ml por celda (10ml para el plato). Contando con el solvente, se preparó el conjugado enzimático de peroxidasa o de fosfatasa alcalina según el caso, adicionando al solvente los componentes enzimáticos en proporción 100:1 (100ml de solvente : 1ml de componentes enzimáticos). La preparación de este conjugado se hizo inmediatamente antes de ser usado.

- ♦ Muestras y el lavado del plato utilizando el buffer PBST 1X. Este lavado se realizó entre 4 y 6 veces hasta dejar totalmente limpio el plato, evitando el derramamiento de muestras y buffer entre celdas, lo que contaminaría y alteraría la prueba. Para el primero y segundo grupo de pruebas el lavado se realizó manualmente con micropipeta múltiple de 8 puntas, mientras que a partir del tercer grupo de pruebas, éste se hizo mediante el inmunolavador de platos Biorad 1250, debidamente programado.

- ♦ Adición del conjugado enzimático: Después del lavado, se adicionaron 100ml por celda del conjugado enzimático, el cual es totalmente transparente.

- ♦ Segunda incubación: El plato lleno con el conjugado enzimático, se incubó por 2 horas en cámara húmeda y a temperatura ambiente.
- ♦ Preparación del sustrato: Pocos minutos antes de terminar la incubación y de efectuar el segundo lavado se prepara el sustrato. Para la enzima peroxidasa se utilizan OPD, requiriendo para 10ml de la solución OPD diluida en buffer PBST, una cinta del sustrato adherido, dejándola inmersa por un tiempo de 2-3 minutos aproximadamente hasta que la cinta toma una coloración clara. Para la enzima fosfatasa alcalina se requiere PNP, utilizando para la solución PMP diluida en PBST, dos pastillas del sustrato. Tanto las soluciones buffers para OPD y PNP, como las cintas de OPD y pastas de PNP son provistos por los kits Agdia. La concentración de estos sustratos es de 1mg/ml. Este sustrato diluido debe protegerse de la luz para evitar su degradación y desarrollo de color, envolviendo los recipientes en papel de aluminio.
- ♦ Segundo lavado: Terminada la segunda incubación con el conjugado enzimático, se realiza el segundo lavado del plato, repitiendo el proceso de llenado con buffer PBST 1X y el vaciado de 4 a 6 veces, con los debidos cuidados para no derramar el conjugado y los residuos de lavado de éste entre las celdas.
- ♦ Adición del sustrato: Seguidamente se adicionan 100ml del sustrato por celda, incubándolo hasta el momento de detener la reacción en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- ♦ Detención de la reacción: Después de 30 minutos para el caso de peroxidasa y de 60 minutos para fosfatasa alcalina, la reacción de desarrollo de color se suspende adicionando 50 μ l por celda de ácido sulfúrico 3,0M para peroxidasa o de hidróxido de sodio 1N para fosfatasa alcalina, ambos suministrados por los kits.
- ♦ Evaluación cualitativa: La primera evaluación se realiza visualmente, determinando la presencia o ausencia de color amarillo (fosfatasa alcalina) o naranja (peroxidasa), en cada una de las celdas, apreciando la mayor o menor intensidad en el color, calificando de acuerdo con la siguiente escala:
 - : Desarrollo de color Negativo, + : Intensidad leve en desarrollo de color, ++ : Intensidad moderada, +++ : Intensidad fuerte y ? : Duda. La calificación debe hacerse por dos evaluadores cómo mínimo.
- ♦ Evaluación cuantitativa: De igual forma se realizó una evaluación cuantitativa, haciendo lecturas en un equipo lector de ELISA Biorad 3550 uv a 490nm de longitud de onda para peroxidasa y 405nm para fosfatasa alcalina. Se efectuaron 3 lecturas alternadas para obtener los promedios.

El criterio para definir el carácter positivo de una muestra en ELISA, se basó en el factor de evaluación cuantitativo para los valores de absorbancia obtenidos, aspecto en el cual la literatura no brinda claridad (56). Se pueden utilizar los factores de dos veces (Tx2) el promedio de las absorbancias de los testigos sanos (34), tres veces (Tx3) (19), y hasta cuatro veces (Tx4) (33). 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.). Sin embargo, en el estudio de resultados se tuvieron en cuenta los otros factores de evaluación, entre ellos los valores o resultados dudosos, aplicando conceptos de Hu *et al.* (32), donde valores de absorbancia mayores a 0,100 pueden considerarse como positivos (para este caso dudosos o por confirmar), sin dejar de considerar los factores de evaluación como se mencionó anteriormente, y sobre todo, los valores de los negativos y de blancos (B.E.).

Microscopía electrónica. En esta parte del diagnóstico definitivo de una muestra es muy importante contar con la microscopía electrónica, ya que se puede confirmar la identidad del virus en estudio. Además, sirve para probar los distintos controles positivos (muestras CTVE), los negativos (muestras CTE 1 y 2) y muestras de referencia (433, 540, 536, 553, 681, entre otras), utilizadas dentro de las pruebas ELISA. De esta forma se certifica en cierta medida que hay consistencia del procedimiento inmunoenzimático con lo observado en las muestras en el microscopio.

Las metodologías básicas empleadas en el CIAT para la observación de estas muestras para tinción negativa y citopatología, fueron las mencionadas por Castaño *et al.* (16) y Morales *et al.* (42), descritas anteriormente.

Histología.

Con el fin de conocer cómo afectan a los tejidos de las plantas los diferentes patógenos y apoyar los procesos de diagnóstico, se pueden utilizar técnicas de observación microscópica e histológicas (58). Se realizaron algunos trabajos generales en histología manual y de inclusión en resina, con el objetivo de observar los tejidos de distintos órganos de *Cattleya* sp., y de apreciar la presencia y el efecto de determinados patógenos sobre éstos (Figuras 180 a 184). Los procedimientos efectuados fueron:

Método manual

Se realizaron cortes transversales y longitudinales en forma manual utilizando bisturí o el micrótopo manual. Los tejidos se colectaron y se conservaron en toallas de papel húmedas para evitar la deshidratación. Luego, se insertaron pequeñas porciones sobre trozos de balso, corcho o zanahoria, utilizados como soporte. Los cortes de tejidos vegetales afectados se hacen desplazando cuidadosamente la cuchilla, cortando tanto el soporte como la muestra, quedando el corte sobre la cuchilla. Estos cortes se montan en láminas portaobjetos para observarlos en el microscopio óptico de trasluz, utilizando colorantes como el azul de lactofenol. Esta técnica también se utiliza para el corte de estructuras agregadas formadas por algunos hongos, como picnidios y esclerocios.

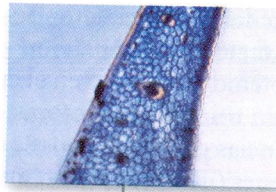


Figura 180.

Corte transversal de una hoja de *Cattleya trianaei* afectada por *Colletotrichum* sp. (50X)

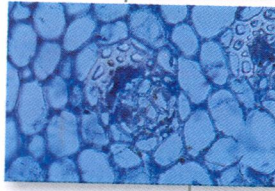


Figura 181.

Corte transversal de un rizoma de *Cattleya trianaei* sp. afectado por *Fusarium* sp. (50X). Nótese el micelio intra e intercelular (200X)

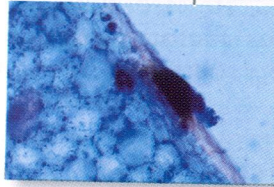


Figura 182.

Corte transversal de una hoja de *Cattleya trianaei* donde se muestra un acérvulo de *Colletotrichum* expulsando masas de esporas.

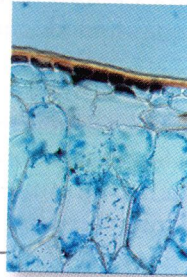


Figura 183.

Corte transversal de una hoja con necrosis epidermal, producto de una mancha foliar.

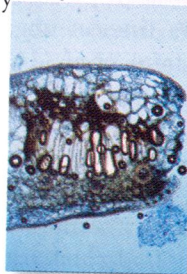


Figura 184.

Corte transversal de un borde de una hoja con necrosis interna producto de un moteado.

Inclusión vegetal en resina Spurr y cortes en ultramicrotomo.

Como procedimiento histológico para muestras seleccionadas y para un mayor detalle, se utilizó la técnica de inclusión vegetal en resina Spurr (53), realizando cortes en ultramicrotomo. Esta técnica es citada por Mercer y Bisberck (41), Vélez (66) y Camayo (14), y se modificó para el estudio de los tejidos de las orquídeas de interés. Se utilizó para conocer detalladamente los distintos componentes de los tejidos de *Cattleya* spp., como raíces (Figura 185), hojas sanas (Figura 186) y haces vasculares (Figura 188). Además, se usó para el diagnóstico de agentes fitopatógenos (hongos especialmente) y los daños que causan, comparando con tejidos sanos. La utilización de esta metodología en orquídeas es citada parcial o totalmente por Curry (22), Stern *et al.*

Figura 185.
Corte transversal de una raíz de *Cattleya warscewiczii* donde se muestra
a. el haz vascular central (xilema y floema) **b.** Células del parénquima y la capa de velamen

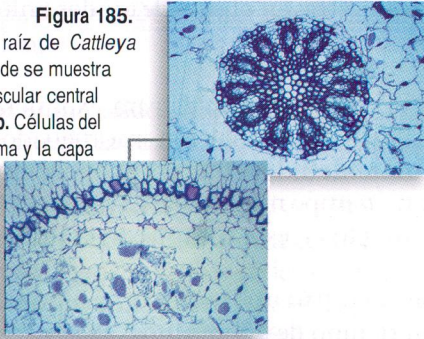


Figura 186.
a. Corte longitudinal de la hoja de *Cattleya trianaei* donde se muestra la totalidad de tejidos. **b.** Acercamiento del estoma y cámara subestomática en el envés de la hoja (400X)

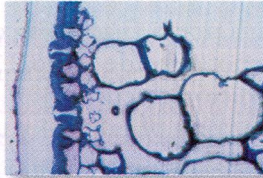


Figura 187.
Corte longitudinal de la hoja de *Cattleya trianaei* donde se observan los tejidos del parénquima y el haz vascular central **a.** (100X) **b.** (400X)

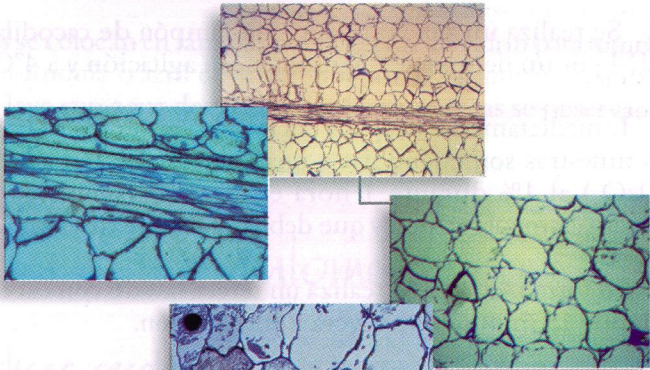
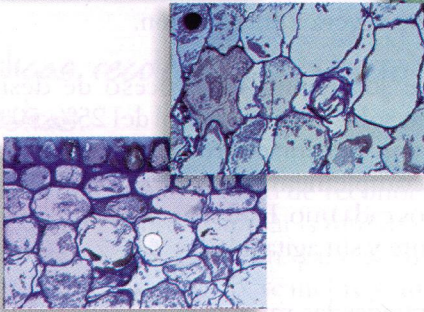


Figura 188.
a. Corte transversal de la hoja de *Cattleya* a. sana **b.** y **c.** Afectadas por el *Colletotrichum* sp. En fase inicial y avanzada (400X).



(54), Hiruki *et al.* (31) y Hanchey *et al.* (29). Esta técnica consta de los siguientes procedimientos:

- ♦ Las muestras de tejido vegetal a observar se colectan y se conservan momentáneamente en toallas de papel humedecido para evitar la deshidratación.
- ♦ Para iniciar el procesamiento se obtienen submuestras, que constan

de porciones de tejido de 1 a 2 mm², cortadas en sentido transversal y longitudinal. Estas submuestras en el caso de tejidos enfermos deben tener parte sana y parte enferma.

- ♦ Las submuestras se colocan en viales para exponerlas al fijador Karnowsky (paraformaldehído 8%, solución amortiguadora cacodilato de sodio 0,1M y glutaraldehído 70% en proporciones 12:23:2, respectivamente); por un tiempo mínimo de 12 horas a 4°C. El tiempo máximo de almacenamiento en este compuesto es de 3 meses.
- ♦ Luego de la fijación se efectúa un lavado con tampón de cacodilato de sodio 0,1 M por un tiempo de 15 minutos, en agitación y a 4°C.
- ♦ Seguidamente se realiza una nueva fijación en el compuesto de Millonig (Solución fosfato monobásico de sodio 2,26% + solución hidróxido de sodio 2,52% + solución glucosa 5,4%, en proporciones 41,5 : 8,5 : 5, respectivamente), a un pH de 7,4 y un tiempo de 24 horas.
- ♦ Se realiza un nuevo lavado con tampón de cacodilato de sodio 0,1M por un tiempo de 15 minutos, en agitación y a 4°C.
- ♦ Inmediatamente después del lavado, se realiza la postfijación de las muestras sometiendo a una solución de tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% durante 1 hora en agitación y a 4°C (compuesto extremadamente tóxico y que debe protegerse de la luz).
- ♦ En forma seguida se realiza un tercer lavado con cacodilato 0,1M durante 15 minutos en nevera y en agitación.
- ♦ Las muestras se someten a un proceso de deshidratación, efectuando cambios en soluciones de etanol del 25%, 50%, 75%, 90% y 100% en este orden, con una duración de 15 minutos en cada cambio. La deshidratación se complementa con dos cambios en acetona, con duración de 15 minutos cada uno. Este procedimiento puede realizarse a temperatura ambiente y sin agitación.
- ♦ Una vez deshidratadas las muestras, se realiza la infiltración o preimbibición, exponiendo los tejidos a 3 cambios en mezclas de resina-acetona en relaciones 1:3, 1:1 y 3:1, respectivamente; además de dos cambios en resina al 100%, con una duración de una hora en cada cambio, en agitación y a 4°C.

La resina Spurr utilizada es un polímero insoluble en agua, compuesto por una mezcla en relación 10:6:26:0,4 de ERL (resina), DER (endurecedor), NSA y DMAE-1 (aceleradores). Esta resina Spurr (Polysciences) es de baja viscosidad.

- ♦ Posterior a la infiltración, se incluyen las muestras en moldes con resina al 100%, durante 24 a 48 horas a 60°C, para obtener una adecuada polimerización.
- ♦ Los cubos endurecidos, se moldean en forma piramidal, retirando con bisturí parte de la resina que rodea la muestra.
- ♦ Para la realización de los cortes semifinos, se utilizan cuchillas de vidrio triangulares cortadas con un equipo dotado de una punta de diamante, cuchillas a las cuales se les construye una piscina o solapa con cinta plateada o plástica, sellada en la parte inferior con esmalte y que se llenó con agua destilada estéril.
- ♦ Con el ultramicrotomo se realizan los cortes semifinos (0,1-0,5µm), utilizando un ángulo de corte de 15 a 20° de la cuchilla respecto a la muestra, a una velocidad de corte de 5mm/seg, aproximadamente. Los cortes de la muestra quedan sobre el agua destilada y se recolectan con ayuda de un pincel fino.
- ♦ Los cortes se colocan en láminas portaobjetos de vidrio para teñirlos con azul de toluidina o azul de lactofenol por 1-2 minutos. Luego el colorante se lava con agua destilada y las láminas secas se observan al microscopio óptico de trasluz.

Reconocimiento Entomológico

Características, recolección y manejo de las muestras.

Es definitivo para cualquier trabajo de reconocimiento y sobre todo para un proceso de diagnóstico, tomar la muestra adecuada, con calidad y cuidado apropiados. Por tal razón, para las muestras de problemas con posible origen entomológico, se incluyó tanto al organismo plaga como el tejido vegetal que presentaba el daño, tanto en su etapa inicial como final, cuando fue posible.

La recolección de muestras abarca los distintos nichos ecológicos y ambientes donde habitan los artrópodos y moluscos plagas, como son los sustratos y los diferentes órganos de la planta que pueden verse afectados. La recolección de las muestras se realiza mediante inspección de plantas que presentan una apariencia anormal o una sintomatología parecida a lo descrito en la literatura para ataques de insectos plagas, o si se evidencia la presencia del posible causante.



Para la recolección de las muestras se hace la desinfección de las herramientas como se planteó anteriormente en las generalidades del reconocimiento fitopatológico, teniendo en cuenta que en éstos pueden transmitirse patógenos como virus, bacterias y hongos.

Para la colección y manipulación de los insectos plagas se describen diversos procedimientos generales en documentos básicos (13, 40, 64, 65). Se utilizó el jameo con red entomológica, frascos aspiradores para la captura de individuos de tamaño medio y pequeño de poca movilidad y de difícil o riesgosa manipulación. Para aquellos individuos de alta movilidad o que son muy susceptibles a estropearse con la manipulación y transporte vivos, se utilizaron recipientes letales con 5ml del líquido mortal volátil (acetato de etilo o xylol), el cual se depositó en el fondo, para formar una cámara letal absorbente. También viales con soluciones de alcohol etílico y agua destilada en diferentes concentraciones, de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen los insectos por preservar temporalmente y/o transportar, especialmente los que poseen tejidos blandos y/o son estados inmaduros (13). El transporte de las muestras se realizó en neveras cerradas de icopor.

Aquellas muestras en las cuales se encontraban el agente causante en el interior de los tejidos, se colocaron en frascos jaula con tapa de malla para permitir el desarrollo del ciclo y obtención de los estados adultos. Las muestras vegetales y los organismos colectados separadamente se ubicaron en recipientes y/o bolsas individuales. Cada muestra se rotuló y se describió en los empaques y formatos respectivos para llevarlos al laboratorio.

Preselección, clasificación y codificación de problemas

El sistema de codificación es importante para manejar ordenadamente la totalidad de las muestras recolectadas. Se usó el sistema de códigos utilizado para los problemas con posible origen patológico (Reconocimiento Fitopatológico), modificando las casillas asignadas con las letras D y E, donde se registró el código del tipo de problema a estudiar. Para este caso se asignaron los códigos descritos en la Tabla 60, basados en los daños generales causados registrados en la revisión bibliográfica.

Como se mencionó en el reconocimiento fitopatológico, para la realización de los análisis estadísticos, estos códigos pueden cambiar, pero no se varían las clasificaciones de los problemas. Estos códigos numéricos o alfanuméricos permitieron sistematizar y construir bases de datos con cada uno de los problemas de interés y agilizar el manejo e interpretación en el laboratorio. Así mismo, se facilitó el análisis e interpretación de los resultados obtenidos. La codificación propuesta de cada muestra fue la siguiente:

Tabla 60. Codificación para los distintos problemas con posible origen entomológico.

	PROBLEMA	CÓDIGO
Raíces	Barrenadas	50
	Mutiladas	51
	con chupadores	52
Rizomas	Barrenados	53
	Mutilados	54
	con chupadores	55
Pseudobulbos	Barrenados	56
	Mutilados	57
	con chupadores	58
Hojas	Barrenadas	59
	Mutiladas	60
	con chupadores	61
	con raspaduras	62
Botones	Barrenados	63
	Mutilados	64
	con chupadores	65
	con raspaduras	66
Flores	Mutiladas	67
	con chupadores	68
	con raspaduras	69
Alteraciones	del sustrato	70
Otros de índole	Entomológico	71

- A y B : Código del cultivo o predio.
 C : Código de la especie hospedante.
 D y E : Código del problema.
 F, G, H, I : Código de la muestra. Número de orden.

|_A_|_|B_|_|C_|_|D_|_|E_|_|F_|_|G_|_|H_|_|I_|_|

Procesamiento de artrópodos en el laboratorio.

Se tomaron las muestras vegetales afectadas y los individuos colectados vivos y muertos y se observaron en el estereomicroscopio para determinar la presencia y las características generales de los posibles organismos causantes de los daños. De igual manera, se realizó una identificación parcial de órdenes a los cuales puede pertenecer el

especimen en estudio, con la ayuda de publicaciones generales de entomología y claves.

Las muestras de plantas con la plaga en su interior se disecaron bajo el estereoscopio para extraer el estado perjudicial y conservarlo en soluciones alcohólicas o realizar el correspondiente montaje para la identificación posterior. Los individuos colectados vivos se mantuvieron en frascos o recipientes jaulas junto con el tejido vegetal, hasta su procesamiento. Se utilizaron las condiciones y normas para el etiquetado (de campo, colección e identificación) y almacenamiento de los especímenes (13, 40). Esta información de las etiquetas temporales adicionada a la obtenida en el momento de la toma de la muestra y el respectivo procesamiento se recopiló en formatos convencionales y en bases de datos para ser consultadas y utilizadas en el análisis de la información. Posteriormente, esta información se incluye en la etiqueta dentro de la colección de consulta.

Conservación de muestras y artrópodos

Para la conservación temporal de estos organismos colectados se utilizaron algunas de las técnicas ya mencionadas en el procesamiento de las muestras, como lo son frascos jaulas, frascos plásticos, viales, bolsas, etc. También se preservaron especímenes en viales con soluciones de alcohol etílico en diferentes concentraciones, de acuerdo al grupo taxonómico al cual pertenecía el organismo por almacenar (13), conservándolas en refrigeración. Las muestras de material vegetal con insectos adheridos como las escamas ya muertas, se conservaron en bolsas de papel, en nevera a 4-5°C. Finalmente, la mayor parte de los especímenes obtenidos de las muestras se depositaron en cajas de colección debidamente adecuadas y etiquetadas, protegidas de la humedad, del calor, de insectos y de hongos, los cuales afectan las colecciones.

Determinación y/o Identificación

Se realizaron observaciones al estereomicroscopio y al microscopio, se utilizaron documentos y claves especializadas para las distintas jerarquías taxonómicas hasta familia y género y de acuerdo a la literatura disponible, hasta especie. Cada espécimen se identificó con los correspondientes códigos y etiquetas, siguiendo las normas establecidas, como se planteó anteriormente en la parte respectiva al procesamiento y lo necesario para el análisis de información. La manera ideal es contar dentro del equipo de trabajo con la suficiente documentación y la experiencia para determinar lo más acertadamente posible estas muestras. Sin embargo, es recomendable y dependiendo

de los recursos y exigencias del estudio que se está llevando a cabo, consultar en colecciones propias (Cenicafé) ya a centros de referencia y/o especialistas en las distintas familias.

En Cenicafé se seleccionaron por su importancia algunas muestras de especímenes obtenidos de *Cattleya* spp., y se enviaron a centros de referencia internacional (CABI Bioscience UK Centre - International Institute of Entomology IIE, Inglaterra) y nacional (Colección de entomología, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín), para su respectiva determinación, en lo posible hasta especie.

En la Figura 189 se presenta el flujograma de actividades para toda la investigación.

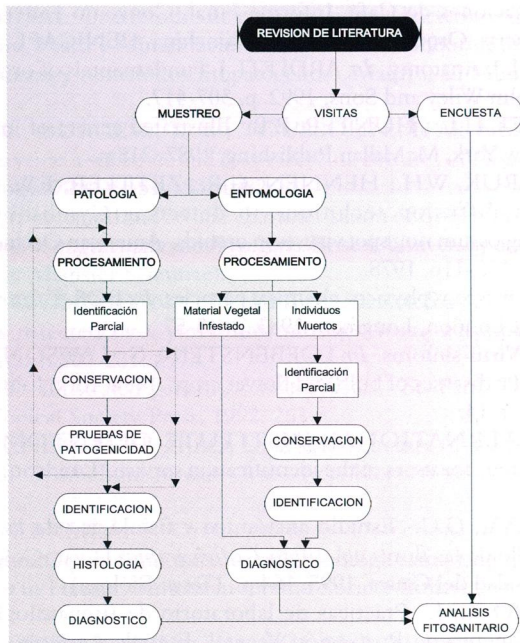


Figura 189. Flujograma de actividades.

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. 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.
4. ÁNGEL C., C.A.; TSUBOTA N., M. Reconocimiento e identificación de enfermedades y plagas en Cattleyas colombianas. Manizales, Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Agronomía, 1998a. 390 p. (Tesis: Ingeniero Agrónomo).
 5. ÁNGEL C., C.A.; TSUBOTA N., M. Reconocimiento e identificación de enfermedades y plagas en Cattleyas colombianas. *In*: Centro Nacional de Investigaciones de Café. Informe anual de la Disciplina de Fitopatología Octubre 1997 - septiembre 1998. Chinchiná, CENICAFÉ, 1998 b.
 6. ÁNGEL C., C.A.; TSUBOTA N., M. Reconocimiento e identificación de enfermedades y plagas en Cattleyas colombianas. *In*: Centro Nacional de Investigaciones de Café. Informe anual de la Disciplina de Fitopatología Octubre 1998 - septiembre 1999. Chinchiná, CENICAFÉ, 1999.
 7. ÁNGEL 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.
 8. ARDITTI, J. Anatomy. *In*: ARDITTI, J. Fundamentals of orchid biology. New York, John Wiley and Sons, 1992. p. 307-417.
 9. BARNETT, H.L. ; HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 ed. New York, McMillan Publishing, 1987. 218 p.
 10. 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.
 11. BOS, L. Viruses as physico- chemical particles. *In*: BOS, L. Introduction to plant virology. London, Longman, 1983. p. 45-57.
 12. 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.
 13. CAB INTERNATIONAL INSTITUTE OF ENTOMOLOGY - IIE. Instructions for users of the identification service. Londron, CAB - IIE, 1990. 18 p.
 14. CAMAYO V., G.C. Estudio anatómico y fisiológico de la diferenciación y desarrollo de las flores del cafeto *Coffea arabica* L. var. Colombia. Popayán, Universidad del Cauca, 1995. 164 p. (Tesis: Bióloga).
 15. CASTAÑO Z., J. Prácticas de laboratorio de fitopatología. Tegucigalpa, Departamento de Protección Vegetal. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, 1986. 45p.
 16. CASTAÑO, M.; GÁLVEZ, G.; ARROYAVE, J.; VELASCO, A.C.; MORALES, F. Aislamiento de una cepas colombiana del virus del mosaico del banano. *Fitopatología Colombiana* 18 (2): 130-134. 1994.
 17. 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.
 18. 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: 475-483. 1977
 19. 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.
 20. CONVERSE, R.H. ; MARTIN, R.R. ELISA methods for plant viruses. *In*: HAMPTON, R.; BALL, E. ; DE BOER, S. Serological methods for detection



- and identification of viral and bacterial plant pathogens: A laboratory manual. St Paul, The American Phytopathological Society Press, 1990. p. 179-196
21. CUMMINS, G.R. ; HIRATSUKA, Y. Illustrated genera of rust fungi. St. Paul, The American Phytopathological Society Press, 1991. 152 p.
 22. CURRY, K. J. Initiation of terpenoid synthesis in osmophores of *Stanhopea anfracta* (Orchidaceae): A cytochemical study. American Journal of Botany 74 (9): 1332-1338. 1987.
 23. DHINGRA, O.D. ; SINCLAIR, J.B. Basic plant pathology methods. Elkins Park, PA, Franklin Book Company, 1994. 355 p.
 24. 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.
 25. FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ - CENICAFÉ-. SECCIÓN DE AGROCLIMATOLOGÍA. Archivos meteorológicos 1950-1994. Chinchiná, FEDERACAFÉ, 1995.
 26. FISAC, R. ; NOVAL, C. Métodos de conservación de bacterias. *In*: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Manual de laboratorio: diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. Madrid, El Ministerio, 1991. p. 365-377.
 27. FISHER, N. L.; BURGESS, L. W.; TOUSSOUN, T. A.; NELSON, P. E. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. Phytopathology 72 (1): 151-153. 1982.
 28. GIL V, L. F. Morphological and celular characterisation of *Colletotrichum* isolates from *V. radiata*, *V. unguiculata* and *P. vulgaris*. Bristol, University of Bristol, 1992, 42 p. (Thesis: Magister Scientiae).
 29. 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.
 30. HANLIN, R.T. Illustrated genera of ascomycetes. St. Paul, The American Phytopathological Society Press, 1992. 263 p.
 31. HIRUKI, C.; CHEN, M. H. ; RAO, D. V. Ultrastructure of *Cattleya* leaf cells infected with Cymbidium mosaic virus. Acta Horticulturae. sv (110): 273-279. 1980.
 32. HU, J. S. ; FERREIRA, S. Orchid viruses. Detection, transmission an management of Cymbidium mosaic and *Odontoglossum* ring spot viruses in *Dendrobium* in Hawaii. American Orchid Society Bulletin 63 (8): 896-898. 1994.
 33. 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.
 34. HU, J. S.; FERREIRA, 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.
 35. 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.
 36. LAWSON, R.H. Chemical inactivation of Cymbidium mosaic and *Odontoglossum* ring spot viruses. American Orchid Society Bulletin 36 (11): 998-1001. 1967.
 37. 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.



38. 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.
39. 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.
40. McNUTT, D.N. Insect collecting in the tropics. London, Centre for Overseas Pest Research. Ministry of Overseas Development, 1976. 68 p.
41. MERCER, E.H. ; BISBERCK, M.S.C. Manual de microscopía electrónica para biólogos. Madrid, Editorial Blume, 1974. 85 p.
42. MORALES, F.; NIESSEN, A.; RAMÍREZ, B.; CASTAÑO, M. Isolation and partial characterization of a Geminivirus causing bean dwarf mosaic. *Phytopathology* 80 (1): 96-101. 1990.
43. NOMBELA, G.; ANDRES, M.F. Planificación y técnicas de muestreo para el estudio de nematodos fitoparásitos. *In: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Manual de laboratorio; diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos.* Madrid, El Ministerio, 1991. p. 447-452.
44. NOMBELA, G; VALDEOLIVAS, A. Técnicas de extracción y montaje de nematodos. *In: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Manual de laboratorio; diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos.* Madrid, El Ministerio, 1991. p. 453-471.
45. NOVAL, C. Bases del diagnóstico. *In: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Manual de laboratorio; diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos.* Madrid, El Ministerio, 1991a. p. 119-135.
46. NOVAL, C. Comprobación del poder patógeno. *In: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Manual de laboratorio; diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos.* Madrid, El Ministerio, 1991b. p. 137-148.
47. NOVAL, C. Toma de muestras y tratamientos previos. *In: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Manual de laboratorio; diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos.* Madrid, El Ministerio, 1991c. p.113-118.
48. NOVAL, C. Género *Pseudomonas*. *In: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Manual de laboratorio; diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos.* Madrid: El Ministerio, 1991d. p. 241- 283.
49. SCHAAD, N.W. Initial identification of common genera. *In: SCHAAD, N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.* 2 ed. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society Press, 1988. p.1-4.
50. SINGLETON, L.L.; MIHAIL, J.D.; RUSH, C.M. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. 2 ed. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society Press, 1993. 265 p.
51. SMITH, D. Maintenance of filamentous fungi. *In: KIRSOP, B.E.; DOYLE, A. Maintenance of microorganisms and cultured cells: A manual of laboratory methods.* 2 ed. London, Academic Press, 1991. p. 133-160.
52. SMITH, D. ; WARD, S.D. Notes on the preservation of fungi. Farnham Royal, CABI - International Mycological Institute - IMI, 1987. 18 p.
53. SPURR, A.R. *Journal of Ultrastructure Research.* p. 26, 31, 1969.
54. STERN, W. L.; CURRY, K. J.; PRIDGEON, A. M. Osmophores of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 74 (9): 1323-1331. 1987.
55. STREETS, R.B. The diagnosis of plant diseases. Tucson, The University of Arizona Press, s.f. s.p.
56. 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.