

Una doble infección viral en orquídeas del género *Cymbidium*

Ana Cecilia Velasco

Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

Francisco Hernández

Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica.

Rodrigo Gámez

Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica

(Recibido: 18 de junio de 1985)

Abstract: A double-viral infection in *Cymbidium* hybrids is described. Virions were discovered by negative staining of sick plant sap, which showed a rigid type and a flexible virus. Two types of viral-cytoplasmic inclusions, corresponding to both viruses, were observed in the ultrafine cuts of injured foliar areas. In one cell two types of inclusions were found together. By ultracentrifugation in saccharose gradients, these two types of virions could not be completely separated, probably due to their fragmentation and aggregation. The rigid virus was related to the orchid race of tobacco mosaic virus, the flexible to the cymbidium mosaic virus. They affect orchids by producing a clinical case, which includes chlorotic and necrotic striate mosaics.

El creciente interés por las colecciones de orquídeas ha hecho que estos cultivos adquieran un alto valor comercial. Además, estas plantas son afectadas por agentes infecciosos como: bacterias, parásitos, hongos y virus (Pirone *et al.* 1960) que ocasionan pérdidas económicas importantes. El hecho de que comercialmente estas plantas se propaguen vegetativamente, da una importancia relevante a las infecciones virales, ya que generalmente las afectan sistemáticamente, haciendo que la infección se propague a las nuevas plantas obtenidas de meristemas (Jensen, 1951). La alta susceptibilidad de las orquídeas a las infecciones virales, podría estar asociada a la intensa manipulación biológica que han sufrido, pues se ha hecho una gran cantidad de híbridos (incluso múltiples), en un afán por obtener floraciones mejoradas.

Entre los agentes virales que afectan orquídeas se encuentran partículas isomórficas y alargadas, serológicamente diferentes, entre las que destacan: una raza de orquídeas del virus del mosaico del tabaco (Corbett, 1967), virus del mosaico del *Cymbidium* (Corbett, 1960; Francki, 1970; Frond & Tremaire,

1977), virus de las manchas anulares del *Cymbidium* (Hollings *et al.* 1977; Martelli & Russo; 1981; Russo & Martelli, 1981), virus de las manchas anulares del tomate (Goff & Corbett, 1977; Francki, 1966) y el virus de las manchas anulares del *Odontoglossum* (Mamba & Ishii, 1971).

Las plantas infectadas por virus pueden presentar síntomas conspicuos, también la infección puede pasar inadvertida, ya que puede cursar subclínicamente o bien el período de incubación puede ser de varias semanas, como ocurre con las infecciones por el virus del mosaico del *Cymbidium* (Kado & Jensen, 1964). Estos virus pueden afectar diferentes géneros de orquídeas e incluso otras plantas (Muratkishi 1958; Martelli & Russo, 1981).

Las razones anteriores justifican los exámenes virológicos, cuando se importan o exportan orquídeas. En este informe describimos una infección doble en híbridos del género *Cymbidium*, que inicialmente fue detectada mediante un examen directo de la sabia, analizada al microscopio electrónico de transmisión (MET).

MATERIAL Y METODOS

Se recolectaron hojas de seis híbridos del género *Cymbidium*, que presentaban síntomas compatibles con una infección viral. Además, se recogieron muestras de *Acineta* sp. *Miltonia roezlii* y *Arachnis* hibr. Como control se examinaron hojas de *Cymbidium* provenientes de otro vivero. Ambos viveros se localizaron en el centro de San José, Costa Rica.

Examen directo:

En cada hoja estudiada se hizo una pequeña incisión sobre una de las áreas lesionadas y se extrajo una gota de savia, con la que se impregnaron rejillas para microscopía electrónica, recubiertas con membrana soporte de formvar, después de ser teñidos con ácido fosfotúngstico se analizaron al microscopio electrónico de transmisión (Hitachi HU 12A). Este examen también se realizó en las hojas sanas.

Cortes ultrafinos:

De cada hoja se cortaron fragmentos de 1 mm² del área lesionada que fueron fijadas en Carnosky a 40°C durante 24 a 72 horas, luego se lavaron con amortiguador de cacodilato y se fijaron nuevamente en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo amortiguador, a 4°C durante 24 horas inmediatamente después se tiñeron los especímenes, sumergiéndolos en una solución de acetato de uranilo al 1%, en acetato de veronal, a temperatura ambiente durante 12 horas. Posteriormente, los tejidos se deshidrataron en una serie de acetona de 10 a 100%, se infiltraron e incluyeron en resina spurr. De cada preparación se hicieron cortes ultrafinos (50 a 90 nm), se tiñeron con acetato de uranilo, citrato de plomo y se analizaron al MET.

Concentración de virus:

Se hizo un macerado de hojas lesionadas en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7, 4°C), se filtró a través de gasa y se clarificó por centrifugación (12 000 g/10 min.). El sobrenadante se precipitó con polietilenglicol-NaCl (PEG-NaCl) y se centrifugó (28 000 g/2 horas). El sedimento se resuspendió en el amortiguador de fosfatos en una quinta parte del volumen inicial y se precipitó de nuevo con PEG-NaCl, se volvió a centrifugar y el sedimento se resuspendió a una razón de 0,8 ml por cada 10 ml del clarificado inicial. Este material se colocó en

una gradiente de sacarosa de 10 a 40% y se centrifugó a 58 000 g. durante 12 horas. Las bandas de equilibrio obtenidas se recogieron con jeringas hipodérmicas y se precipitaron nuevamente con PEG-NaCl. El sedimento se separó por centrifugación (28 000G/15 min.), se resuspendió en 2 ml. del amortiguador de fosfatos y se colocó en otra gradiente de sacarosa de 5 a 55%, que se centrifugó a 58 000 g. durante 12 horas. Las bandas obtenidas fueron recogidas con un fraccionador (ISCO UA-5). Se les midió su absorción a 240 y 260 nm. y se analizaron al microscopio electrónico de transmisión.

Inmunolectromicroscopia:

Se impregnó un lote de rejillas con sueros anti-raza de orquídeas del virus del mosaico del tabaco y otro grupo de rejillas se impregnó con suero anti-virus del mosaico del *Cymbidium*. Con esas rejillas se realizó una prueba de inmunolectromicroscopia, siguiendo el método descrito por Derrick (Milne & Luisoni, 1977).

RESULTADOS

Lesiones:

Las hojas de plantas híbridas del *Cymbidium* presentaban lesiones que aparentemente se iniciaban con un mosaico clorótico. Este evolucionaba a un punteado necrótico y luego se hacía confluyente, hasta formar estrías color marrón oscuro. Así, algunas hojas presentaban toda la gama de síntomas (Fig. 1).

Examen directo:

El análisis de la savia mostró dos tipos de partículas virales alargadas. Una era de carácter flexuoso, que denominaremos virus flexuoso (VF), y otra de mayor dimensión y de aspecto rígido, que llamaremos virus rígido (VR). En la figura 2 se muestran ambas partículas virales. En las muestras provenientes de *Acineta* sp, *Miltonia roezlii*, *Arachnis* hibr, y *Cymbidium* sano no se observaron viriones.

Cortes ultrafinos:

Se observaron dos tipos de inclusiones virales intracitoplasmáticas, que correspondían a los VF y VR. Las inclusiones del tipo VF fueron

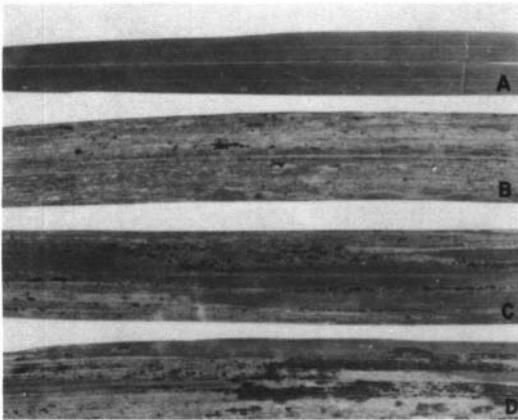


Fig. 1. Fotografías de hojas de *Cymbidium*. A. Hoja sana. B y C. Hojas con diversos estadios de evolución de un mosaico clorótico. D. Se observa el estadio más avanzado de la infección, caracterizado por zonas confluentes de clorosis y estrias necróticas.

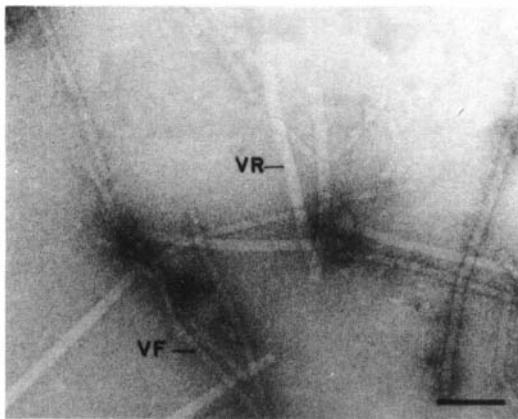


Fig. 2. Tinción negativa, directamente del fluido extraído de una hoja lesionada. Se observan dos tipos morfológicos de partículas virales. VF. Virus flexuoso. VR. Virus rígido. (Barra = 100 nm).

más comunes y de mayor tamaño que las del VR.

Las inclusiones del VF presentaron una alta electrodensidad y los viriones estaban dispuestos en empalizada muy estrecha; sin embargo, se definía claramente el carácter flexuoso de las partículas individuales. En algunas células las inclusiones eran de tal magnitud que rodeaban estructuras como cloroplastos y mitocondrias, que no se observaron invadidas, aunque aparentemente mostraban alteraciones ultraestructurales. El citoplasma de las células afectadas se observó vacuolizado (Fig. 3).

Las inclusiones del VR también se observaron en esas mismas muestras. Estas inclusiones

presentaban una electrodensidad menor que las anteriores, posiblemente debido a que los viriones se disponían en empalizadas más laxas y se observaba claramente el aspecto rígido de los viriones. A pesar de que estas inclusiones se observaron con menor frecuencia, se encontraron también dentro del núcleo de algunas de las células (Fig. 4).

En una de las muestras se encontraron ambas inclusiones dentro de una misma célula. En esa ocasión, a baja magnificación se apreció la diferente electrodensidad de ambas inclusiones, que se encontraron rodeando cloroplastos y a mayor amplificación se pudieron distinguir morfológicamente ambos viriones (Fig. 5).

En la primera gradiente de sacarosa, se logró separar dos bandas bien definidas: en la superior predominó el virus flexuoso y en la inferior el VR; no obstante, en ambas había una mezcla de los dos virus. Estas bandas se separaron y se sometieron a una segunda gradiente, donde de nuevo cada una originó dos bandas, compuestas por una mezcla de las dos partículas virales. La superior fue mucho más rica en VF y la inferior en VR (Fig. 6). Ambas bandas tuvieron una absorción máxima a 270 nm y mínima a 250 nm.

Para determinar las dimensiones de los viriones se midieron numerosas partículas de cada tipo, a partir de microfotografías ampliadas 200 000X. En la figura 7 se muestra el histograma de frecuencias de los diámetros y longitudes de los viriones. El VR mide como promedio 150 nm de largo y 14 nm de diámetro, en tanto que el VF mide 450 nm de largo por 9,98 nm de diámetro.

La prueba de inmunoelectromicroscopia permitió relacionar antigénicamente al virus flexuoso como el Virus del Mosaico del *Cymbidium* y al virus rígido con la raza de orquídeas del Mosaico del Tabaco.

DISCUSION

El análisis de los cortes ultrafinos de las áreas lesionadas mostró dos tipos de inclusiones virales intracitoplasmáticas, que correspondían a los viriones observados en las preparaciones por tinción negativa. En la purificación en gradientes de sacarosa no se logró una buena separación de las dos partículas, posiblemente debido a la fragmentación y agregación que sufren, lo que origina una diversidad de elementos de dife-

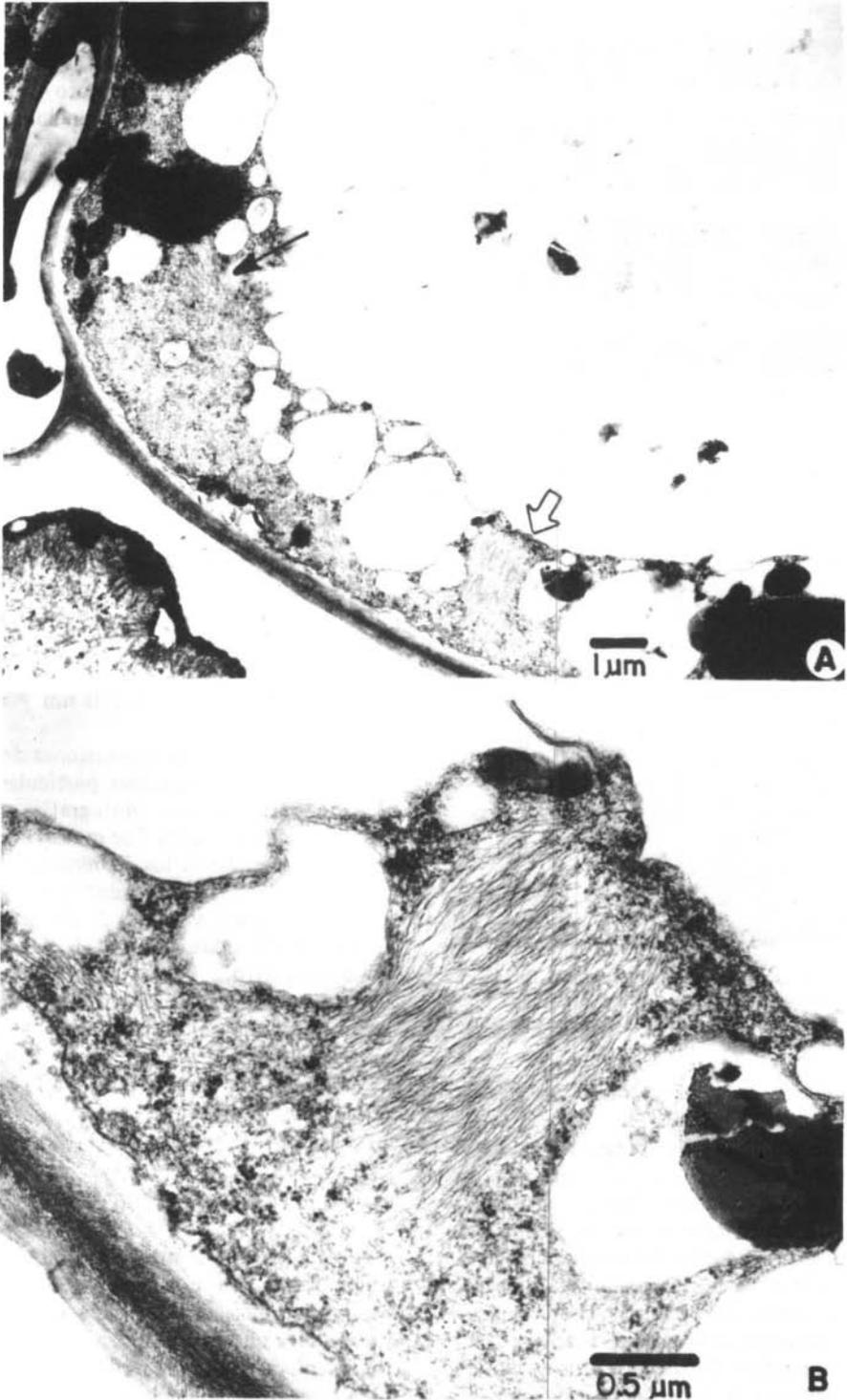


Fig. 3. Corte ultrafino de una hoja lesionada. Se observan inclusiones virales intracitoplasmáticas, correspondientes al virus flexuoso. En A. se muestra una visión panorámica; las flechas señalan las inclusiones virales. B. Detalle a mayor aumento de la inclusión señalada por la flecha gruesa.

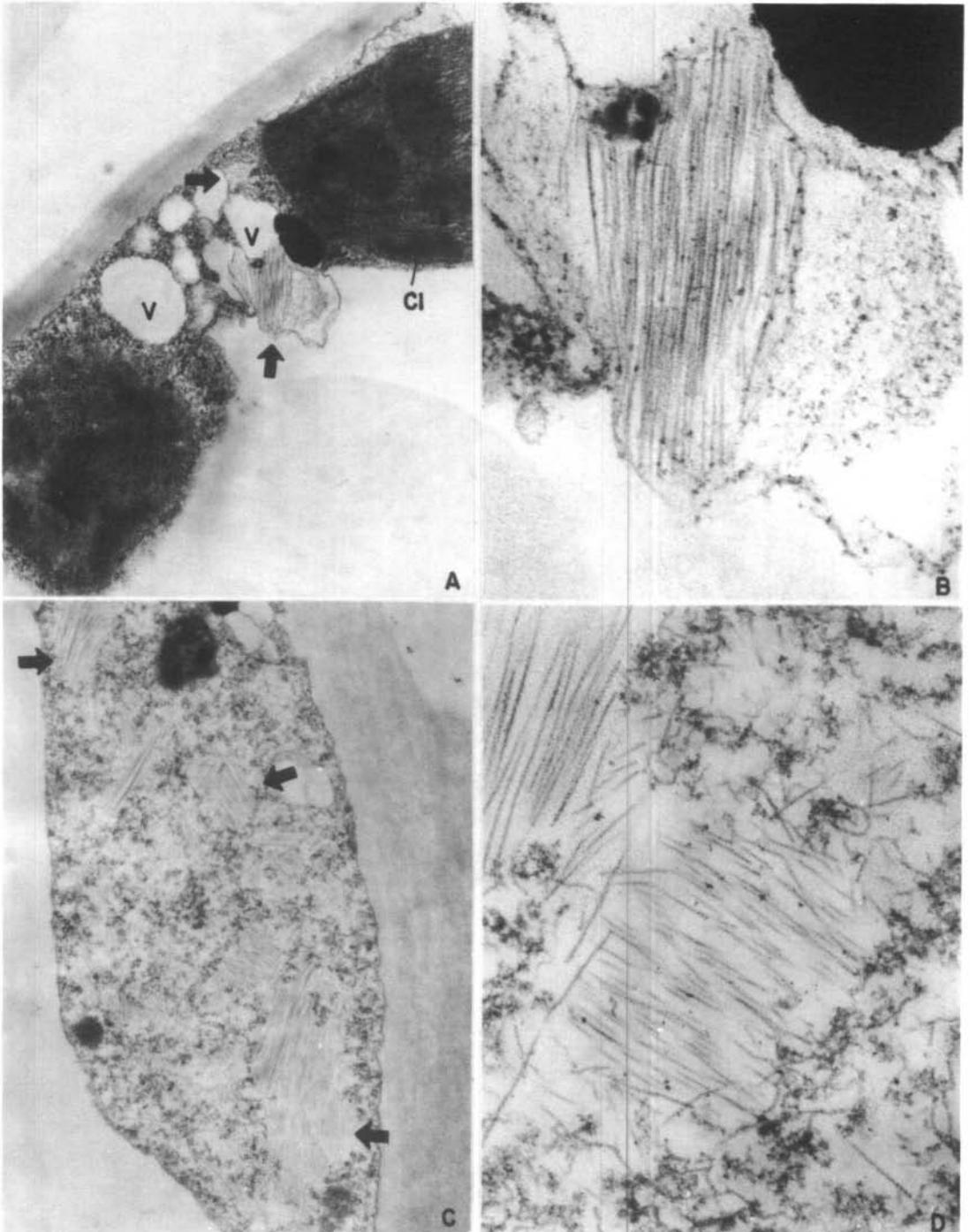


Fig. 4. Cortes ultrafinos de hojas lesionadas con inclusiones del virus rígido. (Fechas). A y B. Inclusión intracitoplásmica y detalle a alta magnificación respectivamente. C y D. Inclusión intranuclear y detalle a mayor aumento: Cl. cloroplasto; V. vacuola.

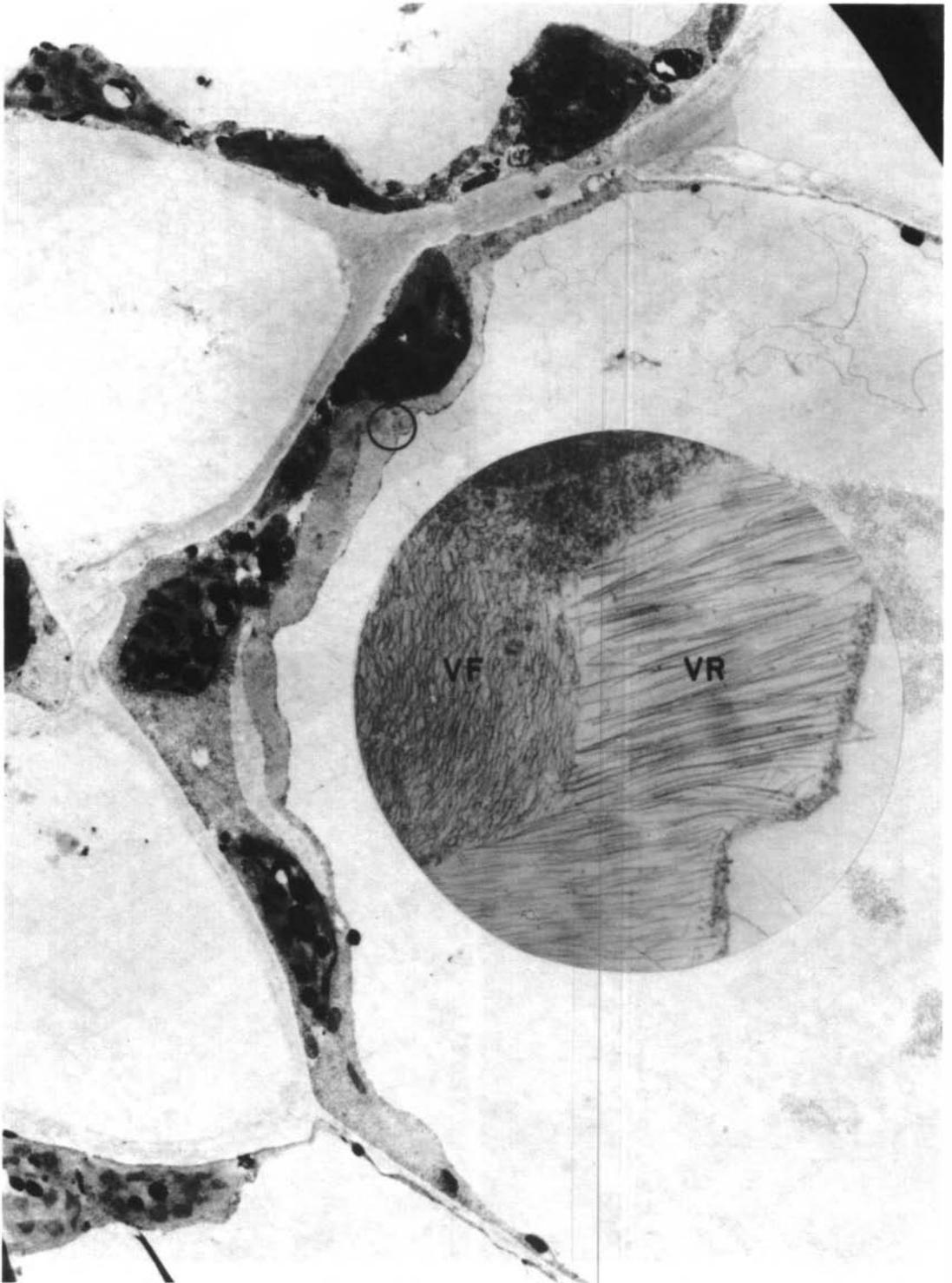


Fig. 5. Corte ultrafino de una hoja, en la cual se aprecia una célula con dos inclusiones intracitoplasmáticas correspondientes al virus flexuoso (VF) y al virus rígido (VR). El círculo dibujado corresponde al área aumentada.

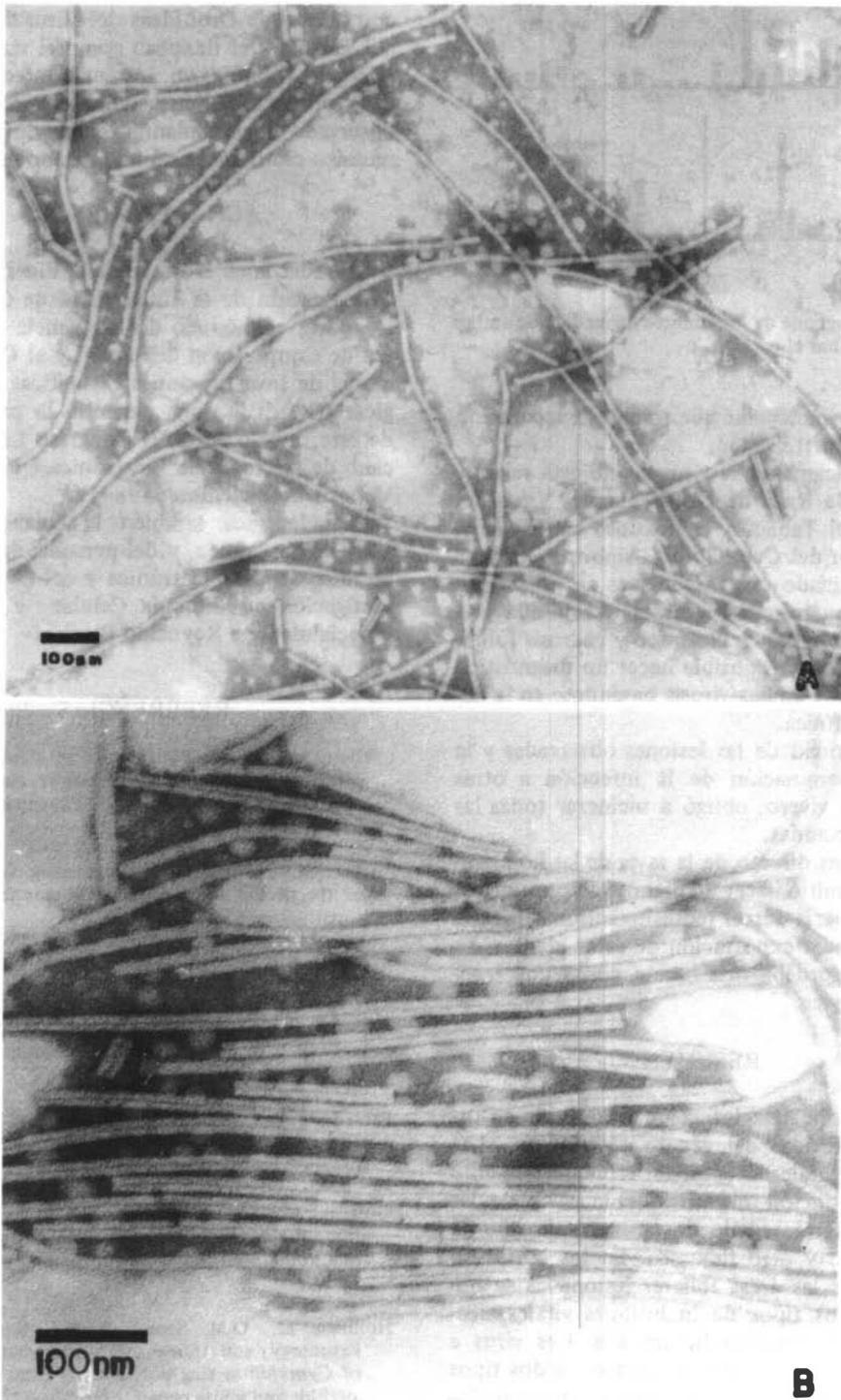


Fig. 6. Tinción negativa de los viriones obtenidos de las bandas de equilibrio en una gradiente de sacarosa. A. Banda superior, en la que predomina el virus flexuoso. B. Banda inferior, predomina el virus rígido.

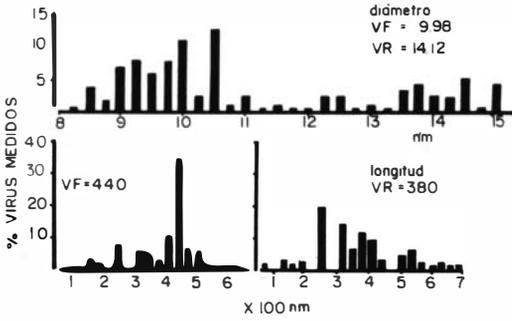


Fig. 7. Histograma de los ámbitos de medida de ambos virus (Consultar el texto).

rente peso molecular que impide la separación por ultracentrifugación.

Antigénicamente el virus rígido está relacionado con la Raza de Orquídeas del Virus del Mosaico del Tabaco y el flexuoso con el Virus del Mosaico del *Cymbidium*. Ambos agentes se han incriminado con infecciones en orquídeas, cuya sintomatología se caracteriza por la presencia de un mosaico clorótico y necrosis foliar, por lo cual no es posible hacer un diagnóstico diferencial de ambas virosis basándose en la observación clínica.

La severidad de las lesiones observadas y la posible diseminación de la infección a otras plantas del vivero, obligó a incinerar todas las plantas infectadas.

El análisis directo de la savia de las hojas enfermas permitió hacer un diagnóstico presuntivo, el cual debería ser el requisito mínimo para la importación o exportación de estas plantas. Es viable una prueba más barata como una reacción serológica.

RESUMEN

Se describe una infección viral doble en orquídeas híbridas del género *Cymbidium*. Las partículas virales se descubrieron inicialmente mediante tinción negativa de la savia de las plantas enfermas, bajo dos formas: un tipo de virus rígido y otro flexuoso. En los cortes ultrafinos de las áreas foliares lesionadas se observaron dos tipos de inclusiones virales citoplasmáticas correspondientes a ambos virus e incluso en una célula se encontró los dos tipos de inclusiones juntas. Mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa no se lograron separar completamente los dos virus, tal vez por fragmentación y agregación. Mediante inmunoe-

lectromicroscopia, el virus rígido se relacionó con la raza de Orquídeas del Virus del Mosaico del Tabaco y el flexuoso como el virus del mosaico del *Cymbidium*, los cuales afectan orquídeas provocando un cuadro clínico como el observado en estas plantas, que incluía desde un mosaico clorótico hasta un estriado necrótico.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, el aporte económico de la Agencia Internacional de Cooperación de Japón, y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) que permitió la presentación de este trabajo en el VI Congreso Latinoamericano de Microscopia Electrónica en Maracaibo, Venezuela (diciembre, 1984).

Agradecemos también la colaboración de Luis Diego Gómez, y del personal de la Unidad de Microscopia Electrónica y del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, especialmente a Reynaldo Pereira.

REFERENCIAS

- Corbett, M.K. 1960. Purification by density-gradient centrifugation, electron microscopy, and properties of *Cymbidium* mosaic virus. *Phytopathology* 50: 346-351.
- Corbett, M.K. 1967. Some distinguishing characteristics of the orchid strain of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 57: 164-172.
- Francki, R.I. B. 1966. Isolation, purification, and some properties of two viruses from cultivated *Cymbidium* orchids. *Aust. J. Biol. Sci.* 19: 555-564.
- Francki, R.I. B. 1970. *Cymbidium* mosaic virus. CMJ/AAB. Description of Plant Viruses 27.
- Frowd, J.A., & J.H. Tremaine. 1977. Physical, chemical, and serological properties of *Cymbidium* mosaic virus. *Phytopathology* 67: 43-49.
- Goff, L.M., & M.K. Corbett. 1977. Association of tomato ringspot virus with a chlorotic leaf streak of *Cymbidium* orchids. *Phytopathology* 67: 1096-1100.
- Hollings, M., O.M. Stone, & R.J. Barton. 1977. Pathology, soil transmission and characterization of *Cymbidium* ringspot, a virus from *Cymbidium* orchids and white clover (*Trifolium repens*). *Ann. App. Biol.* 85: 233-248.
- Jensen, D.M. 1951. Mosaic or black streak disease of *Cymbidium* orchids. *Phytopathology* 41: 401-414.

- Kado, C.I., & D.D. Jensen. 1964. *Cymbidium* mosaic virus in *Phalaenopsis*. *Phytopathology* 43: 974-977.
- Mamba, R., & M. Ishii. 1971. Failure of aphids to transmit the *Odontoglossum* ringspot and *Cymbidium* mosaic viruses to orchid plantlets derived from meristem cultures. *Phytopathology*. 61: 582-583.
- Martelli, G.P., & M. Russo. 1981. The fine structure of *Cymbidium* ringspot virus in host tissues: I. Electron microscopy of systemic infections. *J. Ultrastruct. Res.* 77: 93-104.
- Milne, R.G., & E. Luisoni. 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations, p. 265-281. R., Maramorsh, & H. Koprowski (eds). In *Methods in virology*. Vol. VI. Academic Press. New York.
- Murakishi, H.H. 2958. Serological and morphological relationships among orchid viruses. *Phytopathology* 48: 137-140.
- Pirone, P.P., B.O. Doge, & H.W. Richet. 1960. Diseases and pests of ornamental plants. 3d ed., N.Y. Botanical Garden. Ronald Press. New York. 517 p.
- Russo, M., & G.P. Martelli. 1981. The fine structure of *Cymbidium* ringspot virus in host tissues: II. Light microscopy and electron microscopy of located infections. *J. Ultrastruct. Res.* 77: 105-118.