

## Infección de la orquídea terrestre *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae) con el potexvirus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) en Costa Rica

L. Moreira<sup>1</sup>, W. Villalobos<sup>1</sup>, E. Rodríguez-Cerezo<sup>2</sup> y Carmen Rivera<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, 2060, San José, Costa Rica, fax (506) 224 6749, crivera@cariari.ucr.ac.cr

<sup>2</sup> Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid, España.

<sup>3</sup> Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, 2060, San José, Costa Rica.

Recibido 18-IX-1998. Corregido 22-II-1999. Aceptado 26-II-1999.

**Abstract:** In 1996, plants of *Phaius tankervilleae* cultivated in a nursery in the western region of the Central Valley of Costa Rica, exhibited mild to severe foliar symptoms of chlorotic streak. Flowers from symptomatic plants were similar in size, shape and color to flowers from asymptomatic plants, but the former showed earlier senescence. In some cases, chlorosis and white rings appeared in the sepals. Virus in symptomatic leaf extracts were concentrated by ultracentrifugation and separation in sucrose gradients. Negative staining of partially purified preparations from diseased orchid plants revealed the presence of filamentous potexvirus-like particles of 500 nm in length and 17 nm width. Virus particles contained a single major protein of about 28 kDa as estimated by denaturalizing poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and a single RNA molecule of about 7kb. Infected plants showed a strong specific reaction in double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) using antiserum to cymbidium mosaic virus.

**Key words:** CymMV, terrestrial orchid, *Phaius tankervilleae*, capsid protein, nucleic acid, potexvirus.

Al menos 25 virus infectan a las especies e híbridos de orquídeas. Actualmente los virus más importantes desde el punto de vista económico y de prevalencia son el mosaico del *Cymbidium* ("cymbidium mosaic potexvirus", CymMV) y el virus de la mancha anillada del *Odontoglossum* ("odontoglossum ringspot tobamovirus", ORSV) también denominado TMV-O (Lawson 1990, Zettler *et al.* 1990, Hu *et al.* 1994, Lawson & Hsu 1995). Los síntomas foliares inducidos por CymMV van desde el estríado clorótico a puntos negros o patrones de líneas necróticas con parches hundidos (Hsu *et al.* 1992). El ORSV produce puntos cloróticos o necróticos, estríados y anillos a nivel foliar (Lawson & Hsu 1995). No se conocen vectores naturales para estos virus, sin embargo ambos son dispersados a través de herramientas conta-

minadas durante la división de plantas, la resiembra y la corta de flores (Zettler *et al.* 1990, Hsu *et al.* 1992, Hu *et al.* 1994).

Frecuentemente las infecciones virales reducen el vigor de la planta y alteran la floración, disminuyen el tamaño y la calidad de la flor, lo que afecta el valor de exhibición o comercial de las plantas (Hu *et al.* 1993). Además, estas infecciones impiden el libre tránsito de orquídeas en el mundo, por no cumplir con las especificaciones de los programas de certificación sanitaria. Sin embargo, no es raro detectar plantas infectadas asintomáticas, lo que ha favorecido la dispersión mundial de éstos y otros virus por el tráfico sin control de plantas enfermas asintomáticas, con fines de colección o mejoramiento (Zettler *et al.* 1990, Hsu *et al.* 1992).

En Costa Rica, como en muchos otros países tropicales, el cultivo y comercio de especies nativas e introducidas de orquídeas, como plantas de colección o flor de corta, ha tomado auge en años recientes. Sin embargo, no se ha identificado ni determinado la prevalencia de los virus que afectan tanto las orquídeas nativas como las introducidas ya sea en las plantaciones comerciales, colecciones o en sus hábitats naturales. En 1996, en un pequeño vivero comercial en la región occidental del Valle Central se detectaron plantas de la orquídea terrestre *Phaius tankervilleiae* que presentaban estriado clorótico de leve a severo en las hojas, sin presencia de necrosis o anillos (Fig. 1A), y en algunos casos flores cuyos sépalos mostraban clorosis y anillos blancos (Fig. 1B). Estos síntomas son característicos de algunas infecciones virales por lo que se inició la identificación del virus que afecta esta especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Observación de la sintomatología a través del tiempo:** Ocho plantas sintomáticas se mantuvieron durante 20 meses en condiciones de invernadero para observar si se producían variaciones en el tipo de sintomatología observada inicialmente y si se presentaban alteraciones en las flores.

**Purificación de las partículas virales:** Follaje de la orquídea terrestre *P. tankervilleiae* mostrando síntomas foliares de estriado clorótico se homogenizó con dos volúmenes de amortiguador de fosfatos de sodio 0.1M, pH 8.0, 0.15% 2-mercaptoetanol, 1 mM -etilen diamino- tetra acetato de sodio (EDTA). El homogenizado se filtró empleando gaza y se centrifugó a 5 000g por 20 min. Al clarificado se le agregó Triton X-100 al 1% p/v agitando suavemente durante 3 hr a 4°C y se clarificó a 8 000g por 20 min. A la fase acuosa colectada se le agregó poli-etilenglicol al 4% p/v (PEG 8 000) y se agitó lentamente durante 2 hr a 4°C. El botón obtenido al centrifugar (8 000g, 20 min) se resuspendió toda la noche a 4°C, en una décima del volumen inicial de amortiguador y se clarificó a 10 000g por 10 min. Posteriormente se centrifugó durante una hora a 100 000g en un gra-

diente de sacarosa (10-40%) en amortiguador fosfatos de sodio 0.05 M, pH 8.0, 1mM de EDTA. La banda obtenida fue dializada con amortiguador fosfatos de sodio 0.05 M, pH 8.0, 1mM de EDTA por 12 hr y se utilizó en los siguientes ensayos.

**Tinción negativa de las partículas purificadas:** Para determinar el tamaño y morfología de las partículas virales se realizó tinción negativa del virus purificado empleando fosfotungstato de sodio 2% pH 7.0 (Hall 1955). Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200. Un total de 30 partículas fueron medidas y se obtuvo el valor promedio de su longitud y diámetro.

**Extracción del ácido nucleico y determinación de su peso molecular:** El ácido nucleico se extrajo de las partículas virales previamente purificadas. Se incubó 1.0 mg de virus purificado con 50 µg/ml de proteinasa K (Sigma Chemical Co.) y 0.1% de SDS, durante 30 min a 37°C. La mezcla se extrajo dos veces con volúmenes iguales de fenol saturado con Tris-EDTA (TE) pH 8.0: cloroformo (1: 1) y una vez con cloroformo (1: 1). Las fases fueron separadas por centrifugación. El ARN se precipitó con etanol absoluto frío y se almacenó a -20°C durante toda la noche. El ARN precipitado se resuspendió con agua estéril tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). El peso molecular se determinó mediante electroforesis en geles nativos de agarosa al 1% empleando como indicadores de peso molecular el ARN de un tobamovirus (6.3 kb) y de un tombusvirus (5 kb). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (Sambrook *et al.* 1989).

**Determinación del peso molecular de la proteína de cápside:** El peso molecular de la proteína de cápside se determinó en geles desnaturizantes discontinuos de poli-acrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Las proteínas fueron desnaturizadas a 100°C durante 5 minutos en el amortiguador de carga de muestras de Laemmli (Laemmli 1970). Como marcadores de peso molecular se emplearon los estándares de proteínas para SDS-PAGE (BioRad Cat. No 161-0304).

**Identificación serológica del virus:** Se realizó la prueba de ELISA de "doble sandwich" de acuerdo con Clark y Adams (1977).

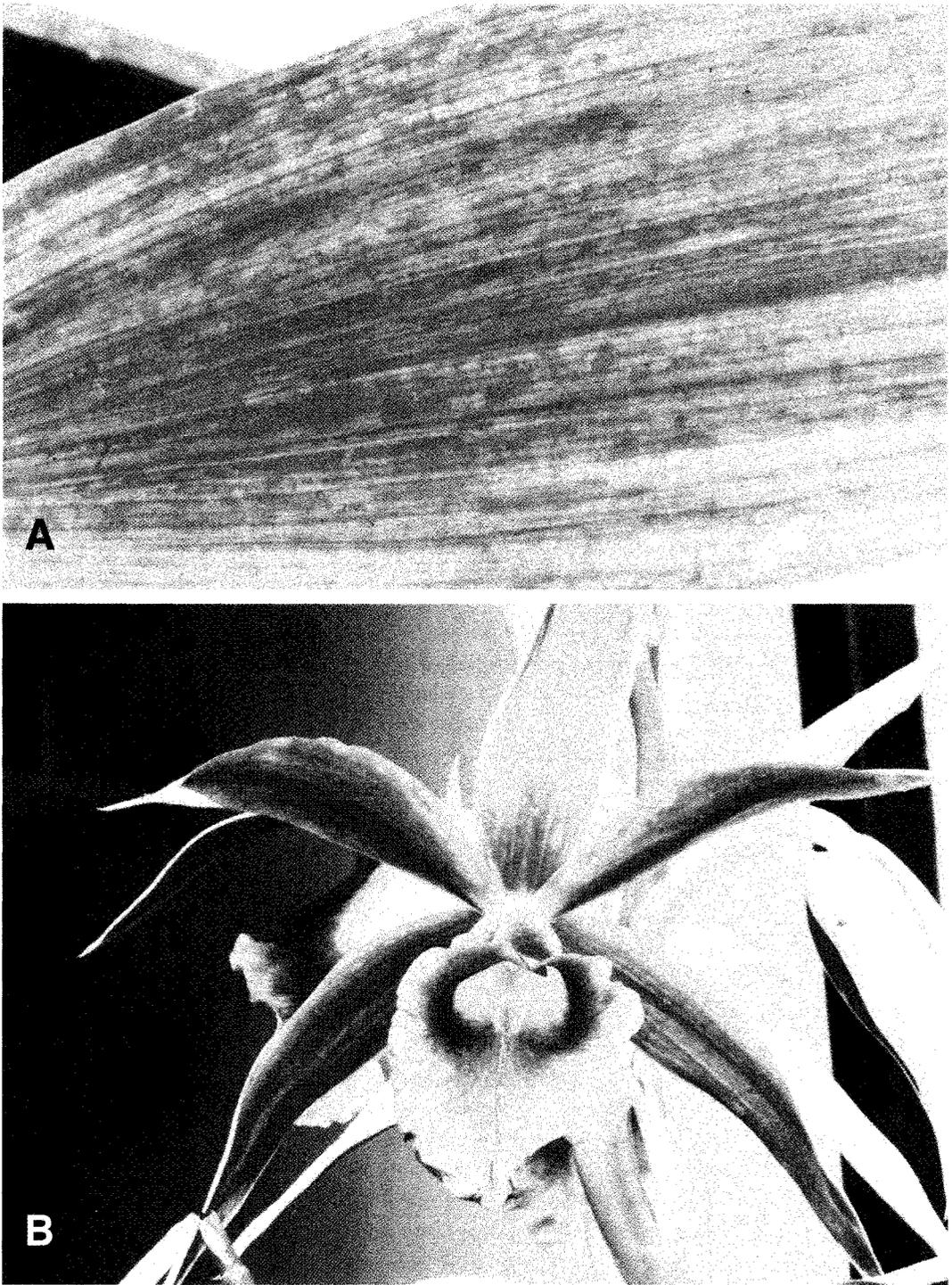


Fig. 1. Síntomas en plantas de *Phaius tankervilleae* infectadas con CymMV. A) Estriado clorótico foliar. B) Clorosis y anillos blancos presentes en los sépalos.

Symptoms induced by CymMV in *Phaius tankervilleae* plants. A) Foliar chlorotic streaks. B) Chlorosis and white rings in the sepals.

Para el recubrimiento de las placas para ELISA y para el conjugado con fosfatasa alcalina se utilizó un anticuerpo policlonal para CymMV facilitado por Dr. H. T. Hsu, producido en USDA, ARS, Florist and Nursery Crops Laboratory, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, USA. Tanto el anticuerpo para el recubrimiento de las placas como el conjugado se usaron a una dilución 1: 1000. La lectura de la absorbancia a 405 nm se realizó a la hora de colocado el sustrato empleando un lector Dynex Modelo MRX. Como controles negativos se emplearon partículas purificadas del virus X de la papa (PVX) aislado previamente en Costa Rica y extracto foliar de planta sana de *P. tankervilleae*.

## RESULTADOS

Las plantas sintomáticas de *P. tankervilleae*, mantenidas en el invernadero, no disminuyeron su vigor ni la producción de nuevos bulbos. Además, los períodos de floración se mantuvieron sin alterarse. Las flores de las ocho plantas sintomáticas observadas presentaron características de calidad, tamaño, forma o color comparables a las flores de plantas sanas. Sin embar-

go, entre el tercer y cuarto día posterior a la apertura de las mismas ya mostraban síntomas de senescencia. En algunos casos las flores de las plantas enfermas presentaron clorosis y anillos blancos solo en los sépalos (Fig. 1B).

En las tinciones negativas de las purificaciones a partir de tejido foliar, se encontraron partículas virales filamentosas poco flexuosas, con una longitud cercana a los  $500 \pm 48$  nm de largo por  $17 \pm 1$  nm de ancho (Fig. 2).

El análisis electroforético del ácido nucleico y de la proteína de cápside de las partículas purificadas, mostró que este virus filamentososo contiene una molécula de ácido nucleico de peso cercano a los 7 kb (Fig. 3A) y tiene un solo tipo de proteína de cápside con un peso cercano a los 28 kDa (Fig. 3B).

Mediante la prueba de ELISA se identificó que el virus purificado a partir de *P. tankervilleae* corresponde al CymMV.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que el virus encontrado en plantas sintomáticas de *P. tankervilleae* es el virus del



Fig. 2. Partículas virales aisladas de *Phaius tankervilleae* sintomáticas, teñidas con fosfotungstato de sodio (PTA 2% v/v) observadas al microscopio electrónico de transmisión. Barra= 200 nm.

Electron micrographs of negative stained virus particles, isolated from symptomatic plants. Bar=200 nm.

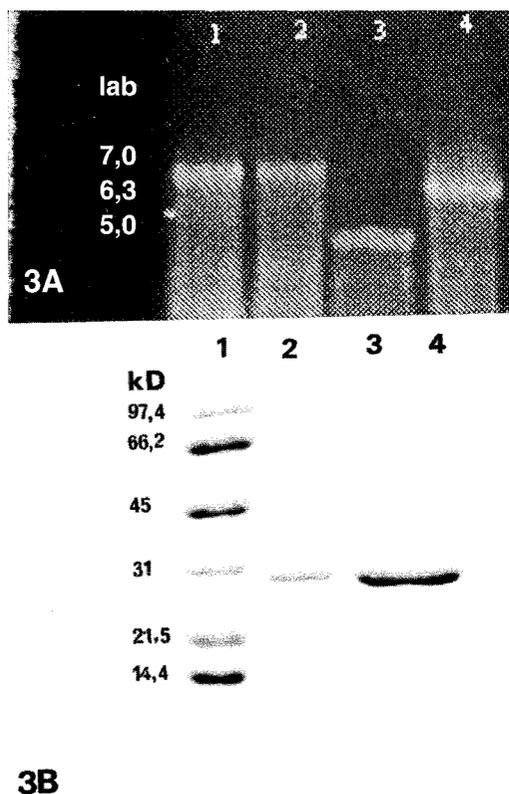


Fig. 3. Análisis electroforético del ácido nucleico y de la proteína de cápside viral. A) Electroforesis del ARN viral en geles nativos de agarosa. Ácido nucleico extraído de las partículas virales de (carriles 1 y 2), ARN de 5 kb de tobamovirus (carril 3), ARN de 6.3 kb de de tobamovirus (carril 4). B) Electroforesis de la proteína de cápside viral en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). Marcadores de peso molecular para proteínas (BioRad Cat. No 161-0304) (carril 1). Proteína de cápside de las partículas virales de *P. tankervilliae* (carriles 2 al 4).

Electrophoretic analysis of viral nucleic acid and coat protein. A) Viral Nucleic Acid analyzed by native agarose gels electrophoresis (lines 1-2), tobamovirus RNA (5kb, line 3), tobamovirus RNA (6.3 kb, line 4). B) Viral coat protein analyzed by SDS-PAGE. Molecular weight markers BioRad (Cat. No 161-0304, line 1), coat protein from virus purified from symptomatic *P. tankervilliae* (lines 2 to 4).

mosaico del *Cymbidium* (miembro de los potexvirus). Tanto el tamaño y morfología de las partículas virales, como el tamaño del ácido nucleico y el peso de la proteína de cápside de este virus purificado concuerdan con los valores informados para el grupo de los potexvirus (Frowd & Tremaine 1977, Steinhart & Oshiro

1990). Estos resultados fueron corroborados mediante la prueba de ELISA al identificarse al CymMV como el virus que infecta *P. tankervilliae* en Costa Rica. El CymMV es un virus filamentososo el cual ha sido informado con longitudes de 475 a 500 nm de largo y con un grosor que va de 13 a 18 nm (Kado 1964, Francki 1970, Jensen 1970, Lawson & Hsu 1995), cuya proteína de cápside en geles SDS-PAGE corresponde a un peso molecular de 27.6 kDa (Francki 1970, Frowd & Tremaine 1977). Su ARN es de banda simple, sentido positivo, de aproximadamente 6.8 kb (Steinhart & Oshiro 1990). Los síntomas que induce fueron descritos por primera vez en Australia por Magee en 1943, quien lo atribuyó a una etiología viral (Jensen 1970). Actualmente no se cuenta con información sobre sus orígenes, ni sobre sus vectores naturales; se conoce que el principal medio de transmisión lo constituyen los instrumentos contaminados empleados para la poda, división de plantas o corta de flores. Kado, en 1964, mencionó que las infecciones de CymMV por lo general evolucionan de una clorosis moderada a una severa y posteriormente la generación de áreas necróticas que pueden rápidamente dispersarse a toda la hoja. Para el caso de las plantas de *P. tankervilliae* que se mantuvieron en invernadero bajo observación durante más de 18 meses no se observó el desarrollo de necrosis foliar.

En 1975, Lawson y Ali incluyen al género *Phaius* dentro de una lista de especies susceptibles al CymMV, sin embargo no especificaron para cual de las tres especies de este género.

En Costa Rica se han realizado pocos estudios sobre la infección de orquídeas con algún virus en particular, los que se han realizado se limitan principalmente a diagnóstico (C. Rivera, datos sin publicar). En 1986 Velasco *et al.*, detectaron mediante microscopía electrónica de transmisión una infección viral mixta en híbridos del género *Cymbidium*, determinando mediante la técnica inmunomicroscopía electrónica de Derrick empleando anticuerpos específicos la identidad serológica de los mismos. El presente artículo informa al CymMV como un virus asociado a la orquídea terrestre *P. tankervilliae* en Costa Rica.

## RESUMEN

En 1996, en un pequeño vivero comercial en la zona oeste del Valle Central de Costa Rica se observaron plantas de la orquídea terrestres *Phaius tankervilleae* que mostraban síntomas foliares de leves a severos de un estriado clorótico sistémico. En algunas flores los sépalos presentaron además manchas cloróticas y anillos blancos. Posteriormente en invernadero se observó que ocurría una senescencia más rápida en flores de plantas sintomáticas que en las flores de plantas sanas de la misma especie. Mediante tinción negativa de muestras purificadas se observaron al microscopio electrónico de transmisión, partículas virales filamentosas poco flexuosas, con un tamaño aproximado a 500 nm de largo y 17 nm de ancho. Al analizar las partículas virales purificadas en geles desnaturantes de proteínas (SDS-PAGE), se determinó la presencia de una sola proteína de cápside cercana a los 28 kDa. En geles nativos de agarosa se determinó que el virus filamentosos observado contiene un ARN con una talla aproximada a los 7 kb. Tanto el tamaño de la proteína de cápside como el del ARN de este virus purificado concuerdan con los valores informados para el grupo de los potexvirus. Mediante la prueba de ELISA se comprobó que el potexvirus purificado corresponde al virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV).

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a H.T. Hsu por facilitarnos el anticuerpo y el conjugado para el CymMV. Esta investigación fue financiada por la Agencia Internacional de Energía Atómica (proyecto COS/5/018) y el Programa para el Diagnóstico de Virus y Viroides en Cultivos de Importancia Económica y Alimentaria (801-94-905) del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica (PCDV-CIBCM, UCR).

## REFERENCIAS

- Clark, M.F. & A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Elliot, M.S., F.W. Zettler, M.T. Zimmerman, O.W. Barnett & M.D. LeGrande. 1996. Problems with interpretation of serological assays in a virus survey of orchid species from Puerto Rico, Ecuador and Florida. *Plant Dis.* 80: 1160-1164.
- Francki, R.I.B. 1970. *Cymbidium* mosaic virus. In Harrison, B.D. & A.F. Murant (eds.). *Descriptions of Plant Viruses*. Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists. Slough, Inglaterra. No.27
- Frowd, J.A. & J.H. Tremaine. 1977. Physical, chemical, and serological properties of *cymbidium* mosaic virus. *Phytopathology* 67: 43-49.
- Hall, C.E. 1955. Electron densitometry of stained virus particles. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1: 1-8.
- Hsu, H.T., D. Vongsasitorn & R.H. Lawson. 1992. An improved method for serological detection of *cymbidium* mosaic potexvirus infection in orchids. *Phytopathology* 82: 491-495.
- Hu, J.S., S. Ferreira, M. Wang & M.Q. Xu. 1993. Detection of *cymbidium* mosaic virus, *odontoglossum* ringspot virus, tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. *Plant Dis.* 77: 464-468.
- Hu, J.S., S. Ferreira, M.Q. Xu, M. Lu, M. Iha, E. Phlum & M. Wang. 1994. Transmission, movement and inactivation of *Cymbidium* mosaic and *Odontoglossum* ringspot viruses. *Plant Dis.* 78: 633-636.
- Jensen, D.D. 1970. Virus disease of orchids in the Netherlands. *Neth. J. Pl. Path.* 76: 135-139.
- Kado, C.I. 1964. Viruses, Villains of Orchids Disorders. *Am. Orchid Soc. Bull. Nov.*: 943-948.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lawson, R.H. 1990. Orchid viruses and their control, p. 66-101. In Pridgeon A.M. & L.L. Tillman (eds.) *Handbook on orchid pests and diseases*. American Orchid Society. West Palm Beach, Florida.
- Lawson, R.H. & H.T. Hsu. 1995. Orchids, p. 409-420. In: Loebenstein, Lawson & Brunt (eds.) *Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops*. Willey, West Sussex, Inglaterra.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. A. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Steinhart, W.L. & M.A. Oshiro. 1990. Gene products encoded by RT-PCR of *cymbidium* mosaic virus RNA: proteins translated in vitro. *Plant Sci.* 72: 141-147.
- Velasco, A.C., F. Hernández & R. Gámez. 1986. Una doble infección viral en orquídeas del género *Cymbidium*. *Rev. Biol. Trop.* 34: 171-179.
- Zettler, F.W., N.J. Ko, G.C. Wisler, M.S. Elliot & S.M. Wong. 1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Dis.* 74:621-626.