



UNIVERSIDAD DEL AZUAY

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA DEL MEDIO AMBIENTE

DETECCIÓN DE Cymbidium Mosaic Potexvirus (CymMV) y  
Odontoglossum RingSpot Tobamovirus (ORSV) MEDIANTE LA  
TÉCNICA INMUNOSTRIP EN ORQUÍDEAS NATIVAS DEL  
ECUADOR

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de

Biólogo del Medio Ambiente

Autoras

Valeria Leonor Dután Patiño,

Diana Alexandra Portilla Merino

Director

Dra. Raffaella Ansaloni

Cuenca, Ecuador

Diciembre 2009

## DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mi Familia: María Ángela y Mauricio, por su gran apoyo, y por animarme siempre a terminar este trabajo, a mi papa que fue quien me impulso hacer este Tema apoyo y aconsejo mucho a mi mama y a mis hermanas. GRACIAS A TODOS POR SU PACIENCIA, este trabajo fue realizado gracias a ustedes.

Diana

Este trabajo está dedicado a mis padres, pues sin su amor y apoyo incondicional me habría sido imposible culminar exitosamente este trabajo.

A mis hermanos que siempre han tenido palabras de aliento y han sabido animarme constantemente.

Y a mis abuelitos pues su presencia y recuerdo siempre han estado conmigo aunque ya no estén junta ami.

Vale

## AGRADECIMIENTO

Esta memoria de gradación no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas a las que agradecemos sinceramente el apoyo brindado.

A la empresa Agdia y de manera especial al Sr. Cristian Delgado ya que sin su ayuda no hubiésemos podido realizar esta tesis.

A la Dra. Raffaella Ansaloni nuestra querida directora de esta tesis por brindarnos su apoyo y consejos que fueron muy útiles para la culminación de esta tesis.

Agradecemos a todos las personas de los viveros estudiados por su enorme colaboración a los Sr/a: Luis Mendoza, James Pérez, José Portilla, Mario Portilla, Carmen Apolo, Carolina Jijón, Diego Vásquez, Francisco Sornoza, Pietro Tossi, Mundiflora, Florian Werner. Falta el Cajas, por permitirnos realizar nuestra tesis en sus cultivos.

A la fundación Charles Darwin de manera especial al Dr. Frank Bungartz y a la Dra Rachel Atkinson por la ayuda brindada.

A nuestros queridos profesores de la Escuela de Biología por ser nuestra guiar en el aprendizaje durante el transcurso de nuestra carrera, mil gracias.

A mis amigos Vol/Bec por el apoyo, la comprensión y el cariño durante este tiempo.

Y por ultimo y no menos importantes a nuestros amados compañeros: Gaby, Jhoa, Mario, Omar, Josué, Pablo y Silvi. Los queremos mucho.

## RESUMEN

Se empleó la Técnica ImmunoStrip para la identificación de los virus CymMV y ORSV en orquídeas nativas del Ecuador. Se designaron diez Cultivos y tres Reservas Ecológicas, de cada uno se obtuvieron 10 muestras, en total se trabajó con 124 muestras, obtenidas al azar, 101 muestras corresponden a cultivos y 23 muestras a las Reservas Ecológicas.

36 muestras de cultivos dieron positivas con la aplicación del Kit. de los cuales 7 individuos tenían los dos virus (19.44%), 6 individuos presentaron ORSV (16.7%), y 23 presentaron CymMV (63,9%), siendo CymMV el virus que más incidencia tuvo en las Orquídeas. Sin embargo los virus están presentes en cantidades pequeñas siendo necesarios los controles fitosanitarios para evitar su propagación.

## **ABSTRACT**

In this study we applied the ImmunoStrip technique to identify CymMV and ORSV viruses in native Ecuadorian orchids. We analyzed ten cultivation types and ten samples from three ecological reserves. There was 124 random samples, 101 corresponded to the cultivated types and 23 from the ecological reserves.

There were 36 virus-positive samples; seven samples were positive for two viruses (19,44%), six samples were positive for ORSV (16,7%) and 23 for CymMV. We conclude that CymMV is the virus that appears the most in native Ecuadorian orchids; however, viruses are often present in small amounts, thus phytosanitary controls are needed.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Apartado</b>	<b>Página</b>
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Índice de contenidos.....	vi
Índice de ilustraciones y cuadros .....	ix
 INTRODUCCIÓN.....	 1
 <b>CAPITULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	 <b>5</b>
1.1 Virus.....	5
1.2 Virus en Orquídeas.....	6
1.3 Familia Potyviridae.....	8
1.4 Género Potyvirus.....	8
1.5 Los virus y su control.....	9
1.6 Detección de virus.....	10
1.7 Pruebas Inmunológicas ImmunoStrip.....	12
1.7.1 Acerca del ImmunoStrip Agdia CymMV/ORSV.....	12

1.7.2 Pruebas con el ImmunoStrip.....	13
1.7.3 El desempeño de la prueba.....	14
1.8 ORSV ( <i>Odontoglossum RingSpot Virus</i> ).....	14
1.8.1 Síntomas.....	14
1.8.2 Distribución Geográfica: .....	15
1.8.3 Hospederos:.....	15
1.8.4 Taxonomía:.....	16
1.9 CymMV ( <i>Cymbidium Mosaic Virus</i> ).....	16
1.9.1 Síntomas.....	16
1.9.2 Taxonomía: .....	17
1.9.3 Hospederos Naturales.....	17
<b>CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 MATERIALES.....	18
2.1.1. Método ImmunoStrip.....	18
2.2. MÉTODOS.....	19
2.2.1. Área de Estudio.....	19
2.2.2. Muestra o Tejido Vegetal.....	22
2.2.3. Recolección de Muestras.....	22

<b>CAPITULO 3: RESULTADOS</b> .....	24
3.1. Sintomatología.....	25
3.2. Prueba ImmunoStrip.....	27
3.3 Análisis Estadístico (Chi <sup>2</sup> ).....	28
<b>DISCUSIONES</b> .....	29
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	35
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	36
<b>ANEXOS</b> .....	42



## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y TABLAS

Tabla 5. Incidencia de CymMV y ORSV en los diferentes invernaderos estudiados.....	24
Tabla 6. Compara la presencia de CymMV y ORSV en los viveros y las Reservas Ecológicas.....	27
Fig.1: Comparación de los posibles síntomas causados por CymMV y ORSV.....	25
Fig.2: En la gráfica se observa la diferencia de la presencia de los diferentes síntomas encontrados.....	26
Fig.3: Numero de Orquídeas asintomáticas con virus.....	26
Fig.4: Numero de Orquídeas sintomáticas con virus.....	27

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Ilustración de los sitios de estudio dentro del mapa político del Ecuador.....	42
Anexos 2 Tablas.....	43
Anexos 3 Demostración de resultados positivos para CymMV ( <i>Cymbidium mosaic virus</i> ).....	49
Anexos 4 Demostración de resultados positivos para el virus ORSV ( <i>Odontoglossum RingSpot Viruses</i> ).....	51
Anexos 5 Demostración de resultados positivos para los virus CymMV Y ORSV.....	52

Dután Patiño Valeria Leonor  
Portilla Merino Diana Alexandra  
Trabajo de Graduación  
Dra. Raffaella Ansaloni  
Diciembre 2009

**DETECCIÓN DE *CYMBIDIUM MOSAIC POTEXVIRUS* (CymMV) Y *ODONTOGLOSSUM RINGSPOT TOBAMOVIRUS* (ORSV) MEDIANTE LA TÉCNICA IMMUNOSTRIP EN ORQUÍDEAS NATIVAS DEL ECUADOR**

**INTRODUCCIÓN**

La familia Orchidaceae es la familia de plantas con flor más grande de reino vegetal teniendo entre 20.000 a 35.000 especies dependiendo del autor, agrupadas en 700 géneros. (Rivera 1998). La importancia de las orquídeas radica por su belleza y gran diversidad de forma, tamaño, fragancia y color, son utilizadas para la decoración de jardines y eventos sociales, en exhibiciones y comercialización tanto de la flor como de la planta en sí.

La flora Latinoamericana cuenta con una gran variedad de orquídeas, distribuidas en las costas, las sierras y las selvas, encontrándose en este último lugar la mayor densidad (Quiñónez, 2000). En Ecuador que es considerado como uno de los países con la mayor biodiversidad del mundo tomando en cuenta su reducida superficie geográfica, 25 % de la flora nativa ecuatoriana descrita. (Dodson, 2001). Es decir con que hay 219 géneros y 4.225 especies clasificadas y esto equivale al 25 % de la flora nativa ecuatoriana descrita. Esta cantidad representa cerca del 60% de las especies identificadas en América del Sur y 40% de las especies del continente americano (Hittrich, A. 2004).

Las orquídeas son tan populares por hombre para sus casas y jardines que se ha creado nuevas especies por hibridación durante 150 años. Ahora se cuenta con aproximadamente 150000 nuevos cruces (Hitrz. A. 2004).

En el Ecuador la comercialización de plantas ornamentales y de sus flores se ha incrementado considerablemente. Entre las familias más comercializadas se encuentran las orquídeas debido a su belleza y diversidad de forma, tamaño, fragancia y color.

En los últimos años, las exportaciones de plantas ornamentales y flores cortadas, se sitúan en las primeras posiciones dentro de los productos no tradicionales. Por estas razones, su cultivo se ha intensificado por parte de personas y empresas, los cuales deben tener presente la calidad fitosanitaria del material, con el fin de evitar la aparición de enfermedades fungosas, bacterianas y virales, así como plagas que amenacen su desarrollo y calidad (Mckendrick, 2002).

Las enfermedades de las plantas causan la pérdida de, aproximadamente, el 15% de la producción agrícola mundial. En particular, las infecciones virales producen perjuicios económicos significativos ya que una vez infectada la planta tiene que ser extraída del invernadero para evitar la contaminación de las plantas. (Lawson 1990, Zettler et al. 1990, Hu et al. 1994, Lawson & Hsu 1995).

Las 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 cuyo tráfico sin control ya sea con fines de colección o mejoramiento, ha favorecido la dispersión a nivel mundial de enfermedades, entre ellos los virus.(Zettler et al. 1990, Hsu et al. 1992).

Los cultivos de orquídeas son afectados por enfermedades que se propagan fácilmente y son difíciles de controlar, como son las enfermedades bacterianas, fúngicas y virales, las dos primeras se pueden controlar mediante la aplicación oportuna de pesticidas, no así las enfermedades causadas por virus ya que son partículas submicroscópicas, provistas de ARN o ADN que causan daño a la planta. Los síntomas frecuentes de las infecciones virales son: reducción del vigor de la planta, alteración de la floración, disminución del tamaño y la calidad de la flor, todo esto, afecta el valor de exhibición o comercialización

de las plantas (Hu et al. 1993). Hasta el momento no se ha obtenido un producto específico para su control, lo que afecta directamente al desarrollo y producción de las orquídeas.

Los virus son causantes de pérdidas económicas significativas en los cultivos en general, sobre todo en las orquídeas que están propensas a infecciones virales, en alguna etapa de su desarrollo debido a que tienen un crecimiento continuo o indefinido. Los virus que afectan a las orquídeas son alrededor de 30, afectan principalmente a híbridos, de las cuales las de mayor importancia económica son ORSV y CymMV.

La transmisión de los virus a las orquídeas se da a través de las herramientas, roce entre plantas y por la manipulación del hombre. El realizar estudios para conocer la presencia de los virus que afectan a las orquídeas es de mucha importancia, ya que estas plantas tienen importancia comercial; en nuestro medio hay una creciente demanda de estas plantas, tanto para aficionados como para cultivos industriales. Para satisfacer el mercado de flores la estrategia es propagar las orquídeas ya sea por meristemos, semillas o simple división, pero para ello se debe estar seguro que las plantas a propagarse estén libres de virus. De ahí nuestra necesidad de poner a prueba algunas técnicas, buscando eficacia y sensibilidad en la detección de virus en las plantas madres.

CymMV y ORSV se consideran los virus más importantes, tanto por su amplia distribución, como por sus efectos en las orquídeas. En la literatura se ha informado que estos virus producen manchas cloróticas, necróticas o ambas en las hojas de especies e híbridos de *Cattleya*, *Coelogyne*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Laeliocattleya*, *Miltonia*, *Odontoglossum*, *Oncidium*, *Phalaenopsis*, *Spathoglottis*, *Vanda* y *Zigopetalum*. Sin embargo, los síntomas varían en intensidad y forma entre géneros o especies de orquídeas (Jensen 1951; Jensen, Gold 1955; Murakishi 1958; Kado, Jensen 1964; Corbett 1967; Cybularz et al. 1997). Ambos virus pueden inducir jaspeados y deformación en las flores de *Cymbidium* y *Dendrobium*, e incluso manchas necróticas, que producen mala calidad de la flor en *Cattleya*, lo que afecta tanto a la producción comercial, como a los coleccionistas. (Zettler et al. 1990, Hu et al. 1994, Lawson 1995, Tanaka et al. 1997).

Hasta ahora las enfermedades de orquídeas han sido solamente consideradas en el ámbito de producción y comercialización de las plantas. Debido al hecho que las enfermedades producidas por los virus CymMV y ORSV no son específicas para plantas de cultivo, existe la posibilidad que lleguen a los bosques nativos, afectando las especies naturales. La consecuencia de estas puede ser grave afectando la reproducción de especies nativas y endémicas con la probabilidad de llegar hacer otra amenaza adicional al problema de colección ilegal, deforestación, la expansión de la frontera agrícola y urbana

El objetivo de esta investigación fue conocer si 5 géneros de orquídeas nativas del Ecuador (*Masdevallias*, *Catleyas*, *Pleurothallis*, *Oncidium* y *Maxillarias*) se encuentran infectadas por los virus *Cymbidium Mosaic Virus* y *Odontoglossum RingSpot* tanto en viveros como en estado natural. También, investigar si la técnica ImmunoStrip es útil para monitoreo de poblaciones de orquídeas nativas. Nuestras preguntas fueron: 1) ¿En el Ecuador hay presentes los virus *Cymbidium Mosaic Virus* y *Odontoglossum RingSpot* en 5 géneros de orquídeas nativas, tanto en cultivos como en Reservas Ecológicas? 2) ¿El Kit ImmunoStrip puede ser utilizado para la detección de virus en el Ecuador? 3) ¿Existe diferencia en la presencia de los virus *Cymbidium Mosaic Virus* y *Odontoglossum RingSpot* entre los viveros y las reservas naturales? 4) ¿Existe diferencia entre el numero de planta infectados por los virus *Cymbidium Mosaic Virus* y *Odontoglossum RingSpot* en los viveros?

## CAPITULO 1

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 1.1. Virus

Los virus son entes infecciosos submicroscópicos, patógenos obligados, capaces de organizar su propia multiplicación dentro de las células de un hospedante adecuado. Las partículas virales están formadas por ácido nucleico rodeado por una cubierta proteica. La replicación de los virus se organiza con base en la información genética contenida en su ácido nucleico, y se lleva a cabo a partir de materiales presentes en la célula del hospedante, utilizando las enzimas y estructuras de ésta para la síntesis de proteína (Arauz, 1998).

Los virus están compuestos por una región central de ácido nucleico, ADN y ARN rodeados por una cubierta proteínica o cápside y en algunos casos por una envoltura lipoproteica; estos no pueden reproducirse por si solos, sino dentro de las células vivas, utilizando las enzimas y la maquinaria biosintética de sus hospederos. (Arauz, 1998).

Los virus perturban las funciones normales de las plantas, utilizando los recursos estructurales de éstas, para fabricar más partículas virales. Generalmente estos no provocan la muerte de las plantas, pero si causan cambios que reducen su productividad, y en el caso de las orquídeas afecta directamente a su valor ornamental. Asimismo una planta enferma puede contaminar muchas otras fácilmente por la manipulación y el contacto entre una enferma y una sana, debido a que una planta virótica en poco tiempo tiene millones de partículas virales. (Arauz, 1998).

Los virus en las plantas causan gran variedad de síntomas, algunos de ellos son característicos pero muchos son similares a los causados por desórdenes nutricionales, daños por insectos, bacterias y hongos. (Infoagro s.f.).

El síntoma más característico producido por los virus es la pérdida de vigor. También se producen otros como: variaciones de color en las hojas, tales como, mosaicos o rayas, clorosis en o cerca de las venas, clorosis generalizada, manchas anulares, venas necróticas, deformaciones; brotes abultados y malformaciones, reducciones de tamaño y cambios en el color de las flores (Infoagro s.f.).

La clasificación de los virus está dada por el tamaño, forma y la composición química del genoma; el genoma de los virus puede estar constituido por ADN o ARN que puede ser de simple o doble cadena. (Infoagro s.f.).

## 1.2. Virus en Orquídeas

El primer caso documentado publicado en el que habla de una orquídea infectada por virus data de 1900, cuando Lucien Linden, muestra un dibujo de *Cattleya labiata*, que presentaba manchas en las flores, común en plantas infectadas por *Odontoglossum RingSpot tobamovirus* (ORSV). Esta fue considerada como una nueva variedad *C. labiata* var. *alfrediana* (Schelpe 1983). Aunque en esa época se considero como una nueva variedad, lo más probable es que se tratara de la presencia de virus ya que los síntomas que presentaba eran muy similares a los jaspeados en tulipanes, que ya se conocían como una enfermedad viral importante en esa época.

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



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

Los virus identificados que infectan a las orquídeas pertenecen a diferentes grupos taxonómicos. Los dos virus más conocidos y de distribución cosmopolita son el *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) y el ORSV (*Odontoglossum Mosaic virus*). Ambos virus fueron descritos en la década de los 1950 (Zettler et al. 1990, Lawson 1995). Aparte de éstos, se conocen al menos 28 virus más que pueden infectar orquídeas. De algunos de estos virus se cuenta con poca información, en especial sobre sintomatología y ámbito de hospederos en la familia Orchidaceae y en otras familias de plantas. En muchos casos, la presencia de algunas especies de virus en orquídeas, ha sido comunicada una sola vez, por lo que no se conoce su procedencia, ni sus vectores; o si pueden infectar otras especies de orquídeas distintas a la especie en que se determinó (Lawson & Hsu 1995). Incluso, en algunos de estos casos, el cuerpo vegetativo, las flores o ambas partes de la planta se observaron asintomáticos. (Geraci 1996, Lawson 1995).

En los últimos años los virus han tomado gran importancia dentro de los cultivo de orquídeas. La alta incidencia de estos patógenos puede ser atribuida a la facilidad de transmisión por herramientas utilizadas en las prácticas agrícolas, así como al desconocimiento popular de prácticas preventivas de estas enfermedades. Otro factor de mucha importancia es la gran popularidad y el aumento de cultivo de orquídeas, lo cual puede venir acompañado de un incremento de las enfermedades. (Portilla. M. 2009- Fuente privada)

Gibbs et al. (2000) dice que alrededor de ocho virus del género Potyvirus han sido informados infectando orquídeas (*Cucumovirus*, *Nepovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Rhabdovirus*, *Tobamovirus*, *Tombusvirus* y *Tospovirus*). Sin embargo, la mayoría de las publicaciones sobre este tema se han concentrado en solo dos virus, *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) y *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) por su

importancia económica además se ha reportado la presencia de estos dos virus en casi todos los géneros de orquídeas del mundo (Gibbs et al. 2000).

### **1.3. Familia Potyviridae**

Es la familia más grande de virus de plantas. Abarca aproximadamente 400 especies lo que es una cuarta parte de todos los virus de plantas descritos (Gibbs et al. 2000). De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía Viral (sus siglas en inglés I.C.T.V.) está compuesta por seis géneros: *Potyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Tritimovirus* y *Rymovirus* (Van et al. 2000).

Los miembros de esta familia tienen en común la morfología de los viriones. Estos son filamentos flexuosos de aproximadamente 11 a 15 nm de grosor y de 650 a 950 nm de longitud. Otra característica común que presentan es la de inducir la formación de inclusiones cilíndricas en el citoplasma de las células infectadas, dicha presencia se acepta como criterio de importancia en la clasificación taxonómica (Brunt et al. 1994).

Su genoma está formado por un único ARN de cadena simple, de polaridad positiva y de alrededor de 10 kb, con excepción de los bymovirus, que tienen un genoma separado en dos fragmentos. Aunque se dispone de la secuencia de nucleótidos de genomas completos de bymovirus, y de partes de genomas de rymovirus, la mayor información de los potyviridae corresponde a miembros del género *Potyvirus* (García. F., J. García. 1996).

### **1.4. Género Potyvirus**

Está formado por 179 especies (91 aceptadas oficialmente por el ICTV y 88 especies tentativas) (Van et al. 2000). Este género presentan partículas filamentosas y flexuosas de aproximadamente 680-900 nm de longitud y 11-13 nm de grosor.

Su genoma es de una sola cadena de ARN en sentido positivo y una proteína de cápside de un peso molecular de alrededor de 30-47 kDa. (Gibbs et al. 2000).

Algunos de los síntomas foliares que induce este género viral en las orquídeas son deformaciones, parches cloróticos hundidos, mosaicos y senescencia (Pearson et al. 1993, Gibbs et al. 2000), además frecuentes cambios de color y deformación de flores.

### **1.5. Los virus y su control.**

Las orquídeas son atacadas por muchas enfermedades de las cuales los virus son los más difundidos. Más de 30 virus han sido reportados en orquídeas pero muchos de estos son muy poco comunes y su infección causa a apenas algún síntoma de poca importancia, sin embargo, *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) y *Odontoglossum ringSpot tobamovirus* (ORSV) son los virus más prevalentes y económicamente más importantes, estos virus afectan una amplia gama de géneros de orquídeas sobre todo al género *Cymbidium*. Una vez que una planta se ha infectado, no hay ningún procedimiento seguro para librarla, la planta pierde totalmente su valor comercial y representa un serio riesgo para las restantes plantas de la colección, por lo que al menos debe aislarse de las otras orquídeas y darles un tratamiento específico con productos antivirales; aunque la mayoría de coleccionistas recomiendan destruir las plantas infectadas. (Gibbs et al. 2000).

Los virus más importante de las orquídeas son el *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y el *Odontoglossum ringSpot virus* (ORSV); también comúnmente conocido como *Tobacco mosaic virus-O* o (TMV-O). Están distribuidos ampliamente e infectan a un amplio género de orquídeas. Tienen un número de propiedades biológicas en común que influyen en su forma de distribución. Se transmiten fácilmente a través de métodos mecánicos como tocar, cortes con navajas, etc. (Van et al. 2000).

La contaminación de las plantas se puede dar también a través de la propagación y sobre todo por las prácticas culturales; *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y el *Odontoglossum ringSpot virus* (ORSV) son virus muy estables y pierden su inefectividad muy lentamente. Estos virus se mantienen en plantas secas o en las herramientas, no son transmitidos por insectos (pulgones) y no es muy común la transmisión por polen y semillas.

## 1.6 Detección de virus

La detección de virus no es fácil ya que solo con síntomas no es posible su detección, pues varían de una especie a otra, hay infecciones mixtas, e incluso infecciones asintomáticas. Además, algunas enfermedades fúngicas y bacterianas provocan síntomas similares, siendo difícil su diagnóstico a simple vista. Por tanto, la detección visual de síntomas no siempre es acertada o recomendable, por lo que se han desarrollado métodos más seguros y específicos. La detección pronta y segura de plantas infectadas, así como la eliminación de los vectores, son prácticas imprescindibles para todos los cultivadores, a fin de evitar la diseminación de los virus. (García. F., J. García. 1996)

Uno de los sistemas más comúnmente utilizados para la detección de los virus en orquídeas es el bioensayo, ya que no requiere equipos especiales, y puede ser realizado por cualquier cultivador (Lawson 1995). Sin embargo, se requiere contar con muchas especies de plantas indicadoras para diferentes virus, del espacio físico para mantenerlas y de tiempo para lograr observar los síntomas.

La microscopía electrónica es otro método usado para la detección e identificación de virus, ya sea mediante la evaluación de secciones ultrafinas, tinción negativa o mediante el método de la inmuno- electromicroscopia (ISEM), (Hsu et al. 1992, Lawson, Hsu 1995). Una de las ventajas del ISEM es que permite la observación directa del antígeno, mediante la combinación de tinción y detección inmunológica; no obstante, ésta es una técnica muy cara y no está disponible en todas partes. Además, requiere de mucho tiempo y de personal altamente calificado.

En la actualidad, uno de los métodos más utilizados para detectar virus en orquídeas, es la técnica de DAS-ELISA, debido a la especificidad de sus resultados, costo económico relativamente bajo, rapidez de las pruebas pues permite analizar muchas muestras simultáneamente (Robertson 1992, Hu et al. 1993, Lawson 1995, Geraci 1996). En Estados Unidos, varias compañías venden servicios de evaluación de orquídeas para CymMV y ORSV, y son recomendadas aquellas que utilizan el método de DAS- ELISA, por la certeza de los resultados (Robertson 1992). Sin embargo, se considera que la interpretación de los datos obtenidos por DAS- ELISA no siempre es fácil. Se debe

determinar el umbral de exclusión entre plantas positivas y negativas, por lo que se requiere de experiencia en el manejo de la técnica y el conocimiento del virus en estudio (Sutula et al. 1986).

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

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

Para CymMV y ORSV se han utilizado varias técnicas moleculares, entre ellas las sondas de ADN marcadas con Digoxigenina o radiactividad, que permiten identificar la presencia de los ARN virales o bien determinar el movimiento de las partículas virales

en las plantas (Hu y Wong 1998). En algunos casos (CymMV y ORSV) se cuenta con imprimadores específicos para realizar el diagnóstico, empleando la técnica de IC-RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con inmunocaptura y transcripción reversa), (Barry et al. 1996, Eun y Wong 2000).

### **1.7 Pruebas Inmunológicas ImmunoStrip.**

La prueba Inmunológica ImmunoStrip es una prueba serológica que detecta los virus ORSV y CymMV, esta prueba puede ser utilizada en el campo y la obtención de resultados es a minutos de su aplicación. (Agdia. s.f. 2009)

Esta prueba fue creada por la empresa Agdia, que es una empresa dedicada a la detección de patógenos vegetales, esta prueba es fácil y rápida de usar para que los aficionados, cultivadores y propagadores comerciales de orquídeas puedan detectar dos de los virus que con más frecuencia afectan a las orquídeas: *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y el *Odontoglossum ringSpot virus* (ORSV). (Agdia. s.f. 2009)

El CymMV causa la enfermedad conocida como “rayado negro del Cymbidium” y el ORSV, referido por algunos como el Virus del Mosaico del tabaco- que afecta a orquídeas o “*Tobacco Mosaic Virus - Orchid strain*” (TMV-O), pueden ser detectados fácilmente con sólo un ImmunoStrip. (Agdia. s.f. 2009)

#### 1.7.1 Acerca del ImmunoStrip Agdia CymMV/ORSV

Las plantas infectadas con CymMV y ORSV no siempre muestran síntomas. Cuando los síntomas están presentes estos pueden diferir de variedad a variedad y aparentar otros problemas. Este comportamiento hace difícil el reconocimiento de plantas infectadas. El ImmunoStrip CymMV/ORSV de Agdia puede detectar e identificar ambos virus en sólo unos minutos. (Agdia. s.f. 2009)

Ventajas del Método:

- Le informa específicamente si las plantas están infectadas con uno o ambos virus.
- Cualquier parte de la planta puede ser usada para la prueba excepto los pseudo-bulbos.

- Resultados claros y limpios hacen que esta prueba sea muy fácil de interpretar.
- Fácil de usar – la prueba no requiere de equipo alguno.
- Portátil – usted puede llevar su ImmunoStrip donde lo necesite.
- Un año de garantía - almacenado adecuadamente.



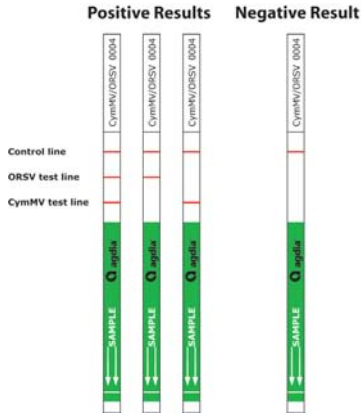
### 1.7.2 Pruebas con el ImmunoStrip

La infección dentro de los invernaderos se puede originar por la compra de orquídeas infectadas por estos dos virus CymMV y ORSV, y la transmisión de una planta a otra se da de manera mecánica por el mal uso de los instrumentos de corte o de manipulación. La empresa Agdia de recomendaciones para prevenir la infección y así diseminar la presencia de estos dos virus dando así en su página de Internet el siguiente régimen de muestreo:

- PRUEBE antes de comprar
- PRUEBE antes de transplantar
- PRUEBE antes de hibridizar (estado de floración)

El kit ImmunoStrip tiene la tecnología de ELISA de laboratorio en un formato fácil de usar y que se ajusta perfectamente al trabajo en el vivero, jardín o invernadero. Para usar el ImmunoStrip, simplemente triture una muestra de la planta sospechosa dentro de una bolsa de muestreo (incluido en el “kit”) que contiene la solución para la extracción de la muestra e inserte el ImmunoStrip dentro de la bolsa. El resultado puede ser observado en minutos. (Agdia. s.f. 2009)

### 1.7.3 El desempeño de la prueba



Agdia en su página de Internet nos dice que el kit ImmunoStrip ha pasado por una exhaustiva validación, además que sus experimentos fueron realizados utilizando muestras de plantas infectadas de manera natural y no infectadas provistas por fuentes externas mostrando una correlación del 100% con los resultados obtenidos con el método ELISA. Este fue evaluado por colaboradores que

mantienen colecciones de diferentes aislamientos de virus en orquídeas”. (Agdia. s.f. 2009)

## **1.8 ORSV (*Odontoglossum RingSpot Virus*)**

*Odontoglossum RingSpot Virus* es un virus presente en todo el mundo, no tiene una sintomatología características que permite la fácil detección permitiendo así su rápida propagación. No se conoce un vector que este directamente relacionado con la transmisión ORSV, la contaminación de plantas dentro de los viveros se transmite por medios mecánicos. ORSV es un virus muy estable, se inactiva al exponerle a temperaturas superiores a 90 C. Sus partículas virales poseen forma de bastón, con un largo aproximado de 300 nm y 18 nm de ancho. Los viriones están formados de: 5% de ácido nucleico y 95% de proteínas. (Brunt *et.al* 1996)

### 1.8.1 Síntomas

Unas de las principales anomalías que causa la presencia de este virus ORSV en las orquídeas es la despigmentación que varía inclusive dentro de la misma planta ya que las tonalidades pueden cambiar de una flor a otra. Otro síntoma es la pérdida de vigor de la planta así como la disminución de los escapos florales y el tamaño de las flores.



En las hojas se manifiestan unas manchas amarillentas o negro-amarillentas en forma de anillos lo que le da el nombre a esta enfermedad. (Büchen. 1996)

En las hojas se manifiestan unas manchas amarillentas o negro-amarillentas en forma de anillos lo que le da el nombre a esta enfermedad. (Büchen. 1996)



ORSV



ORSV

### 1.8.2 Distribución Geográfica

Según estudios realizados se considera que ORSV tienen una posible distribución mundial. (Büchen. 1996)

### 1.8.3 Hospederos

Bajo condiciones experimentales la susceptibilidad a la infección del virus se ha encontrado en muchas familias, encontrando así que las siguientes familias son susceptibles a la infección por este virus: Amaranthaceae, Apocynaceae, Basellaceae, Cactaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Gramineae, Labiatae, Leguminosae-Caesalpinioideae, Leguminosae-Papilionoideae, Malvaceae, Orchidaceae, Papaveraceae, Passifloraceae, Plantaginaceae, Polemoniaceae, Portulacaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Tetragnoniaceae, Tropaeolaceae, Umbelliferae. (Büchen. 1996)

#### 1.8.4 Taxonomía

El Código del Virus de Acuerdo a la descripción de ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) es 71.0.1. *Virus Accession number* 71010000. Y el sinónimo es *Tobacco mosaic virus*. (Büchen. 1996)

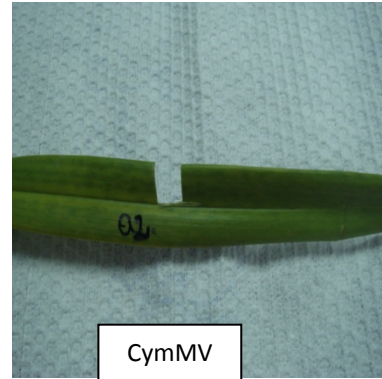
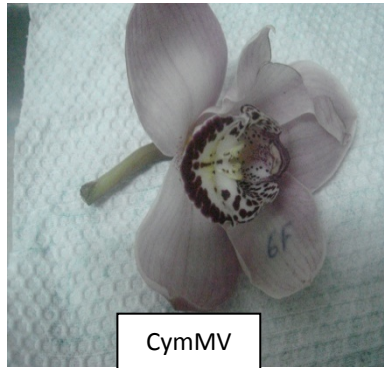
### **1.9 CymMV (*Cymbidium Mosaic Virus*)**

La transmisión de CymMV se puede dar de manera mecánica o por medio de semillas contaminadas. Este virus tiene un punto de inactivación térmica que se encuentra entre 55 y 77C, puede mantenerse fuera de la planta por diez días. El virón se encuentra formado por ácido nucleico en un 18% y proteína en un 82%. (Brunt *et.al* 1996)

#### 1.9.1 Síntomas:

*Cymbidium mosaic viruses* en las orquídeas causa la presencia de estrías cloróticas, manchas necróticas y patrones lineales necróticos. La presencia de rayas amarillentas se da debido al ataque de este virus; las mismas que producidas por la inhibición de la formación de cloroplastos estas finas rayas son alargadas en las hojas jóvenes y a medida que la enfermedad avanza las nervaduras se vuelven cloróticas y se ensanchan afectando incluso a toda la hoja verde llegando a producir la necrosis o muerte de los tejidos de la hoja, en algunas hojas infectadas se presentan con frecuencia rayas negras y puntos a veces tan severos que causan la muerte prematura de estas hojas. Estas manchas o moteados son los que le dieron el nombre original de Mosaico. (Büchen. 1996)

Las plantas con una infección leve lucen aparentemente normales, crecen y dan flores; pero las más afectadas retardan su crecimiento y por lo tanto su floración es mala y hasta veces nula; esta enfermedad en las flores causa rayas marrones a lo largo de las nervaduras y poco a poco van tomando coloraciones más acentuadas a medida que las flores envejecen siendo más evidente en las flores blancas que en las flores de color. (Büchen. 1996)



### 1.9.2 Taxonomía

El Código del Virus de Acuerdo a la descripción de ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) es 00.056.0.01.007. (Büchen. 1996)

### 1.9.3 Hospederos Naturales

La mayoría de las plantas del reino Plantae son hospederos naturales.

La susceptibilidad bajo condiciones experimentales a la infección por virus se ha encontrado en varias familias, las especies de hospederos susceptibles pertenecen a las familias: Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Gramineae, Leguminosae-Caesalpinioideae, Orchidaceae, Solanaceae, Tropaeolaceae. (Büchen. 1996)

## CAPITULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. MATERIALES

##### 2.1.1. Método ImmunoStrip

El ImmunoStrip CymMV/ORSV de Agdia puede detectar e identificar ambos virus en solo unos minutos, se puede utilizar cualquier parte de la planta para poder aplicar la prueba excepto los pseudo-bulbos, no requiere de ningún tipo de equipo y se puede llevar el kit donde lo necesite.

La prueba ImmunoStrip incluye 150 bolsas que contienen en su interior una muestra de 3ml de buffer, 150 tiras (ImmunoStrip).

Se utilizó 0.15g., del tejido vegetal de la Orquídea, en su mayoría hojas jóvenes, con o sin sintomatología.

Para poder llevar a cabo una buena asepsia se utilizó guantes quirúrgicos, alcohol puro potable al 70 %, y una lámpara de alcohol, para desinfectar las cuchillas, manos y tijeras.

Y para rotular las bolsas de muestreo se utilizó etiquetas autoadhesivas color verde, se llevó también un registro de cada resultado final en una libreta de campo, donde se anotó: nombre de la especie, nombre del invernadero y/o reserva ecológica, presencia o no de sintomatología, parte del tejido vegetal (hoja o flor), positivo/negativo presencia de CymMV, positivo/negativo presencia de ORSV, e incluso se fotografió para poder llevar un registro gráfico de la bolsa de muestreo junto con el tejido vegetal extraído.

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1 Área de Estudio

Los Invernaderos y Bosques que fueron estudiados representan el grado de influencia que tienen dentro de la economía del país y el mercado internacional como su variedad en especies.

Los Invernaderos fueron los siguientes:

1. Sra. Carmen Apolo (ubicación: Sector Chilca- Machala Prov. El Oro) se cuenta con más de 300 variedades de especies nativas y dos grandes invernaderos, exporta esporádicamente dos veces al año, y asiste a varios eventos de exposiciones de Orquídeas Nativas en el Ecuador.

2. Sr. Luis Mendoza (ubicación: Vilcabamba Prov. Loja) existe una variedad de cerca de 1200 especies nativas, con 6 invernaderos, exporta frecuentemente, y su cultivo, aparte de que se comercializa, se enfoca a la conservación de especies. El cultivo del

3. Sr. Mario Portilla (ubicación: Mayancela-Cuenca Prov. Azuay) cuenta con 600 variedades de especies nativas enfocadas estrictamente a su conservación, pues lo que se comercializa son *Cymbidium* híbrida alrededor del todo el Ecuador, dichas variedades están dentro de dos Invernaderos.

4. Ecuagenera (Ubicación: Gualaceo Km 2 Vía a Cuenca Prov. Azuay) es uno de los más grandes exportadores y cultivadores de Orquídeas en Ecuador, cuenta con más de 2500 especies de Orquídeas en cultivo.

5. Mundiflora (Ubicación: Cantón El Pangui Prov. Zamora Chinchipe) es una empresa que al igual que Ecuagenera surge con la idea de ser un exportador grande de Orquídeas, se dirige a la conservación. Posee más de 659 especies, con 3 invernaderos, y por ser una empresa relativamente nueva exporta 1 vez al año.

6. Sr. Pietro Tossi (Ubicación: Cuenca Prov. Azuay) se inició como una afición a las Orquídeas pero con el tiempo pudo cultivar más de 300 especies de Orquídeas nativas en tres invernaderos, y su objetivo final es la conservación de dichas especies.

7. la Universidad Estatal (Ubicación: Sector Balzay -Cuenca Prov. del Azuay) se enfoca netamente a estudios Investigativos y Posee un Laboratorio de Propagación *In vitro* de Plantas. Posee 600 especies nativas con 5 Invernaderos para plantas de clima caliente y un Umbráculo para plantas de Clima Frio. Cuenta con el permiso de exportación, pero por el momento no exporta.

8. Jardín Botánico de Guayaquil. (Ubicación: Cerro Colorado, Urbanización “Las Orquídeas”. Guayaquil.) El jardín Botánico conserva aproximadamente 324 especies debidamente identificadas entre ellas la Orquídeas con más de 50 especies (Jardín botánico de Guayaquil. 2009)

9. Jardín Botánico de Quito. (Ubicación: Av. de Los Shyris- Quito Prov. Pichincha). El orquideario dispuesto de dos Invernaderos, donde se albergan las Orquídeas de altura y las tropicales. Se encuentran las Orquídeas dispuestas sobre piedras, el suelo o en troncos de Árboles, como sucede en la Naturaleza. Los dos Orquidearios que se encuentran aquí recogen más de 1.200 especies de orquídeas ecuatorianas nativas o híbridas. Para crear el hábitat indispensable para su crecimiento, las flores están rodeadas por especies como bromelias, aráceas y helechos (El Hoy 2005).

10. Universidad Técnica Particular de Loja. (Ubicación: Loja- Prov. Loja). La Universidad cuenta con varios Invernaderos de Orquídeas Nativas, aquí se realizan un sin numero de estudios relacionados con su crecimiento, propagación y simbiosis con hongos, su variedad de Orquídeas Nativas es muy poca, pero suficiente para realizar sus investigaciones. Cuentan los laboratorios Biomoleculares, un banco de Germoplasma que se crea en noviembre de 2002 y se consolida en el 2005 pasando a ser un laboratorio acreditado por el Ministerio del Ambiente. (Universidad Técnica Particular de Loja. 2008)

Los Áreas naturales fueron:

1. Reserva de Buenaventura (ubicación: Piñas- Zaruma Prov. El Oro) cuenta con un centenar de especies sobre todo en la reserva de Tapichalaca, la mitad son endémicas del mismo lugar y 60 especies están dentro del Libro Rojo de Flora del Ecuador (Fundación de Conservación Jocotoco). Involucra especies como la *Maxillaria striata*, *Masdevallia deformis* que crece con una bromelia, *Telipogon dodsonii* encontrado cerca de los 2900msnm., *Draconanthes sp.*, encontrado cerca de los 3450msnm, *Lepnates nivia* y siete especies de sobralias (Fundación de Conservación Jocotoco) también se incluyó dentro de la investigación
2. Estación San Francisco (ubicación: Loja- Zamora.) Posee una densa vegetación se encuentra entre los 1.800 y 3.150 msnm, posee un bosque nublado montano andino y abarca 1.000 hectáreas en le límite norte del Parque Nacional Podocarpus (Explored. 2009).
3. El Parque Nacional Cajas tiene una superficie de 28,808 hectáreas. El páramo húmedo ocupa la mayor superficie, con flora característica de esta zona de vida. Las actividades agrícola y ganadera de las comunidades aledañas representan una amenaza para la preservación del parque. Frecuentes quemas de pajonal, y el constante tránsito de ganado, son factores que destruyen su ecosistema. En el límite oriental del Parque se erige el bosque, compuesto principalmente por especies arbóreas y arbustos con gran diversidad de orquídeas, helechos y musgos. En el límite occidental, abundan las especies maderables. (Parque Nacional Cajas- ETAPA. 2002).

### 2.2.2. Muestra o Tejido Vegetal

En cuanto a la muestra o tejido vegetal de la Orquídea se estudiarán las especies que se pueda obtener tanto de Cultivos como de Reservas Ecológicas, eso sí, tomando en cuenta a las cinco especies precisadas a nuestra investigación entre las cuales están (*Masdevallias*, *Oncidium*, *Cattleya* y *Maxillarias*). Tomando dos muestras de cada una de dichas especies, es decir, diez especies precisadas, por cada sitio de estudio y cinco totalmente diferentes. Se hablara claramente de la manera de cómo serán recolectadas a continuación. Se tomaron diferentes *Pleurothallis*, especies de cada género, estos están expresados en la tabla 9.

### 2.2.3. Recolección de muestras

#### Tejido vegetal

El estudio se inicio el 7 de Mayo de 2009 en diferentes cultivos y reservas ecológicas. En primer lugar el método de selección de muestras fue totalmente al azar, tratando de tomar de todos los invernaderos en el caso de los viveros, y en caso de Reservas se recolecto en lugares en donde mayor presencia había de *Masdevallias*, *Pleurothallis*, *Oncidium*, *Cattleya* y *Maxillarias*.

Para la recolección del tejido vegetal, se colocó, guantes quirúrgicos y se desinfectaron las manos con alcohol potable al 70%, luego se esterilizó tijeras y cuchillas, se escogió la planta previamente, y se extrajo una hoja de cada especie con la cuchilla.

#### **Aplicación Prueba ImmunoStrip**

Se esteriliza una tijera y se corta la bolsa de muestreo, luego se trata de separar las mallas que contiene la bolsa, y con las manos nuevamente desinfectadas se trata de obtener una pequeña cantidad de hoja (0.15g.) y esta porción de tejido se la coloca entre las mallas separadas de la bolsa.

Con el tejido vegetal dentro la bolsa, se machuca, en nuestro caso se utilizo esferos ó marcadores, y debe estar sobre una superficie plana, no sobre piedras o una superficie rugosa.



Finalmente se sumerge el ImmunoStrip en forma vertical que no pase de 0.5 cm ó  $\frac{1}{4}$  de pulgada y por debajo de las flechas blancas. Y se esperan los resultados finales, se espera de 5 a 10 minutos.

Es importante poner en claro que para la identificación de las muestras recolectadas en las Reservas ecológicas, se pidió ayuda a los guardaparques o guías propios de las Reservas, no fue necesario utilizar especímenes de herbario para verificar su identidad.

### CAPITULO 3

#### RESULTADOS

Al término de esta investigación se analizaron un total de 124 plantas de los siguientes géneros: *Cattleya*, *Masdevallia*, *Maxillarias*, *Oncidium* y *Pleurothallis*. De las plantas analizadas se tomaron las hojas juveniles; además datos de sintomatología, así como presencia ausencia de los dos virus en estudio.

En la tabla 6 se puede observar que en todos los invernaderos se encontró al menos una planta infectada, sin embargo hubo diferencia en el número de plantas infectadas entre los invernaderos así: en el invernadero del Señor Pietro Tossi se encontró un total de 7 plantas infectadas de 12 evaluadas siendo el 58.3 %, al igual que en Mundiflora donde se encontró 6 plantas infectadas de 10 analizadas lo que representa el 60%, mientras que en el invernadero del Ing. Mario Portilla se encontró un individuo infectado de 11 analizados siendo el 9% de las plantas estudiadas.

Tabla 5. Incidencia de CymMV y ORSV en los diferentes invernaderos estudiados.

Viveros Estudiados	Virus		TOTAL
	Si	NO	
Ing. Mario Portilla	1	10	11
Ecuagenera	3	7	10
Universidad Estatal	3	8	11
Sra. Carmen Apolo (Machala)	4	6	10
Jardin Botanico de Guayaquil	4	7	11
Mundiflora	6	4	10
Vilcabamba	5	7	12
UTPL	1	3	4
Sr. Pietro Tosi	7	5	12
Jardin Botanico de Quito	2	8	10
<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>65</b>	<b>101</b>

### 3.1. Sintomatología

De las 124 muestras evaluadas se encontró que 39 plantas presentaban posibles síntomas como manchas necróticas, mosaicos y deformaciones. Los géneros *Cattleya* y *Oncidium* fueron los individuos que presentaron frecuentemente posibles síntomas de etiología viral con 19 y 12 individuos respectivamente como se puede ver en el Fig. 1. Para poder entender los valores exactos de los individuos asintomáticos y sintomáticos ver Tabla 1 (Anexos).

Para ver esta película, debe  
disponer de QuickTime™ y de  
un descompresor .

**Fig.1:** Comparación de los posibles síntomas causados por CymMV y ORSV

En cuanto a la sintomatología se puede decir que: 19 individuos de cuatro géneros presentaron manchas necróticas en las hojas, diez *Cattleya*, tres *Masdevallia*, una *Maxillarias* y cinco *Oncidium*; mosaico en 12 individuos de estos cinco *Cattleya*, dos *Masdevallia*, cuatro *Oncidium* y una *Pleurothallis*, clorosis en 6 individuos en: cuatro *Cattleya*, una *Masdevallia* y un *Oncidium*, deformaciones se encontró en dos individuos del género *Pleurothallis*, como se puede observar en la Fig. 2. En la Tabla 2 (Anexos) se pude apreciar los síntomas más comunes presentados por individuos estudiados y el número de individuos por género.

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor .

**Fig. 2:** Diferencia de la presencia de los diferentes síntomas encontrados.

Al comparar las plantas que presentaron síntomas con las analizadas con la prueba ImmunoStrip que dio positivo, podemos decir que existe una relación del 79,5% entre la sintomatología y presencia de los virus, lo que significa que los 39 individuos que presentaron síntomas, 31 tuvieron la presencia de los virus (Fig. 3).

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor .

**Fig. 3.** Número de Orquídeas sintomáticas con virus

De las 62 plantas que no presentaron sintomatología, al aplicar el Kit ImmunoStrip, 5 dieron resultados positivos a la presencia de estos virus, representando el 8%, lo que es muy importante ya que no siempre una planta con buen aspecto se encuentra libre de la presencia de los virus CymMV y ORSV siendo necesario buscar alternativas que nos indiquen que la planta se encuentra libre de virus. (Graf. 4).

Para ver esta película, debe  
disponer de QuickTime™ y de  
un descompresor .

**Fig. 4:** Número de Orquídeas asintomáticas con virus

Analizando y comparando las tablas 3 y 4 en cuanto a sintomatología de plantas y presencia de virus, se puede señalar que un 79,5% de plantas que presentan síntomas, están contagiadas de Virus, mientras que las plantas que no presentan síntomas solo un 8% presentan los virus, es decir, es una planta donde el suceso de infección es reciente.

### 3.2. Prueba ImmunoStrip.

Al analizar las 23 muestras obtenidas en el Parque Nacional El Cajas, la Reserva Ecológica de Buenaventura y la Estación San Francisco, no se encontró presencia de virus; pero de las 101 muestras de viveros que fueron analizados 36 dieron positivas (Tabla 5).

Tabla 6. Comparación de la presencia de CymMV y ORSV en los viveros y las Reservas Ecológicas

	Virus		Total
	SI	NO	
<b>Viveros</b>	36	65	101
<b>Reservas</b>	0	23	23

La presencia CymMV y ORSV no es igual entre los géneros estudiados, al analizar 21 plantas de *Cattleya*, 19 se encontraban contaminadas, siendo el único género con presencia de virus en todos los invernaderos, mientras que 1 individuo de las 19 *Maxillarias* se encontró infectado.

La incidencia de estos dos virus dentro de los invernaderos no es uniforme; 7 individuos (19,44%) presentaron los dos virus, 6 individuos (16,7%) presentaron ORSV y 23 individuos (63.9%) presentaron CymMV. Tabla 7 (Anexos).

Este resultado puede sugerir que el virus CymMV con 23 individuos infectados es el de mayor incidencia dentro de los viveros estudiados del Ecuador. Tabla 7 (Anexos).

### 3.3 Análisis estadístico.

En el análisis estadístico se utilizó la prueba  $\chi^2$  para determinar si existe diferencia en la frecuencia de los virus CymMV y ORSV entre los lugares estudiados así como determinar si hay diferencia entre los viveros.

Con la prueba  $\chi^2$  comprobamos que las plantas infectadas por los virus CymMV y ORSV solo se encuentran presentes en los viveros y no en las reservas ecológicas aceptando así la hipótesis alternativa con los siguientes resultados:  $\chi^2 = 11.6$ , g.l. = 3,  $p = 0.009$ .

Con relación a los viveros la prueba  $\chi^2$  obtiene un  $\chi^2 = 10.6$ , g.l. = 19,  $p = 0.935$  por lo que se acepta la hipótesis nula, mostrando que no existe una diferencia en el número de plantas infectadas dentro de los viveros, por lo que podemos decir que los virus CymMV y ORSV tienen una amplia distribución en el Ecuador por lo que existe el riesgo que se transforme en una epidemia dentro de los viveros, si no se tiene control, se puede expandir e infectar a las orquídeas en su hábitat natural conllevando así a la extinción de especies.

## DISCUSIONES

El objetivo de esta investigación es de comparar la prevalencia de enfermedades *Cymbidium Mosaic Virus* y *Odontoglossum RingSpot* en orquídeas de cultivo y estado natural en el Ecuador. También, va a investigar si la técnica ImmunoStrip es útil para monitoreos de poblaciones nativas de Orquídeas en cuanto a enfermedades virales.

Nuestros resultados, indican que existe gran incidencia de CymMV en los 10 cultivos y no mucha incidencia de ORSV, pero esto no significa que podamos generalizar diciendo que exista virus en todos los cultivos de orquídeas ecuatorianos, pues hubo una falla en nuestro Diseño experimental ya que 10 muestras en 10 cultivos y en 3 Reservas con un total de 124 muestras, no fueron suficientes como para obtener un resultado representativo, pero esta investigación puede ser una proyección para futuros estudios.

Según los resultados obtenidos en esta investigación la Técnica ImmunoStrip detecto en las muestras analizadas de los diez viveros, que un 39% de las orquídeas analizadas presentaban infección por alguno de los dos virus, de los cuales el CymMV se encontró con más frecuencia sobre la infección por el ORSV (64% y 36% del total de plantas analizadas respectivamente). Esto concuerda con las investigaciones realizadas en Florida, Lousiana y Carolina del Sur (EUA) (Wisler et al., 1982), en la Polinesia Francesa (Wisler et al., 1987), Hawai (Hu et al., 1993) y en Tailandia (Tanaka et al., 1997) en donde, a pesar de que ambos virus se encuentran distribuidos a nivel mundial, el CymMV se encontró con mayor prevalencia que el ORSV. Sin embargo, en estos estudios se encontró también mayor prevalencia de infecciones mixtas de ambos virus que infecciones simples del ORSV, mientras que en esta investigación solamente se encontró siete infecciones mixtas.

Las especies más afectadas por los virus ORSV y CymMV fueron los géneros: *Cattleyas*, *Masdevallias* y *Oncidium*, y en menor incidencia a *Maxillarias* y *Pleurothallis*, algunos presentaron clorosis, mosaicos, cambios de coloración en la hoja, y otras se mostraron sanas, pues en muchas especies son frecuentes las infecciones virales asintomáticas (Zettler et al. 1990). Mackenzie et al. (1998) También comprobaron que algunas plantas infectadas por CymMV y ORSV muestran pocos o ningún síntoma, por lo tanto para llevar un mejor control fitosanitario es importante hacer evaluaciones mediante técnicas de diagnóstico confiables para detectar tempranamente infecciones virales.

El síntoma más característico producido por los virus es la pérdida de vigor. También se producen otros como variaciones de color en las hojas, tales como, mosaicos o rayas, clorosis en o cerca de las venas, clorosis generalizada, manchas anulares, venas necróticas, deformaciones; brotes abultados y malformaciones, reducciones de tamaño y cambios en el color de las flores (Infoagro s.f.). Los virus perturban las funciones normales de las plantas, utilizando los recursos estructurales de éstas, para fabricar más partículas virales. Normalmente los virus no provocan la muerte de las plantas, pero si provocan cambios que reducen su productividad, y en el caso de las orquídeas reducen su valor ornamental. Los virus cuando infectan las plantas causan gran variedad de síntomas, algunos de ellos son característicos; muchos de ellos son similares a los causados por desórdenes nutricionales, daños por insectos, bacterias y hongos.

Entre los síntomas más comunes presentes en plantas infectadas por bacterias es la aparición de lesiones de mancha de aceite que sucesivamente se convierten en manchas oscuras. En las orquídeas adultas la infección se inicia en las hojas y puede alcanzar el fuste. Las áreas infectadas manifiestan exudaciones que son colonias bacterianas. Sobre *Cattleya*, generalmente no es mortal si no se interviene enseguida, la planta será comprometida. Podredumbres de los pseudobulbos los responsables de esta patología son bacterias pertenecientes al género *Erwinia spp.* (Brooks R., 1999).



La mayoría de síntomas más comunes presentes en plantas infectadas por hongos son causadas por las malas condiciones, entre estas: Podredumbre negra de las hojas, de los pseudobulbos y de las raíces, Podredumbres foliar o florales, Presencia en todas las partes aéreas de la planta, de manchas oscuras redondeadas, deprimidas, claramente separadas por la parte sana, Manchas foliar necróticas irregulares, a menudo confluentes hasta formar amplias áreas necróticas (Brooks R., 1999).

Las enfermedades de las orquídeas causadas por insectos y ácaros producen manchas oscuras causado por cochinillas, la orquídea tiende a marchitarse y se presentan pequeñas manchas necróticas causado por pulgones, pequeños puntos descoloridos en las hojas de la orquídea y presencia de una ligera telaraña causado por una araña roja o arañuela (Brooks R., 1999).

Tanto enfermedades bacterianas, enfermedades fungosas y enfermedades causadas por insectos y ácaros pueden claramente ser confundidas con síntomas causadas por virus.

Los medios de transmisión de los virus sobre todo ORSV pueden ser por inoculaciones mecánicas, por injertación, por contacto entre plantas, se transmiten por insectos especialmente por ácaros. Los virus en las plantas causan gran variedad de síntomas, algunos de ellos son característicos pero muchos son similares a los causados por desórdenes nutricionales, daños por insectos, bacterias y hongos. (Infoagro s.f.). La contaminación de las plantas se puede dar también a través de la propagación y sobre todo por las prácticas culturales; *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y el *Odontoglossum ringSpot virus* (ORSV) son virus muy estables y pierden su infectividad muy lentamente. Estos virus se mantienen en plantas secas o en las herramientas.

No se conoce que exista una transmisión por polen o a través de semillas, si una planta es infectada es imposible su cura. El control de las enfermedades virosas es posible si se practica un buen manejo, se evitara que los virus se extiendan de las plantas infectadas a plantas sanas (Knoxfield, Jane M., 1999). Por esta razón los virus no se encuentran en

las Reservas Ecológicas, pues las personas no manipulan en gran medida a las plantas silvestres, y no se aplica ningún régimen de control de plagas y enfermedades pues no lo necesitan.

Es difícil saber cómo se inició la infección viral en el invernadero. Las plantas pudieron haber llegado a éste contaminadas, o bien que se contaminaran por contacto con otras plantas o manejo inadecuado de la colección. También pudo haber ocurrido transmisión debida a áfidos, los cuales son vectores de los *potyvirus* y tienen fácil ingreso al vivero, ya que éste no cuenta con malla antiáfidos. Los áfidos, bien pudieron iniciar la infección o transmitirla de plantas infectadas a plantas sanas dentro del vivero. Debe tomarse en cuenta que otro mecanismo de transmisión de estos virus es la inoculación mecánica, por lo tanto, al haber plantas infectadas en el vivero, cabe la probabilidad de que en el momento de la división de las plantas para transplantarlas o en la corta de la flor, las herramientas utilizadas no se desinfectaran adecuadamente diseminando los virus por medio de la savia de las plantas enfermas.

Por último, la sintomatología presente en las plantas que resultaron negativas para ORSV y CymMV, pudo deberse a la presencia de algún virus que no se haya detectado todavía, déficit nutritivo ó daños fisiológicos. Éstos últimos hacen a las plantas más vulnerables a infecciones de diverso origen, como se observó en muchas de las plantas que además de presentar sintomatología por aparente infección viral, mostraban daños que podían deberse a infección por hongos que no se comprobó. Existen una serie de enfermedades virales presentes en las orquídeas y afectan de cierto modo, haciendo que sean más vulnerables a infecciones de diverso origen. Rivera (1998), menciona que cuando los balances de ciertos factores ambientales y nutricionales se rompen por eventos naturales o la acción del hombre, comienzan a evidenciarse daños de origen biótico y abiótico, provocando la ruptura de la asociación entre la orquídea y otros organismos, quedando está expuesta a enemigos naturales y factores abióticos fuera de control.

Los resultados finales, como ya evidenciamos, muestran que la mayor incidencia virológica se encuentra en *Cattleyas*, *Masdevallias* y *Oncidium*, estos resultados se corroboran con lo que dice Salinger (1991). Entre las flores cortadas más importantes tanto en la producción como en su uso en diversas partes del mundo se encuentran las orquídeas, generalmente los géneros: *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium* y *Paphiopedulium*, aunque las orquídeas “araña” (*Aeres*, *Aerides*, *Oncidium* y *Renanthera*) son exportadas en constante aumento alrededor del mundo. Por lo tanto, si son tan comercializadas, demuestra que son considerablemente más manipuladas a diferencia de otras especies, como en nuestro estudio, las *Maxillarias* y *Pleurothallis*.

Comparando casos en el estado natural y en los viveros no encontramos ningún caso de virus en el estado natural, pero en los invernaderos (donde se produce especies nativas) detectamos que un 39% de las especies está infectado y un 62% no lo está.

Los resultados indican una gran diferencia entre la prevalencia de virus en Invernaderos y en Estado Natural. El hecho de que no se detecto virus en el estado natural es muy positivo, y según el análisis de efectividad de la técnica ImmunoStrip, sabemos que el error es de 8%. Así que hay un riesgo muy bajo de que estos virus estén presentes en Estado Natural.

La diferencia de prevalencia de virus en los diferentes invernaderos puede ser por diferencias del nivel de control que los dueños están haciendo sobre sus cultivos, falta de un buen control fitosanitario, y una necesidad de saber los productos químicos adecuados para evitar la propagación de cada uno de las enfermedades en este caso de CymMV y ORSV.

Podemos decir que existe presencia de CymMV y ORSV en las orquídeas nativas del Ecuador a pesar de que todavía no es trascendental pero existe el riesgo que se transforme en una epidemia dentro de los invernaderos, si no se tiene control, expandir e infectar a las orquídeas en su hábitat natural conllevando así a la extinción de especies.

Pero en caso de que se realice un estudio de virus en Orquídeas en estado natural, y se observe la presencia de estos virus, se podría suponer que fue a causa de una reintroducción de plantas infectadas, manipulación inadecuada, o una extracción incorrecta de la especie, para que exista virus en estado salvaje en Orquídeas Nativas. Muchos cultivadores extraen especies nativas del bosque, para agrandar su colección, sin tomar muchas veces las debidas precauciones.

La conservación de Orquídeas nativas en estado natural es importante, pues se debe evitar que enfermedades infecciosas como hongos, bacterias y virus afecten a estas especies ya que se trata de especies poco tolerantes a dichas enfermedades y se puede dar un declive masivo de especies nativas, en su mayoría son especies endémicas poco tolerantes. Las Orquídeas son especialmente sensibles a los cambios en su entorno: su destino puede anticipar el de otras formas de vida. Si el hombre consiguiera acabar con especies que casi no han experimentado cambios desde hace millones de años, sería una señal inequívoca de que algo no marcha bien (Arce Rodríguez A., 2006). Como ejemplo tenemos el caso de la Quitridiomycosis un hongo mortal que se expande por todo el mundo afectando a todos los anfibios explica Jaime Bosch, investigador del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, que descubrió los primeros casos en Europa. "El remedio ante una enfermedad infecciosa es evitar que se extienda", explica Bosch. (Bosch J. 2007)

ImmunoStrip es una prueba muy reciente para la detección de los Virus ORSV y CymMV, sirve como una prueba de campo es rápida y da resultados en pocos minutos. Existen otras Técnicas utilizadas para Detección de Virus, utilizando técnicas de biología Molecular como por ejemplo PCR y RT-PCR, ELISA y sus varios tipos de ensayos: Directo, Indirecto y sándwich y DAS ELISA. Estas técnicas se las puede utilizar dependiendo de los resultados que se quieran obtener.

Estas técnicas son métodos muy ventajosos en su utilización por diversas razones: la especificidad de la reacción en el reconocimiento del virus puede medirse en presencia de materiales de la planta hospedera u otras impurezas, aunque a veces estos pueden

interferir en las plantas, los resultados pueden obtenerse en pocas horas y minutos comparado a los días que duran los ensayos de infección. (Ortiz Arias Beatriz, 2002).

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Si el ImmunoStrip™ se sumerge por encima de la línea que indican las flechas blancas, ciertos componentes de la “tira” son liberados dentro de la bolsa de muestra y pueden alterar el desempeño de la prueba. En la mayoría de los casos NO se forman las líneas de control.

Si el extracto contiene gran cantidad de tejido el ImmunoStrip™ no podrá absorber apropiadamente la muestra.

Las bolsas de muestreo y los ImmunoStrip deben estar refrigerados, y se obtendrán solo hasta el momento de querer utilizarlas.

Se recomienda hojas jóvenes y buen estado exterior así se encuentren infectadas, pues si cogemos hojas viejas o secas, corremos el riesgo de no poder obtener la cantidad necesaria de tejido y por ende falla la prueba.

En nuestra Investigación hubo un error de Diseño pues el número de muestras antedicho, es bajo y muy poco representativo, así también el número de lugares escogidos, en todo caso este estudio es una base para futuros estudios relacionados con el tema.

En todas y cada una de las pruebas se recomienda desinfectar las manos e instrumentos de manipulación, de esta manera se evita la propagación de los virus.

Para evitar confusiones en las hojas, es necesario etiquetar a cada una inmediatamente después de haberla cogido, y escribir algún código o nombre que la diferencia del resto de hojas, de la misma manera en cada bolsa de muestreo.

En cuanto al monitoreo de orquídeas en estado natural se debe tener las debidas precauciones al momento de su extracción, como por ejemplo evitar poner en contacto a plantas sanas con herramientas contaminadas con virus, o no propagar vectores como las babosas entre otros insectos. En lo Posible lo mas recomendable no extraer Orquídeas Nativas de su hábitat natural.

## BIBLIOGRAFÍA

### REFEREINCIAS BIBLIOGRAFICAS

**ARAUZ, L.** Fitopatología: Un enfoque agroecológico San José, Costa Rica . Editorial de la Universidad de Costa Rica. 1998. p. 467.

**ARCE RODRÍGUEZ A.** Infección de la Orquídeas terrestre *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae) con el potexvirus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) en Costa Rica. Universidad de Costa Rica. Escuela de Biología. San José, Costa Rica. Rev. biol. trop, set. 1999, vol. 47, no.3. 2006. p.281-286. ISSN 0034-7744.

**ARIAS ORTIZ B.** Identificación de tres especies de potyvirus en Orquídeas Nativas. Centro de Investigacion en Biología Celular y Molecular.UNIVERSIDAD DE COSTA RICA. Costa Rica. 2002. p 43-45.

**BARRY. K., J. HU, A. KUEHNLE., N. SUGHII.** Sequence analysis and detection using immunocapture-PCR of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus in hawaiian orchids. J. Phytopathol. E.E.U.U. 1996. p 144: 179-86.

**BRUNT. A., D. SHUKLA, C. WARD.** The Potyviridae. CAB. INTERNATIONAL. Cambridge, E.E U.U. 1994. p516.

**CHRISTIE, R., J. EDWARDSON.** Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Monograph 9 (revised), E.E.U.U. University of Florida. 1994. 165 p.

**CORBETT, M.** Some distinguishing characteristics of orchids strains of Tobacco mosaic virus. *Phytopathology*. E.E.U.U. 1967. 57: 164-72 p.

**CYBULARZ. T., T. KOBYLKO, K. MICZYNSKI.** Cymbidium mosaic virus in the orchid. *Coelogyne lawrenceana* Rolfe. *Folia Hort. Australia*. 1997.9: p53-8 .

**DODSON. C., R. ESCOBAR.** Orquídeas Nativas del Ecuador. Volumen 1. Primera edición. Editorial Colina. Colombia. 2001 pp 11-20.

**ELLIOT. M., F. ZETTLER, M. ZIMMERMAN, O. BARNETT., M. LEGRANDE.** Problems with interpretation of serological assays in a virus survey of orchid species from Puerto Rico, Ecuador and Florida. *Plant Dis*. E.E.U.U.1996. 80: p1160-1164.

**EUN. A. , S. WONG.** Molecular beacons: a new approach to plant virus detection. *Phytopathology*. E.E.U.U. 2000. 90: p 269-75.

**GARCIA. F., J. GARCÍA.** Estructura y expresión del genoma de los virus de plantas. *Patología vegetal*. Tomo I. Sociedad Española de Fitopatología. España. 1996. p695.

**GIBBS. A.; A. MACKENZIE, A. BLANCHFIELD, P. CROSS, C. WILSON, ET AL.** Viruses of orchids in Australia; their identification, biology and control. *The Australian Orchid Rev., Australian*. June/July: 2000. p10-21.

**GERACI. R.** Major viruses affecting orchids. *Am. Orch. Soc. Bull*. E.E.U.U.1996. p65: 836-43.



**HU. J., S. FERREIRA, M. XU, M. LU, M. IHA, E. PHLUM., M. WANG.** Transmission, movement and inactivation of Cymbidium mosaic and Odontoglossum ringspot viruses. Plant Dis. Costa Rica. 1994. p78: 633-636.

**HU. J., S. FERREIRA, M. WANG., M. XU.** Detection of cymbidium mosaic virus, odontoglossum ringspot virus, tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. Plant Dis. Hawaii.1993. p77: 464-468.

**HU. W., S. WONG.** The use of DIG-labelled cRNA probes for the detection of Cymbidium mosaic potexvirus (CymMV) and Odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) in orchids. J. Virol. Meth. 1998. Costa Rica. p70:193-9.

**HSU. H., D. VONGSASITORN., R. LAWSON.** An improved method for serological detection of cymbidium mosaic potexvirus infection in orchids. Phytopathology. E.E.U.U. 1992. p82: 491-495.

**JENSEN. D.** Mosaic or black streak of Cymbidium orchids. Phytopathology. E.E.U.U. 1951. 41: 401

**JENSEN. D., A. GOLD.** Hosts, transmission and electron microscopy of Cymbidium mosaic virus with special reference to Cattleya leaf necrosis. Phytopathology. E.E.U.U. 1955. p45: 327-34.

**KADO. C., D. JENSEN.** Cymbidiummosaic virus in Phalaenopsis. Phytopathology. E.E.U.U.1964. p54: 974-7

**KADO. C.** Viruses, Villains of Orchids Disorders. Am. Orchid Soc. Bull. Costa Rica. Nov.: 1964. p943-948.

**KNOXFIELD., JANE MORAN.** Virus diseases of orchids. Florida E.E.U.U. Nov: 1999. p324-987. .

**LAWSON. R.** Orchid viruses and their control. In Pridgeon A.M. & L.L. Tillman (eds.) Handbook on orchid pests and diseases. American. Orchid Society. West Palm Beach, Florida. E.E.U.U. 1990. p. 66-101.

**LAWSON. R.** Viruses and their control, In Anónimo. Orchids pests and Diseases. American Orchid Society, Palm Beach. E.E.U.U.1995. p. 74-104.

**LAWSON. R., H. HSU.** Orchids, In: Loebenstein, Lawson & Brunt (eds.) Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops. Willey, West Sussex, Inglaterra. 1995. p. 409-420.

**MENDEZ, M., M. DIX, M. PALMIERI.** 42a Reunión de la Sociedad Americana de Fitopatología – División Caribe; 5° Seminario de Manejo Integrado de Plagas en Cultivos no Tradicionales de Exportación. Guatemala. 2002. p67.

**MURAKISHI, H.** Transmission of leaf mosaic associated with color break in the flowers of *Dendrobium superbum*. En: Hu et al. (Eds.). 1995. Purification, host range, serology and partial sequencing of *Dendrobium* mosaic potyvirus, a new member of the Bean common mosaic virus. Costa Rica 1958. p45-46.

**ORTIZ ARIAS BEATRIZ.** Identificación de tres especies de Potyvirus en Orquídeas Nativas (Universidad de Costa Rica).Costa Rica 2002. p25-27.

**PEARSON, M., G. JACKSON, S. PONE, R. HOWITT.** Vanilla viruses in the South Pacific. Plant Pathology. Costa Rica1993. p42: 127-131.

**PORTILLA ANDRADE, NESTOR MARIO.** Implementación de la RT-PCR para el diagnóstico prevención e indexación virosis (CymMV) y (ORSV) en *Cymbidium*. Comparación con la técnica DASA- ELISA. Director : Dr Emmerick Motte., Ph.D. Universidad de Guayaquil. Programa de biotecnología. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Guayaquil- Ecuador. 2009

**QUIÑONEZ.** Identificación de los virus que afectan orquídeas nativas en dos viveros del Central de Costa Rica. Tesis. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. Costa Rica 2000. p65-66.

**RIVERA, G.** Orquídeas. Generalidades y cultivo. Editorial fundación UNA. Heredia, Costa Rica. 1998. p266.

#### REFERENCIAS ELECTRONICAS

**AGDIA. S.F.** Agdia productos del catálogo (en línea). Florida E.E.U.U. Consultado 20 junio. 2009. Disponible en: [http://www.agdia.com/cgi\\_bin/catalog.cgi/46000](http://www.agdia.com/cgi_bin/catalog.cgi/46000)

**BÜCHEN-OSMOND, C (1996).** 'ICTVdB - The Universal Virus Database: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval.' ICTVdB Intkey. Alemania. 1996. [Version: 23th July 1999]. Disponible en Web. <http://life.anu.edu.au/viruses/Wintkey/ictvdbbw.htm>

**BROOKS R., 1999.** Enfermedades de las Orquídeas: Hongos y bacterias. Microplanta. Colombia. 1999. [Ref. 15 de Noviembre de 2009]. Disponible en Web: [www.micoplanta.com/articulos/2009/01/15/enfermedades-de-las-orquideas](http://www.micoplanta.com/articulos/2009/01/15/enfermedades-de-las-orquideas).

**BRUNT. A., K. CRABTREE, M. DALLWITZ, A. GIBBS., L. WATSON., E. ZURCHER.** Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Costa Rica 1996. [Ref. 8 de Octubre de 2009]. Disponible en Web: <http://image.fs.uidaho.edu/viderefs.htm>.

**HIRTZ. A.** ¿Donde están las Orquídeas?. Tierra Incognita. Vol. 31. Quito - Ecuador. Septiembre- Octubre 2004. 15 de noviembre de 2009. Disponible en Web: [www.terraecuador.net/revista 31/31 donde estan las Orquideas.htm](http://www.terraecuador.net/revista%2031/31%20donde%20estan%20las%20Orquideas.htm)

**INFOAGRO. S.F.** Principales virus en plantas ornamentales (en línea). Consultado 14 set. 2002. E.E.U.U. Disponible en:

[http://www.infoagro.com/flores/plantas ornamentales/virusornamentales.htm#4](http://www.infoagro.com/flores/plantas_ornamentales/virusornamentales.htm#4)

**BOSH J.** Influencia del Hongo Quitridium en Ranas Nativas de Costa Rica Acta Hort (ISHS) 164: 45-54. Costa Rica 2007. [Consultado 26 jun. 2009]. Disponible en: [http://www.actahort.org/books/164/164\\_4.htm](http://www.actahort.org/books/164/164_4.htm).

**MAKENZIE, F.,** “Virus: The Invisible Enemy”. E.E.U.U.1998 [Ref. 8 de Sept 2009] Disponible en Web: [http://www.ont.co.za/virus\\_diseases.htm](http://www.ont.co.za/virus_diseases.htm)

**PARQUE NACIONAL CAJAS- ETAPA.** Ficha Informativa de Humedales de Ramsar. Cuenca - Ecuador 2002. [Ref. 30 de Sept. 2009]. Disponible en Web: [www.ceda.org.ec](http://www.ceda.org.ec).

**EL HOY.** El ecosistema del Ecuador en un Jardín. Cuenca – Ecuador. 2009. 15 de Septiembre de 2009. Disponible en Web: [www.hoy.com.ec](http://www.hoy.com.ec).

**JARDÍN BOTÁNICO DE GUAYAQUIL.** Listado de Especies. Guayaquil – Ecuador. 2009. [28 de Agosto de 2009]. Disponible en Web: [www.jardinbotanicoguayaquil.org](http://www.jardinbotanicoguayaquil.org).

**EXPLORED.** En el Bosque de Zamora se estudia la Reforestación. Ecuador. 2 de Octubre de 2009. Disponible en Web: [www.explored.com.ec](http://www.explored.com.ec).

**UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA.** Estudio de procesos de dispersión y colonización de las orquídeas. **Posteado:** 29-10-2008 por dianarivera | Categorías asociadas: Centros de Investigación (CITTES). Loja – Ecuador. 2008 Disponible en Web: [www.utpl.edu.ec](http://www.utpl.edu.ec).



**ANEXO 2 Tablas de datos**

Tabla. 1 Numero de plantas con y sin sintomatología de los diferentes géneros estudiados en invernaderos del Ecuador.

Genero	Síntomas	
	si	no
Cattleya	19	2
Masdevallia	6	20
Maxillarias	1	23
Oncidium	12	15
Pleuratollis	1	25
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>85</b>

Tabla 2. Síntomas más comunes presentados por individuos estudiados y el número de individuos por género

Genero	Manchas Necróticas	Mosaicos	Deformaciones	Clorosis
Cattleya	10	5	0	4
Masdevallia	3	2	0	1
Maxillarias	1	0	0	0
Oncidium	5	4	2	1
Pleurothallis	0	1	0	0
Total	19	12	2	6

Tabla 3. En esta tabla se puede observar una comparación entre el número de individuos que presentaron síntomas con aquellos que la prueba ImmunoStrip dio positivo.

Genero	Síntomas	Kit InmunoStrip Positivo
Cattleya	19	16
Masdevallia	6	6
Maxillarias	1	1
Oncidium	12	9
Pleurothallis	1	4
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>36</b>

Tabla 4. Comparación del número de individuos que no presentaron síntomas con aquellos que al ser expuestos el Kit ImmunoStrip su resultado fue positivo.

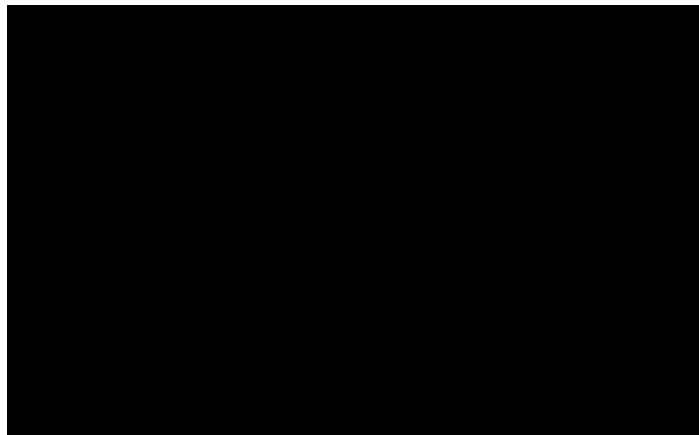


Tabla 7. Descripción por género del número de individuos con los virus CymMV y ORS

Generos	CymMV	ORSV	CymMV/ORSV	Total
Cattleya	13	1	2	16
Masdevallia	2	3	1	6
Maxillaria	1	0	0	1
Oncidium	3	2	4	9
Pleurothallis	4	0	0	4
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>36</b>



Tabla 8. Número total plantas infectas por CymMV y ORSV por invernadero.

<b>Invernadero</b>	<b>CymMV</b>	<b>ORSV</b>	<b>CymMV/ ORSV</b>
Ing. Mario Portilla	1	0	0
Ecuagenera	1	1	1
Universidad Estatal	2	1	0
Sra. Carmen Apolo (Machala)	2	1	1
Jardin Botanico de Guayaquil	4	0	0
Mundiflora	3	1	2
Vilcabamba	3	0	2
Sr. Pietro Tosi	5	2	0
Jardin Botanico de Quito	2	0	0
UTPL	0	0	1
ToTAI	23	6	7

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 9. Resultados Esperados obtenidos de los Resultados Observados tanto de Cultivos como de Invernaderos

OBSERVADO	Virus		TOTAL
	Si	NO	
Viveros	36	65	101
Reservas	0	23	23
	36	88	124
ESPERADO	Virus		TOTAL
	Si	NO	
Viveros	29,323	71,677	101
Reservas	6,677	16,323	23
	36	88	124

Tabla 10. Obtención de  $\text{CHI}^2$  de Cultivos y de Reservas Ecológicas

	O	E	O-E	(O-E) <sup>2</sup>	RESULTADO
si	36	29,323	6,7	44,6	1,5
	0	6,677	-6,7	44,6	6,7
no	65	71,677	-6,7	44,6	0,6
	23	16,323	6,7	44,6	2,7
				x2	11,6

x2 tabla      7,82

O= Observada

E= Esperada

Tabla 11. Valores esperados de los Cultivos de nuestra Investigación

Viveros Estudiados	Virus		TOTAL	VALORES ESPERADOS	
	SI	NO		SI	NO
Ing. Mario Portilla	1	10	11	3,921	7,079
Ecuagenera	3	7	10	3,564	6,436
Universidad Estatal	3	8	11	3,921	7,079
Sra. Carmen Apolo (Mach)	4	6	10	3,564	6,436
Jardín Botánico de Guayaquil	4	7	11	3,921	7,079
Pangui	6	4	10	3,564	6,436
Vilcabamba	5	7	12	4,277	7,723
UTPL	1	3	4	1,426	2,574
Sr. Pietro Tosi	7	5	12	4,277	7,723
Jardín Botánico de Quito	2	8	10	3,564	6,436
Total	36	65	101		

Tabla 12. Obtención de  $\chi^2$  para comprobar si existe o no diferencia en el número de plantas infectadas en cada cultivo de la Investigación

Virus				
observada	esperada	Resta	Potencia 2	Dividido
1	3,921	-2,921	8,53	2,18
3	3,564	-0,564	0,32	0,09
3	3,921	-0,921	0,85	0,22
4	3,564	0,436	0,19	0,05
4	3,921	0,079	0,01	0,00
6	3,564	2,436	5,93	1,66
5	4,277	0,723	0,52	0,12
1	1,426	-0,426	0,18	0,13
7	4,277	2,723	7,41	1,73
2	3,564	-1,564	2,45	0,69
10	7,079	2,921	8,53	1,21
7	6,436	0,564	0,32	0,05
8	7,079	0,921	0,85	0,12
6	6,436	-0,436	0,19	0,03
7	7,079	-0,079	0,01	0,00
4	6,436	-2,436	5,93	0,92
7	7,723	-0,723	0,52	0,07
3	2,574	0,426	0,18	0,07
5	7,723	-2,723	7,41	0,96
8	6,436	1,564	2,45	0,38
			$\chi^2$	<b>10,67</b>

$\chi^2$  tabla 124,342

Fórmula para obtener  $\chi^2$

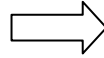
$$\chi^2 = \frac{(\text{observada}-\text{esperada})^2}{\text{Esperada}} + \frac{(\text{observada}-\text{esperada})^2}{\text{Esperada}}$$

ANEXOS 3 DEMOSTRACIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS PARA CymMV  
(*Cymbidium mosaic virus*)

Jardín Botánico de Guayaquil



*Góngora grossa*



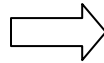
→ Línea de control  
→ CymMV

Tipo de muestra: Hoja

Vivero del Sr. Pietro Tossi



*Oncidium escavatum*



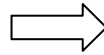
→ Línea de control  
→ CymMV

Tipo de muestra: Hoja

Jardín Botánico de Guayaquil



*Cattleya máxima*



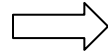
→ Línea de Control  
→ CymMv

Tipo de muestra: Hoja

Jardín Botánico de Quito



*Cattleya máxima*



Linea de Control

CymMv

Tipo de muestra: Hoja

**ANEXOS 4 DEMOSTRACIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS PARA EL VIRUS ORSV (*Odontoglossum RingSpot Viruses*)**

Vivero del Sr. Pietro Tossi



Linea de Control

ORSV

*Odontoglossum hally*

Tipo de muestra: Hoja

Vivero del Sr. Pietro Tossi



Linea de Control

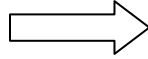
ORSV

*Odontoglossum claviceps*

Tipo de muestra: Hoja

ANEXOS 5 DEMOSTRACIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS PARA  
LOS VIRUS CymMV Y ORSV

Ecuagenera



Línea de control

ORSV

CymMV

Hoja de *Cattleya máxima*



