

Cymbidium mosaic virus and *Odontoglossum ringspot virus* in various genera of cultivated orchids in Mexico

Cymbidium mosaic virus y *Odontoglossum ringspot virus* en diversos géneros de orquídeas cultivadas en México

Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Colegio de Posgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado México, CP 56230, México, Eduardo Alberto Pérez-García, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México 04510, D.F., México, María Guadalupe Carrillo-Benítez, Erika Janet Zamora-Macorra*, Darío Orozco-Cirilo, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5, Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230. *Autor para correspondencia: erikazam@gmail.com

Recibido: 16 de Marzo, 2019.

Aceptado: 01 de Mayo, 2019.

Ochoa-Martínez DL, Pérez-García EA, Carrillo-Benítez MG, Zamora-Macorra EJ and Orozco-Cirilo D. 2019. *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in various genera of cultivated orchids in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 421-431.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1903-1

Primera publicación DOI: 24 de Mayo, 2019.

First DOI publication: May 24, 2019.

Resumen. En el Orquideario de Miguel Ángel Soto Arenas, de la Facultad de Ciencias UNAM, se han detectado plantas con síntomas consistentes en clorosis, variegado, necrosis y mosaico. Varias de estas plantas son especies endémicas de México y a la fecha no existe información sobre su manejo fitosanitario. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue conocer a los virus asociados a estos síntomas mediante pruebas de ELISA, RT-PCR, plantas diferenciales y análisis filogenéticos. Se detectó al *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) y al

Abstract. In the Miguel Ángel Soto Arenas Orchid, of the UNAM Faculty of Sciences, plants with symptoms consisting of chlorosis, variegated, necrosis and mosaic have been detected. Several of these plants are endemic species of Mexico, and there is no information on their phytosanitary management. Therefore, the objective of the present study was to know the causal agent or agents of these symptoms through ELISA tests, RT-PCR, differential plants and phylogenetic analyzes. *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) and *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) were detected in 89% of the sampled plants with symptoms. Differential plants (*Nicotiana tabacum* var. xhanti, *N. glutinosa*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* and *Datura stramonium*) shown local lesions after six days of the mechanical inoculation in both viruses; And only using CymMV, *N. benthamiana* was systemically infected. The phylogenetic analyses showed that these viruses were grouped with isolates from Asian countries suggesting that the infection probably originated

Cymbidium mosaic virus (CymMV) en el 89% de las plantas con síntomas muestradas. Las plantas diferenciales *Nicotiana tabacum* var. *xhanti*, *N. glutinosa*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranthicolor* y *Datura stramonium* inoculadas mecánicamente con tejido foliar positivo a ambos virus mostraron lesiones locales seis días después de la inoculación y sólo CymMV infectó sistémicamente a *N. benthamiana*. El análisis filogenético mostró que estos virus se agruparon con aislamientos de países asiáticos lo que sugiere que la infección se originó probablemente por el intercambio de material vegetal entre productores. Este es el primer reporte del CymMV y ORSV infectando a *Barkeria*, *Lycaste*, *Rossioglossum*, *Masdevallia*, *Leochilus*, *Stanhopea*, *Maxillaria*, *Epidendrum* sec. *Oerstedella*, *Dendrobium*, *Sobralia* y *Cuitlauzina* en México.

Palabras clave: *Barkeria*, *Lycaste*, *Dendrobium*, tobamovirus, potexvirus.

Las orquídeas conforman una de las familias más diversas que existen, con un número estimado entre 25 y 30 mil especies silvestres y varios miles de híbridos tanto naturales como artificiales (Dressler, 1981; Beutelspacher, 2012). En México se conocen alrededor de 1260 especies de la familia Orchidaceae (Hágsater *et al.*, 2005) y se estima que alrededor del 40% son endémicas. Las enfermedades producidas por virus ocupan el segundo lugar de los problemas fitosanitarios (Arauz, 1998) y ya que las orquídeas son plantas herbáceas longevas las hace más propensas a infecciones virales. Dado que las orquídeas pueden alcanzar altos precios y en ocasiones ser ejemplares muy raros, hace que aun plantas infectadas por virus no sean eliminadas y con ello se incrementa el riesgo de contagio a las demás. Actualmente se han registrado por lo menos 30 especies de virus que infectan orquídeas,

from the exchange of plant material between producers. This is the first report of CymMV and ORSV infecting *Barkeria*, *Lycaste*, *Rossioglossum*, *Masdevallia*, *Leochilus*, *Stanhopea*, *Maxillaria*, *Epidendrum* sec. *Oerstedella*, *Dendrobium*, *Sobralia* and *Cuitlauzina* in Mexico.

Key words: *Barkeria*, *Lycaste*, *Dendrobium*, tobamovirus, potexvirus.

Orchids are one of the most diverse families, with an estimated 25 to 30 thousand species, and several thousands of hybrids, both natural and artificial (Dressler, 1981; Beutelspacher, 2012). In Mexico there are around 1260 known species of the family Orchidaceae (Hágsater *et al.*, 2005) and around 40% are endemic. Diseases caused by viruses are in the second place in terms of phytosanitary problems (Arauz, 1998), and since orchids are long-lived herbaceous plants, this makes them more vulnerable to viral infections. Since orchids can be costly, and occasionally rare specimens, which leads to, even plants infected by viruses not being discarded, increasing the risk of infection to the others. Currently, at least 30 viruses species have been known and recorded to infect orchids, some of which can be transmitted by vectors such as the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Lawson, 2002), but the most common ones, transmitted mechanically and via propagative material, are the *Cymbidium ringspot virus* (Tombusvirus), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) and *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) (Freitas-Astúa, 2003). CymMV and ORSV are the most economically important, since they reduce growth and flowering (Lawson, 2002) and in greenhouses in Mexico, they have been reported as infecting some genera (López-Hernández *et al.*, 2014). Nowadays, in the Miguel Ángel Soto Arenas

algunos de estos se pueden transmitir por vectores como el *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Lawson, 2002), pero los más comunes, transmitidos mecánicamente y por material propagativo, son *Cymbidium ringspot virus* (Tombusvirus), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) y *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) (Freitas-Astúa, 2003). El CymMV y ORSV son los de mayor importancia económica ya que reducen el crecimiento y floración (Lawson, 2002) y en México se han reportado en invernaderos comerciales infectando algunos géneros (López-Hernández *et al.*, 2014). Actualmente, en el Orquideario de Miguel Ángel Soto Arenas (Orquideario MAS), de la Facultad de Ciencias UNAM, se han observado plantas de diversos géneros de orquídeas con síntomas característicos de infecciones virales. Muchas de estas plantas tienen valor histórico, hortícola, científico o biológico, y por lo tanto no pueden ser sacrificadas, pero tienen que ser diagnosticadas para su manejo adecuado. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el o los virus asociados a estos síntomas mediante pruebas de ELISA, RT-PCR y plantas diferenciales, describirlos en los géneros de orquídeas que no han sido reportados como hospedantes en México y, mediante un análisis filogenético, determinar si la infección procede de géneros nativos.

Del 22 al 24 de abril de 2018, en el Orquideario MAS se realizó una colecta dirigida de tejido vegetal (hojas, raíces y flores) de plantas con síntomas de variegado, clorosis y manchas necróticas foliares; dichas plantas se marcaron y fotografiaron. En total se recolectaron 47 muestras de distintas plantas. Las muestras se etiquetaron y transportaron en una hielera al laboratorio de virus del Colegio de Postgraduados para procesadas. De estas se seleccionaron 12 provenientes de las plantas con síntomas más evidentes y se procedió a realizar la extracción de RNA total con CTAB (Sambrook y Rusell, 2001) a partir de 100 mg de tejido vegetal.

(MAS) orchidarium, in the School of Science of the UNAM, plants of diverse orchid genera have been observed to present characteristic symptoms of viral infections. Many of these plants have historic, horticultural, scientific or biological value, and therefore cannot be sacrificed, but they must rather be diagnosed for their adequate handling. Therefore, the aim of this study was to determine the virus or viruses related to these symptoms via ELISA, RT-PCR and differential plants test, to describe them in the genera of orchids that have not been reported as hosts in Mexico, and using a phylogenetic analysis, determine if the infection comes from native genera.

Between April 22 and 24 of 2018, in the MAS orchidarium, samples were taken of tissues (leaves, roots and flowers) from plants with symptoms of variegation, chlorosis and foliar necrotic spots; these plants were marked and photographed. A total of 47 samples were taken from different plants. The samples were labeled and transported in a cooler to the virus lab of the Colegio de Postgraduados for processing. Out of these, we chose 12, which came from plants with more evident symptoms, and the extraction of total RNA was carried out, using CTAB (Sambrook and Rusell, 2001) starting at 100 mg of plant tissue. The integrity of the extractions was verified by electrophoresis and the concentration was quantified using the Nanodrop®. The retrotranscriptions were carried out using general primers to detect some of the most common phytopathogenic genera of viruses. For *Potexvirus* we used primers Potex1RC, Potex5 and Potex2RC described by Van der Vlugt and Berendesen (2002); for *Tospovirus*, primers BR60 and BR65 described by Eiras *et al.* (2001); for *Potyvirus*, primers NIB2F and NIB3R described by Zheng *et al.* (2010); and for *Tomabovirus*, primers TobRTup1 and TobRTdo2 described by Dovas *et al.* (2004). The general conditions for amplification were

La integridad de las extracciones se corroboró mediante electroforesis y la concentración se cuantificó en el Nanodrop®. Se realizaron las retrotranscripciones con cebadores generales para detectar algunos de los géneros de virus fitopatógenos más comunes. Para *Potexvirus* se utilizaron los cebadores Potex1RC, Potex5 y Potex2RC descritos por Van der Vlugt y Berendesen (2002), para *Tospovirus* los cebadores BR60 y BR65 descritos por Eiras *et al.* (2001), para *Potyvirus* los cebadores Nib2F y Nib3R descritos por Zheng *et al.* (2010) y para *Tomabovirus* se utilizaron los cebadores TobRTup1 y TobRTdo2 descritos por Dovas *et al.* (2004). Se siguieron las condiciones generales de amplificación y la concentración de reactivos recomendado por cada descriptor de los cebadores generales. Los productos esperados de PCR se purificaron con el kit comercial Wizard® y se secuenciaron en MacroGen. Las secuencias se editaron con el programa BioEdit® y se compararon con las reportadas en el GenBank. Las secuencias consenso se registraron en el GenBank y con estas se realizó el análisis filogenético con el método de máxima verosimilitud (ML) basado en el modelo de Kimura-2 parámetros, con distribución Gamma discreta con 5 categorías, utilizando el software libre MEGA7. Para la comparación, se eligieron diferentes secuencias del CymMV y ORSV procedentes de Costa Rica, Taiwán, Japón, Francia, Corea y Nueva Zelanda, disponibles en la base de datos del NCBI.

La ELISA se hizo con anticuerpos policlonales específicos, positivos y negativos de ORSV y CymMV (Agdia®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se maceraron 300 mg de tejido vegetal en 3 mL de buffer de extracción. Cada una de las 47 muestras se analizó por duplicado para asegurar la confiabilidad del diagnóstico. Se obtuvo la densidad óptica a 405 nm (OD405) de las muestras en un lector de placas de ELISA. Para el análisis mediante plantas indicadoras, tejido vegetal positivo a CymMV y ORSV se maceró por separado en tampón

followed, along with the concentration of reactants recommended for each descriptor of the general primers. The products expected from the PCR were purified using the Wizard® commercial kit, and were sequenced in MacroGen. The sequences were edited using the program BioEdit® and compared with those reported in the GenBank. The consensus sequences were recorded in the GenBank and used to carry out the phylogenetic analyses using the maximum likelihood method (ML), based on the Kimura-2 parameter model, with a discreet Gamma distribution with 5 categories, using the free software MEGA7. For the comparison, we chose different sequences of the CymMV and ORSV from Costa Rica, Taiwan, Japan, France, Korea and New Zealand, available in the NCBI database.

The ELISA was performed using specific positive and negative ORSV and CymMV polyclonal antibodies (Agdia®) following instructions from the manufacturer. We macerated 300 mg of plant tissue in 3 mL of extraction buffer. Each one of the 47 samples was analyzed in duplicates in order to ensure the reliability of the diagnosis. The optical density for the samples was obtained at 405 nm (OD405) in an ELISA slide reader. For the analysis with indicator plants, plant tissue positive to CymMV and ORSV was macerated individually in phosphate buffered saline, in order to mechanically inoculate *Nicotiana tabacum* var. xhanti, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. benthamiana*, *N. occidentalis*, *N. virginiana*, *N. rustica*, *Chenopodium quinoa.*, *C. amaranthicolor* and *Datura stramonium* plants. A total of three plants were inoculated for each species per virus, and as a control, a plant from each species was rubbed with water.

During the tour in the MAS orchidarium, plants were found with slight mosaic, with purple spots, or with generalized chlorosis, along with necrotic spots (Figure 1). Only in a few species of the genus *Barkeria* was found also variegated flowers.

de fosfatos para inocular mecánicamente plantas de *Nicotiana tabacum* var. xhanti, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. benthamiana*, *N. occidentalis*, *N. virginiana*, *N. rustica*, *Chenopodium quinoa*., *C. amaranthicolor* y *Datura stramonium*. Se inoculoron en total tres plantas de cada especie por virus y, como testigo, se tuvo una planta de cada especie frotada con agua.

Durante el recorrido en el Orquideario MAS se encontraron plantas con un ligero mosaico, con coloración moteada púrpura, o con clorosis generalizada, acompañada de manchas necróticas (Figura 1). Solo en pocas especies del género *Barkeria* se observó además variegado en flores.

Estos síntomas corresponden a los reportados por virus en orquídeas (mosaico, anillos cloróticos, deformación, variegado y manchas necróticas) (Albouy y Devergne, 2000; López-Hernández *et al.* 2014), pero la expresión de estos es muy variable y su severidad dependerá del aislamiento del virus, el hospedante y las condiciones ambientales (Agrios, 2005). Generalmente una alta temperatura y luminosidad prevaleciente en los invernaderos favorecen la multiplicación de los virus y la mezcla de infección por CymMV y ORSV incrementará la severidad (Yamane *et al.*, 2008). En plantas positivas a ORSV no se observaron anillos cloróticos, pero se sabe que la aparición de éstos depende del tiempo que tengan las plantas con la infección y de las condiciones ambientales (Yamane *et al.*, 2008).

De las retrotranscripciones se obtuvieron amplicones del fragmento esperado con los cebadores para Potexvirus (584 pb) y Tobamovirus (568 pb). Los análisis para Tospovirus y Potyvirus fueron negativos y solo se amplificaron las muestras control (RNA de planta infectada con TSWV y RNA de planta infectada con *Papaya ringspot virus*) (imágenes no mostradas). La secuenciación demostró que el amplicón de 568 pb tuvo una similitud del 99% con *Odontoglossum ringspot virus*

These symptoms match those reported for viruses in orchids (mosaic, chlorotic rings, deformities, variegated and necrotic spots) (Albouy and Devergne, 2000; López-Hernández *et al.* 2014), although their expression is highly variable and their severity will depend on the isolation of the virus, the host and the environmental conditions (Agrios, 2005). High temperatures and luminosity, prevalent in the greenhouses, generally favor the multiplication of the viruses and the mixture of infection by CymMV and ORSV will increase the severity (Yamane *et al.*, 2008). In plants positive for ORSV, no chlorotic rings were observed, although it is known that their appearance depends on how long the plants have been infected for, as well as on the environmental conditions (Yamane *et al.*, 2008).

From the retrotranscriptions, amplicons were obtained from the expected fragment with the primers for *Potexvirus* (584 pb) and *Tobamovirus* (568 pb). The analyses for *Tospovirus* and *Potyvirus* were negative, and only the control samples were amplified (RNA of plants infected with TSWV and RNA of plants infected with the *Papaya ringspot virus*) (images not shown). The sequencing showed that the 568 pb amplicon had a similarity of 99% with *Odontoglossum ringspot virus* (KF85954.1), and it was found in eight of the 12 samples analyzed (Figure 2, left). The sequencing of the 584 pb fragment had a similarity of 98% with the *Cymbidium mosaic virus* (AJ270986.1) and it was found in only two samples (Figure 2, right).

The consensus sequence, isolation M48 (access number MK908224), from CymMV was grouped with a CymMV isolation from the Netherlands (AJ270986.1); it was separated from isolations from Costa Rica, France and Hawaii, and it was related with the isolations from Japan and Korea (Figure 3, right). Two consensus sequences of isolations M10 and M4 (access numbers MK902741 and



Figura 1. Síntomas observados durante el muestreo. Variegado en flores y coloración púrpura en *Barkeria scandens* (A) y *Barkeria whartoniiana* (B). Mosaico y lesiones necróticas en *Cattleya lobata* (C). Clorosis en *Dendrobium* híbrido tipo nobile (D). Lesiones necróticas coalescentes en *Sobralia macrantha* (E). Coloración púrpura en *Leochilus crocodiliceps* (F), Clorosis en *Masdevalia floribunda* (G). Bandeado clorótico y manchas necróticas en *Rossioglossum* Random Chester (H), Manchas necróticas en *Epidendrum jamiesonis* (I), Manchas necróticas en *Oesrtebella* sec. *Epidendrum macdougallii* (J). Mosaico en *Guarianthe* × *guatemalensis* (K). Bandeado clorótico y manchas necróticas *Lycaste virginalis* (L).

Figure 1. Symptoms observed during the sampling. Variegated flowers and a purple color in *Barkeria scandens* (A) and *Barkeria whartoniiana* (B). Mosaic and necrotic lesions in *Cattleya lobata* (C). Chlorosis in *Dendrobium* nobile-type hybrid (D). Necrotic lesions coalescent in *Sobralia macrantha* (E). Purple coloring in *Leochilus crocodiliceps* (F), Chlorosis in *Masdevalia floribunda* (G). Chlorotic Stripes and necrotic stains in *Rossioglossum* Random Chester (H), Necrotic spots in *Epidendrum jamiesonis* (I), Necrotic spots in *Oesrtebella* sec. *Epidendrum macdougallii* (J). Mosaic in *Guarianthe* × *guatemalensis* (K). Chlorotic stripes and necrotic spots *Lycaste virginalis* (L).

(KF85954.1), y se detectó en ocho de las 12 muestras analizadas (Figura 2, izquierda). La secuenciación del fragmento de 584 pb tuvo una similitud del 98% con *Cymbidium mosaic virus* (AJ270986.1) y se detectó en solo dos muestras (Figura 2, derecha).

La secuencia consenso, aislado M48 (número de acceso: MK908224), de CymMV se agrupó con un aislamiento de CymMV de Holanda (AJ270986.1), se separó de los aislados de Costa Rica, Francia y Hawaii, y se relacionó con los aislamientos de Japón y Corea (Figura 3 derecha). Dos secuencias

MK902742) from ORSV were grouped with ORSV isolations from Korea and Taiwan (Figure 3, left). To date there are no cases of natural infections from viruses in wild orchids, and therefore the origin of these viruses is uncertain (Kull *et al.*, 2009). The group of isolations of CymMV and ORSV of this study with those reported in Korea, Japan and Taiwan, and far from those found in Costa Rica, suggests that the infection Could be due to the exchange between common plant material in orchid tourism (Pickering and Ballantyne, 2013),

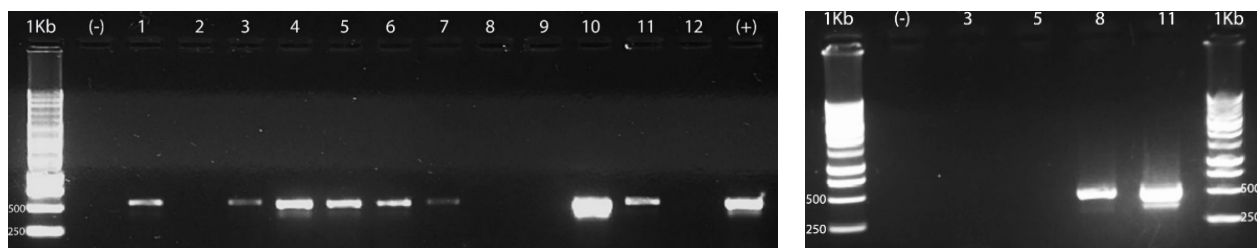


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de RT-PCR para detectar en plantas al *Odontoglossum ringspot virus* (izquierda) y al *Cymbidium mosaic virus* (derecha). 1 *Barkeria whartonianiana*, 2 *Lycaste* híbrido, 3 *B. skinneri*, 4 *B. scandens*, 5 *Bardendrum tanzanita*, 6 *Laelia anceps*, 7 *Laelia lobata*, 8 *Lycaste virginalis*, 9 *Masdevallia barlaeana*, 10 *Laelia anceps* Mendehell, 11 *Sobralia macrantha*, 12 *Encyclia* spp. 1Kb: marcador molecular de 1 kilobase; (-): agua libre de nucleasas. (+): planta infectada con *Tobacco mosaic virus*.

Figure 2. Electrophoresis in 1% agarose gel of products of RT-PCR to detect the *Odontoglossum ringspot virus* (left) and al *Cymbidium mosaic virus* (right) in plants. 1 *Barkeria whartonianiana*, 2 *Lycaste* híbrido, 3 *B. skinneri*, 4 *B. scandens*, 5 *Bardendrum tanzanita*, 6 *Laelia anceps*, 7 *Laelia lobata*, 8 *Lycaste virginalis*, 9 *Masdevallia barlaeana*, 10 *Laelia anceps* Mendehell, 11 *Sobralia macrantha*, 12 *Encyclia* spp. 1Kb: molecular marker of 1 kilobase; (-): water, free of nucleasas. (+): plant infected with the *Tobacco mosaic virus*.

consenso de los aislamientos M10 y M4 (números de acceso: MK902741 y MK902742) de ORSV se agruparon con aislamientos de ORSV procedentes de Corea y Taiwán (Figura 3 izquierda). Hasta la fecha no se conocen casos de infecciones naturales de virus en orquídeas silvestres, por lo que el origen de estos virus es incierto (Kull *et al.*, 2009). El agrupamiento de los aislamientos de CymMV y ORSV del presente estudio con aquellos reportados en Corea, Japón y Taiwán y alejados de los encontrados en Costa Rica, sugiere que la infección pudo deberse al intercambio entre material vegetal común en el turismo de orquídeas (Pickering y Ballantyne, 2013) y no a la existencia de estos virus en los ecosistemas mexicanos.

Mediante el análisis por DAS-ELISA, se detectó en 29 plantas al ORSV, en cuatro sólo a CymMV, en nueve se encontraron ambos virus y en cinco no se detectaron estos virus (Cuadro 1). En México el ORSV no se había detectado hasta el momento en especies de los géneros *Barkeria*, *Lycaste*, *Rossioglossum*, *Masdevallia*, *Leochilus*, *Stanhopea*, *Maxillaria* y *Oerstedella* (*Epidendrum*); y el CymMV en los géneros *Dendrobium*, *Sobralia* y

and not to the existence of these viruses in Mexican ecosystems.

With an analysis using DAS-ELISA, ORSV was found in 29 plants, CymMV in only four, both viruses were found in nine, and no virus was found in five (Table 1). In Mexico, ORSV had not been found until now in species of the genera *Barkeria*, *Lycaste*, *Rossioglossum*, *Masdevallia*, *Leochilus*, *Stanhopea*, *Maxillaria* and *Oerstedella* (*Epidendrum*); and CymMV in genera *Dendrobium*, *Sobralia* and *Cuitlauzina*. A greater incidence of ORSV was found than for CymMV in sampled plants, and despite all samples coming from plants with symptoms, some were negative, possibly due to the viral concentration of the sample taken was not high enough for any of the viruses to be found by ELISA. In general, CymMV is more stable than ORSV, and it is more prevalent (Khentry *et al.*, 2006); however, similar investigations with *Phalaenopsis* also found a higher proportion of ORSV than of CymMV (Yamane *et al.*, 2008). This can be explained by the origin of the plants, since it is known that the CymMV is not transmitted by seeds, unlike the ORSV (Pradhan *et al.*, 2016); but,

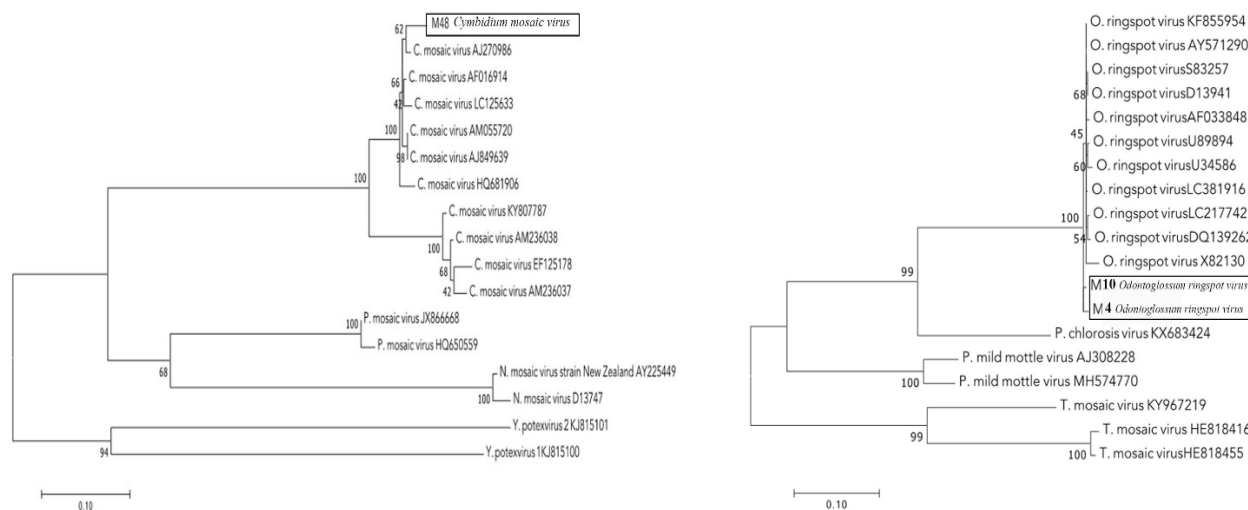


Figura 3. Representaciones de las relaciones filogenéticas entre las secuencias de los fragmentos obtenidos con los iniciadores Potex5/Potex2cr para *Cymbidium mosaic virus* (derecha), y Tob Rtup1/TobRTdo2 para *Odontoglossum ringspot virus* (izquierda), usando el método molecular ML (Maximum Likelihood), basado en el modelo Kimura 2-parámetros y un bootstrap de 1000.

Figure 3. Representations of the phylogenetic relationships between the sequences of the fragments obtained with primers Potex5/Potex2cr para *Cymbidium mosaic virus* (right), and Tob Rtup1/TobRTdo2 for *Odontoglossum ringspot virus* (left), using the ML (Maximum Likelihood) molecular method, base on Kimura 2-parameters model and a 1000 bootstrap.

Cuitlauzina. Se encontró una mayor incidencia del ORSV que del CymMV en las plantas muestreadas, y a pesar de que todas las muestras provenían de plantas con síntomas, algunas fueron negativas; esto pudo deberse a que la concentración viral de la muestra tomada no fue lo suficientemente alta para que alguno de los virus se detectara por ELISA. En general se dice que el CymMV es más estable que ORSV y es el de mayor prevalencia (Khentry *et al.*, 2006), pero en investigaciones similares con *Phalaenopsis* también detectaron en mayor proporción al ORSV que al CymMV (Yamane *et al.*, 2008). Esto puede explicarse por la procedencia de las plantas ya que se sabe que el CymMV no se transmite por semilla a diferencia del ORSV (Pradhan *et al.*, 2016); pero se desconoce si las plantas muestreadas en la presente investigación fueron generadas o no a partir de semilla.

whether the plants sampled in this investigation were generated from seeds or not, is unknown.

Local necrotic lesions were observed in *Nicotiana tabacum* var. xhanti and local chlorotic lesions in *N. glutinosa*, *C. quinoa*, *C. amaranthicolor* and *Datura stramonium* six days after inoculation (dai) with both viruses (Figure 4A-C). In *Datura stramonium* and *N. occidentalis* leaves inoculated with positive plant material only for CymMV, chlorotic rings were observed, whereas in *N. benthamiana*, it caused consistent systemic infection in leaf deformation and necrosis of nervations (Figure 4D-F). No symptoms were observed in control plants.

The most widely used indicator plants to diagnose CymMV are *N. benthamiana*, *Cucumis sativus*, *D. stramonium*, *Gomphrena globosa* and *C. amarticolor* (Brunt *et al.*, 1996), and based

Cuadro 1. Detección de *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) mediante ELISA, en orquídeas cultivadas en México.**Table 1. Detection of *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) by ELISA, in orchids cultivated in Mexico.**

Especie ^a	CymMV	ORSV
<i>Encyclia adenocaula</i> , <i>Laelia dawsonii</i> , <i>Laelia albida</i> (2), <i>Laelia gouldiana</i> y <i>Trichopilia tortilis</i> .	-	-
<i>Cattleya</i> × <i>Beatriz</i> , <i>Cuitlauzina pendula</i> , <i>Cymbidium</i> híbrido (1), <i>Dendrobium</i> híbrido tipo nobile, <i>Guarianthe</i> × <i>guatemalensis</i> , <i>Laelia autumnalis</i> , <i>Masdevallia</i> híbrida, <i>Sobralia macrantha</i> (1) y <i>Sobralia macrantha</i> (2).	+	+
<i>Epidendrum jamiesonis</i> , <i>Epidendrum radicans</i> , <i>Laelia furfuracea</i> var. <i>alba</i> y <i>Lycaste virginalis</i> (2).	+	-
<i>Bardendrum tanzanita</i> , <i>Barkeria scandens</i> , <i>Barkeria skinneri</i> , <i>Barkeria whartonia</i> , <i>Cattleya lobata</i> var. <i>concolor</i> , <i>Cymbidium</i> híbrido (2), <i>Encyclia cordigera</i> (1), <i>Encyclia cordigera</i> (2), <i>Encyclia fucata</i> , <i>Encyclia garciae-esquivelii</i> , <i>Epidendrum macdougallii</i> , <i>Epidendrum magnificum</i> Schltr., <i>Laelia albida</i> (1), <i>Laelia anceps</i> var. <i>Mendelhall</i> , <i>Leochilus crocodiliceps</i> , <i>Lycaste</i> híbrido, <i>Lycaste virginalis</i> (1), <i>Masdevallia barlaeana</i> , <i>Masdevallia floribunda</i> ., <i>Maxillaria molitor</i> , <i>Odontocidium</i> híbrido no identificado, <i>Oncidium oliganthum</i> , <i>Oncidium reichenheimii</i> , <i>Oncidium tigrinum</i> × <i>Odontocidium</i> , <i>Rhynchostele bictoniensis</i> × <i>Oncidium alexandrae</i> , <i>Rossioglossum</i> (1), <i>Rossioglossum</i> (2), <i>Stanhopea tigrina</i> y <i>Vanilla planifolia</i> .	-	+

^a Las especies con resultados similares fueron agrupadas / Species with similar results were grouped.

+ Muestras positivas; - muestras negativas. Se consideraron como positivas si los valores de DO eran iguales o mayores a tres veces el promedio de los valores del control negativo / Positive samples; - negative samples. Samples were considered positive if the values for DO were equal to, or greater than, three times the average of the values of the negative control.

Lugar y Fecha de recolecta: Orquideario de Miguel Ángel Soto Arenas, de la Facultad de Ciencias UNAM. Del 22-24 de abril de 2018 / Place and date of collection: Orchuidarium Miguel Ángel Soto Arenas, of the UNAM School of Science. April 22-24, 2018.

En las plantas indicadoras se observaron lesiones locales necróticas en *Nicotiana tabacum* var. *xhanti* y lesiones locales cloróticas en *N. glutinosa*, *C. quinoa*, *C. amaranticolor* y *Datura stramonium* seis días después de la inoculación (ddi) con ambos virus (Figura 4A-C). En hojas de *Datura stramonium* y *N. occidentalis* inoculadas con material vegetal positivo solo para CymMV se observaron anillos cloróticos mientras que en *N. benthamiana* ocasionó infección sistémica consistente en deformación de hojas y necrosis de nervaduras (Figura 4D-F). En las plantas testigo no se observaron síntomas.

Las plantas indicadoras más usadas para diagnosticar al CymMV son *N. benthamiana*, *Cucumis sativus*, *D. stramonium*, *Gomphrena globosa*

on the results of this study, it is also possible to use *N. glutinosa* and *N. occidentalis*. It has been corroborated that *C. quinoa* and *C. amaranticolor* are better hosts for ORSV and *Datura stramonium* for CymMV, although there is no selectivity (Cánovas *et al.*, 2016). However, this investigation found differences in the symptoms caused by CymMV and ORSV in *D. stramonium*, since the first caused smaller chlorotic lesions. The isolation of CymMV caused a systemic infection in *N. benthamiana* and it is known that there are isolations of this viruses capable of systemically infecting this plant, or not (Hsiang-Chia *et al.*, 2009).

This investigation reports, for the first time in Mexico, the presence of ORSV and CymMV in diverse genera of orchids with Mesoamerican

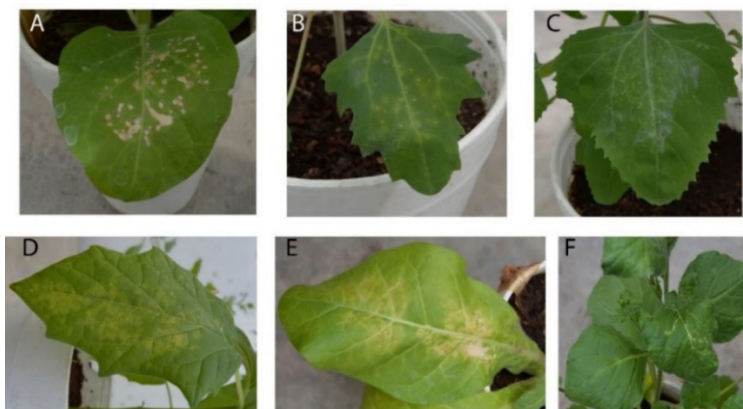


Figura 4. Plantas inoculadas con ORSV a los 6 días después de la inoculación (ddi): lesiones locales necróticas en *N. tabacum* var. xhanti (A); lesiones locales cloróticas en *C. quinoa* (B) y *C. amaranticolor* (C). Plantas inoculadas con CymMV a los 17 ddi: anillos cloróticos en *D. stramonium* (D) y *N. occidentalis* (E), infección sistémica en *N. benthamiana* (F).

Figure 4. Plants inoculated with ORSV 6 days after inoculation (dai): local necrotic lesions in *N. tabacum* var. xhanti (A); local chlorotic lesions in *C. quinoa* (B) and *C. amaranticolor* (C). Plants inoculated with CymMV 17 dai: chlorotic rings in *D. stramonium* (D) and *N. occidentalis* (E), systemic infection in *N. benthamiana* (F).

y *C. amaranticolor* (Brunt *et al.*, 1996) y, con base en los resultados del presente estudio, es posible utilizar también a *N. glutinosa* y *N. occidentalis*. Se ha corroborado que *C. quinoa* y *C. amaranticolor* son mejores hospedantes para ORSV y *Datura stramonium* para CymMV, aunque no hay selectividad (Cánovas *et al.*, 2016); sin embargo, en esta investigación se observó diferencia en los síntomas ocasionados por CymMV y ORSV en *D. stramonium*, ya que el primero provocó lesiones cloróticas anilladas mientras que el segundo ocasionó lesiones cloróticas de menor tamaño. El aislamiento de CymMV ocasionó infección sistémica en *N. benthamiana* y se sabe que existen aislamientos de este virus que son capaces de infectar o no sistémicamente a esta planta (Hsiang-Chia *et al.*, 2009).

En este trabajo se reporta por primera vez en México la presencia de ORSV y CymMV en diversos géneros de orquídeas con especies mesoamericanas. Algunas especies están amenazadas según la NOM-ECOL-059-2010, como *Barkeria scandens*,

species. Some species are under threat, according to the NOM-ECOL-059-2010, such as *Barkeria scandens*, *B. skinneri*, *B. whartonianiana*, *C. pendula*, *E. adenocaula*, *L. dawsonii*, *L. gouldiana*, *L. virginalis* (= *L. skinneri*), *S. tigrina* and *V. planifolia*; and others are rare species, or under a high rate of illegal picking, and may soon be included in list of species in extinction, such as *B. spectabilis*, *E. magnificum*, *L. autumnalis*, *L. furfuracea*, *O. reicheinheimii*, *O. Oliganthum*, among others (Damon, 2017).

Thanks to S. in M. Patricia Olguín and undergraduate student Cekouat León for their assistance in the maintenance of the orchid collection. To the DGAPA UNAM for the funding (PAPIIT IN227319).

~~~~~ End of the English version ~~~~~

*B. skinneri*, *B. whartonianana*, *C. pendula*, *E. adeno-caula*, *L. dawsonii*, *L. gouldiana*, *L. virginialis* (= *L. skinneri*), *S. tigrina* y *V. planifolia*; y otras son especies raras o que están sujetas a una alta tasa de recolecta ilegal, y pronto pueden figurar en las listas de especies en riesgo de extinción, como *B. spectabilis*, *E. magnificum*, *L. autumnalis*, *L. furfuracea*, *O. reicheinheimii*, *O. Oliganthum*, entre otras (Damon, 2017).

Se agradece a la M. en C. Patricia Olguín y al estudiante de licenciatura Cekouat León por su asistencia en el mantenimiento de la colección de orquídeas. A la DGAPA UNAM por el financiamiento (PAPIIT IN227319).

## LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. 5ª Ed. Academic Press. E.U.A. 922 p.
- Albouy J y Devergne JC. 2000. Enfermedades producidas por virus de las plantas ornamentales. Mundi-prensa libros S.A. ISBN: 9788471148889. 480 p.
- Arauz CLF. 1998. Fitopatología. Un enfoque agroecológico. Ed. de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 443 p.
- Beutelspacher CR. 2012. Esplendor de las orquídeas de Chiapas. Conaculta. México, D.F.
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ. 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database (11.07.2018). <http://sdb.im.ac.cn/videde/descr274.htm#Range>
- Cánovas SE, Ballari MC and Nome CF. 2016. First report of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ring spot virus* in Argentina. Australasian Plant Dis. Notes, 11: 2. <http://dx.doi.org/10.1007/s13314-015-0189-7>.
- Damon A. 2017. Estrategia para el rescate, conservación y aprovechamiento sustentable de las orquídeas (Orchidaceae) en el sureste de México. Agroproductividad. 10(6): 25-30.
- Dovas CI, Efthimiou K and Katis NI. 2004. Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dI-containing primers along with homologous dG-containing primers. Journal of Virological Methods. 117: 137-144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.01.004>.
- Dressler RL. 1981. The Orchids, Natural History and Classification. Harvard University Press. Cambridge. 332 pp.
- Eiras M, Resende OR, Missiaggia AA, De Ávila CA. 2001. Rtpcr and dot blot hybridization methods for a universal detection of Tospoviruses. Fitopatol. bras. vol.26 no.2 Brasília. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582001000200009>
- Freitas-Astúa J. 2003. The Bulletin of the American Orchid Society. Copyright American Orchid Society. <http://www.aos.org/orchids/orchid-pests-diseases/virus.aspx>.
- Hágsater E, Soto-Arenas MA, Salazar GA, Jiménez R, López MA y Dressler RL. 2005. Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín, A.C., México, D.F. 304 p.
- Hsiang-Chia L, Cheng-En C, Meng-Hsiun T, Hsiang-iu W, Hong-Ji S and Hsin-Hung Y. 2009. *Cymbidium mosaic potexvirus* isolate-dependent host movement systems reveal two movement control determinants and the coat protein is the dominant. Virology. 388: 147-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.049>.
- Khentry Y, Paradornuwat A, Tantiwivat S, Phansiri S, Thaveechai N. 2006. Incidence of *Cymbidium Mosaic Virus* and *Odontoglossum Ringspot Virus* on Invitro Thai Native Orchid Seedlings and Cultivated Orchid Mericlones. Kasetsart J. (Nat Sci.) 40: 49-57.
- Kull T, Arditti J and Wong SM. 2009. Orchid Biology: Reviews and Perspectives X. APPENDIX Orchid Viruses - A Compendium, 508 Appendix England. Springer Science. 446 p.
- Lawson HR. 2002. Virus and their control. In: James Watson. Guide: Orchid, Pests, Diseases. American Orchid Society. 74-122 pp.
- López-Hernández MS, Palacios-Popo PE y De La Torre-Almaraz R. 2014. Detección de *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) en orquídeas en México. Agrociencia, 48(5): 525-536.
- Pickering CM and Ballantyne M. 2013. Orchids: An example of charismatic megafloora tourism? In: Holden, A. and Fennell, D. The Routledge Handbook of Tourism and the Environment. Routledge London, 192-199 p.
- Pradhan S, Tripti R, Mukunda R, Bijaya P. 2016. Production of virus-free orchid *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. by various tissue culture techniques. Elsevier, Heliyon (2): 1-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00176>.
- Sambrook J and Rusell D. 2001. Molecular Cloning. A laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3.17-3.32 pp.
- Van der Vlugt RAA and Berendesen M. 2002. Development of a general Potexvirus detection method. European Journal of Plant Pathology. 108: 367-371. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1015644409484>.
- Yamane K, Oyama K, Iuchi E, Ogawa H, Suzuki T and Nat-suaki T. 2008. RT-PCR Detection of *Odontoglossum ringspot virus*, *Cymbidium mosaic virus* and Tospoviruses and Association of Infections with Leaf-Yellowing symptoms in *Phalaenopsis*. Journal of Phytopathology 156: 268-273. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01352.x>
- Zheng L, Rodoni BC, Gibbs MJ, Gibbs AJ. 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. Plant Pathology, 59: 211-220. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x>