

DETECCIÓN DE *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) Y *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) EN ORQUÍDEAS EN MÉXICO

DETECTION OF *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) AND *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) FROM ORCHIDS IN MEXICO

M. Siboney López-Hernández, P. Eloisa Palacios-Popo, Rodolfo De La Torre-Almaraz*

Laboratorio de Microbiología. UBIPRO. FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios Número 1. Los Reyes Iztacala. 54090. Tlalnepantla, Estado de México. (droldolfo@unam.mx).

RESUMEN

En recorridos realizados en 2011 para la detección de enfermedades en orquídeas en invernaderos comerciales en el Estado de Morelos, se observaron plantas dañadas con moteados cloróticos, rayados tenues de color amarillo y manchas cloróticas y necróticas anulares. Hojas dañadas fueron recolectadas de plantas de los géneros *Brassia*, *Brassocattleya*, *Cattleya*, *Encyclia*, *Epidendrum*, *Guariathe*, *Laelia*, *Oncidium*, *Shomburghia*, *Vainilla* y *Xilobium*. Pruebas de detección serológica de proteína viral de doble anticuerpo (DAS)-ELISA fueron realizadas con antisueros específicos para diversos virus que afectan a orquídeas. Al menos una planta de cada género presentó los virus *Cymbidium mosaic virus* (CymMV; *Potexvirus*) y *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV; *Tobamovirus*), en infecciones individuales o mezcladas. Las plantas de *Encyclia* y *Laelia* estuvieron infectadas con mayor frecuencia con ambos virus. El patrón electroforético se determinó en geles de poliacrilamida (PAGE) del genoma del CymMV, con extractos de ARN viral de doble cadena de origen viral de las muestras positivas en los ensayos serológicos de DAS-ELISA. La identidad del CymMV y ORSV se confirmó mediante secuenciación directa y por clonación de productos diferentes de la transcriptasa inversa ligada a la PCR (RT-PCR) punto final, con oligonucleótidos degenerados, que amplifican dos regiones consenso del gene de la replicasa (RdRp) del género *Potexvirus*, y oligonucleótidos específicos, que amplifican una región conservada del gen de la proteína de la cápside (CP) de CymMV y ORSV. Clones del gen RdRp de tres

ABSTRACT

In a field inspection of commercial greenhouse orchids in 2011 in the state of Morelos, plants were observed to exhibit damage in the form of chlorotic mottle, faint yellow stripes and ring-shaped chlorotic and necrotic spots. Damaged leaves were collected from plants of the genera *Brassia*, *Brassocattleya*, *Cattleya*, *Encyclia*, *Epidendrum*, *Guariathe*, *Laelia*, *Oncidium*, *Shomburghia*, *Vainilla* and *Xilobium*. Viral protein serological detection tests (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assays, DAS-ELISA) were done with specific antisera for diverse viruses that affect orchids. At least one plant of each genus had *Cymbidium mosaic virus* (CymMV; *Potexvirus*) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV; *Tobamovirus*) in individual or mixed infections. *Encyclia* and *Laelia* plants had the highest incidence of infection by both viruses. The electrophoretic pattern of the CymMV genome was determined in polyacrylamide gels (PAGE) with double chain viral RNA from the samples that were positive in the DAS-ELISA serological assays. Identity of CymMV and ORSV was confirmed by direct sequencing and by cloning products different from the reverse transcriptase linked to PCR (RT-PCR) final point with degenerated oligonucleotides, which amplify two consensus regions of the replicase gene (RdRp) of the genus *Potexvirus*, and specific oligonucleotides, which amplify a conserved region of the capsid protein gene (CP) of CymMV and ORSV. Clones of the gene RdRp from three *Laelia* plants (GenBank access numbers HQ393958, HQ393959, HQ393960, HQ393961 and HQ393962), of the CP gene of CymMV from two *Oncidium* plants (GenBank access numbers HQ393956 and HQ393957), and from three *Encyclia* plants (GenBank access numbers HQ393953, HQ393954 and HQ393955), were obtained and sequenced. The nucleotide sequences of the capsid protein gene (CP)

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2013. Aprobado: julio, 2014.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 48: 525-536. 2014.

plantas de *Laelia* (números de acceso Genbank HQ393958, HQ393959, HQ393960, HQ393961 y HQ393962), del gen CP de CymMV de dos plantas de *Oncidium* (números de acceso Genbank HQ393956 y HQ393957) y del gen CP de ORSV de tres plantas de *Encyclia* (números de acceso Genbank HQ393953, HQ393954 y HQ393955), fueron obtenidos y secuenciados. Las secuencias nucleotídicas del gen de la proteína de la cápside (CP) del CymMV y del CP del ORSV, obtenidos de las muestras de orquídeas que se cultivan en México, mostraron similitud de 96 a 97% con CymMV y de 99 a 100% con ORSV, con secuencias disponibles en el Genbank, lo cual confirmó que los aislados de ambos virus de México son idénticos a los de otras partes del mundo.

Palabras clave: Replicasa (RdRp), RT-PCR, ornamentales.

INTRODUCCIÓN

En México se cultivan numerosas especies o híbridos de orquídeas (*Orchidaceae*; monocotiledóneas), nativas o introducidas, para comercializar sus flores (Ramírez, 1996; INEGI, 1998; Dole y Wilkins, 1999).

Durante enero y febrero de 2011 en invernaderos comerciales del estado de Morelos, México, se recolectaron plantas de géneros diversos de orquídeas, mexicanas e introducidas desde otros países, que mostraron en sus hojas moteados cloróticos (Figura 1A), manchas irregulares cloróticas (Figura 1B), manchas cloróticas con márgenes necróticos (Figura 1C) o manchas irregulares necróticas (Figura 1D). Las plantas con estos daños reducen su vida útil y la calidad de las flores.

Análisis fitopatológicos del material recolectado no mostraron la presencia de microorganismos con los que se pudiera relacionar los daños. Por lo tanto, se consideró la hipótesis de que los daños observados son causados por virus, los cuales son patógenos comunes en los centros grandes de producción de orquídeas comerciales en el mundo y causan pérdidas económicas altas (Rees, 1992; Albouy y Devergne, 2000; La Croix, 2008).

La información de la identidad de los virus que infectan a las orquídeas en cultivo comercial en México parece inexistente. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar a los virus relacionados con los daños observados en diferentes géneros de orquídeas que se comercializan en México.

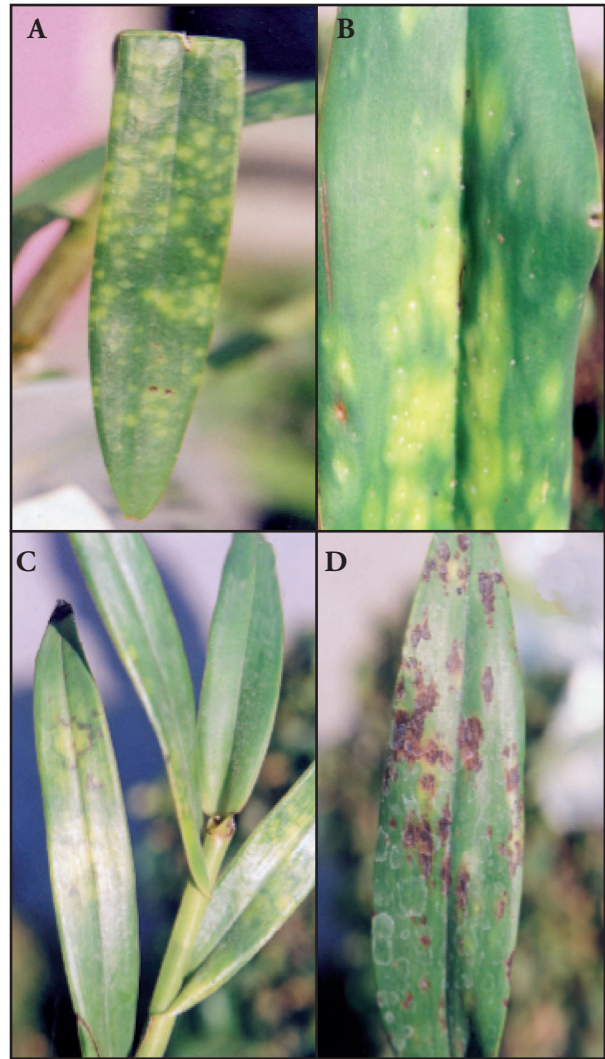


Figura 1. Síntomas observados en orquídeas A) moteados cloróticos, B) manchas irregulares cloróticas, C) anillos cloróticos con márgenes necróticos y D) manchas irregulares necróticas.

Figure 1. Symptoms observed in orchids: A) chlorotic mottle, B) irregular chlorotic spots, C) chlorotic rings with necrotic edges, and D) irregular necrotic spots.

of CymMV and of the ORSV CP, obtained from samples of orchids cultivated in México, were 96 to 97 % similar to CymMV and 99 to 100 % to ORSV, with sequences available in the GenBank, confirming that both viruses isolated in México are identical to those found in other parts of the world.

Key words: Replicase (RdRp), RT-PCR, ornamentals.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de muestras

Tres hojas se recolectaron de una o varias plantas de orquídeas, que manifestaban daños de probable origen viral, de los siguientes géneros o sus híbridos (número de plantas indicado): *Brassia* (1), *Brassocattleya* (1), *Cattleya* (2), *Encyclia* (6), *Epidendrum* (2), *Guariathe* (1), *Laelia* (3), *Oncidium* (5), *Shomburgkia* (2), *Vainilla* (1) y *Xylobium* (1). Todas las plantas se cultivaban en invernaderos comerciales de Morelos. Las muestras se colocaron en bolsas plásticas y se transportaron al Laboratorio de Microbiología de la UBIPRO de la Facultad de Estudios Superiores, Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México, para la detección serológica e identificación molecular con ácidos nucleicos de origen viral (Dijkstra y De Jager, 1998).

Detección serológica de virus por ensayo inmunológico ligado a enzimas (DAS-ELISA)

Se emplearon anticuerpos comerciales (Agdia, Inc., Elkhart, IN) específicos, diluidos 1 en 200 μ L y 1 g de tejido con daños macerado en 10 mL de solución amortiguadora de extracción, según las instrucciones del fabricante. Las reacciones se consideraron positivas por la presencia de color amarillo en los pocillos e intensidad del color de los testigos positivos, incluidos en todos los antiseros probados. Los anticuerpos utilizados fueron: *Cucumber mosaic virus* (CMV; *Cucumovirus*), *Tobacco mosaic virus* (TMV; *Tobamovirus*), *Alfalfa mosaic virus* (AMV; *Alfamovirus*), *Tobacco etch virus* (TEV; *Potyvirus*), *Tomato bushy stunt* (TBSV; *Tombusvirus*), *Tobacco ringspot virus* (TRSV; *Nepovirus*) y *Tomato spotted wilt virus* (TSWV; *Tospovirus*). Además se utilizaron los anticuerpos específicos comerciales de *Cymbidium ringspot virus* (CyRSV; *Tombusvirus*), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV; *Tobamovirus*) y *Cymbidium mosaic virus* (CymMV; *Potexvirus*) que comúnmente infectan a las orquídeas en el mundo (Brunt *et al.*, 1996).

Extracción y electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) de ARN de doble cadena de origen viral

La extracción y la electroforesis en geles de acrilamida del ARN de doble cadena de origen viral (ARN-dc) se realizó con 3.5 g de tejido, de acuerdo al protocolo propuesto por Valverde *et al.* (1990), que resultó positivo en las pruebas de serología.

INTRODUCTION

Numerous orchid (*Orchidaceae*; monocotyledons) species or hybrids, native or introduced, are cultivated in Mexico for commercialization of the flowers (Ramírez, 1996; INEGI, 1998; Dole and Wilkins, 1999).

During January and February 2011, plants of several orchid genera, Mexican and introduced from other countries, were collected. These plants exhibited chlorotic mottle (Figure 1A), irregular chlorotic spots (Figure 1B), chlorotic spots with necrotic edges (Figure 1C) or irregular necrotic spots (Figure 1D). Plants with this damage have a shorter useful life and lower quality of flowers.

Phytopathological analyses of the collected material did not show presence of microorganisms that might be related to the damage. Therefore, it was hypothesized that the observed damage was caused by viruses, which are common pathogens in large commercial orchid production centers in the world and cause high economic losses (Rees, 1992; Albouy and Devergne, 2000; La Croix, 2008).

Information on the identity of the viruses that infect commercial orchid cultivation in Mexico seems to be non-existent. Therefore, the objective of this study was to identify the viruses that cause damage observed in the different orchid genera commercialized in Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Three leaves were collected from one or several orchid plants that exhibited damage of probable viral origin. The orchids belonged to the following genera, or their hybrids (number of plants indicated): *Brassia* (1), *Brassocattleya* (1), *Cattleya* (2), *Encyclia* (6), *Epidendrum* (2), *Guariathe* (1), *Laelia* (3), *Oncidium* (5), *Shomburgkia* (2), *Vainilla* (1) and *Xylobium* (1). All of the plants were grown in commercial greenhouses in Morelos. The samples were placed in plastic bags and transported to the Microbiology Laboratory of UBIPRO of the School of Advanced Studies, Iztacala, National Autonomous University of México, for serological detection and molecular identification with nucleic acids of viral origin (Dijkstra and De Jager, 1998).

Detección y caracterización molecular de virus por clonación y secuenciación de productos de transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Las pruebas de RT-PCR se realizaron usando como template de la RT-PCR el ARN de doble cadena de origen viral (ARN-dc) de las muestras de orquídeas que fueron positivas a virus en pruebas de serología. Se emplearon dos pares de oligonucleótidos que amplifican dos segmentos consenso del gen de la replicasa (RdRp) específicos para el grupo Potexvirus, que incluye al CymMV, el más frecuente en las orquídeas infectadas (Conti, *et al.*, 2001; Ajikuttira, *et al.*, 2002; Grisoni, *et al.*, 2004). Los oligonucleótidos POTEX 1F/R5 y POTEX 2F/R5 amplifican un fragmento de 735 pb y de 584 pb (Ryu y Park, 1995; Van der Vlugt y Berendes, 2002).

Para conocer la especie de los virus detectados por serología se utilizaron oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento del gen de la proteína de la cápside (CP) del CymMV (CymMV CPF/CPR) que amplifica un fragmento de 669 pb (Lim *et al.*, 1993). También se usaron oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la CP de ORSV (ORSV CPF/CPR) que rinde un amplicón de 474 pb (Ryu y Park, 1995; Ajikuttira *et al.*, 2002). Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en tres pasos, según las indicaciones del fabricante (Promega Corp.). Los productos de la RT-PCR se fraccionaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, a 100 voltios por 30 min, y para calcular el peso de los productos obtenidos se incluyó un marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Dijkstra y De Jager, 1998).

Clonación y secuenciación

Los productos de la RT-PCR de interés fueron separados de los geles de agarosa y purificados utilizando el kit WIZARD (Promega Corp.). Los productos obtenidos de la RT-PCR de la replicasa y de la CP de los virus CymMV y ORSV se ligaron en el vector pDrive y se transformaron bacterias competentes (*Escherichia coli*, cepa DH5- α). Las bacterias se cultivaron en medio LB-agar + ampicilina, adicionado con IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) + X-Gal (50 mg mL⁻¹) (Sambrook *et al.*, 1989). La presencia del inserto se verificó mediante un ensayo con la enzima de restricción (*Eco*RI) y electroforesis en gel de agarosa. La secuencia de nucleótidos del inserto se determinó con los mismos oligonucleótidos de la RT-PCR, en un secuenciador (Applied Biosystems, Foster City, CA, modelo ABI 3100) de 16 capilares, con el método BIG DYE *Terminator fluorescence based sequencing* para análisis de secuencia. Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en el GenBank (NCBI).

Serological detection of the viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA)

Specific commercial antibodies (Agdia, Inc., Elkhart, IN) were used and diluted 1 to 200 mL and 1 g of damaged tissue was macerated in 10 mL extraction buffer solution, following the instructions of the manufacturer. The reactions were considered positive when a yellow color appeared in the wells with the intensity of the positive checks included with all of the tested antisera. The antibodies used were *Cucumber mosaic virus* (CMV; *Cucumovirus*), *Tobacco mosaic virus* (TMV; *Tobamovirus*), *Alfalfa mosaic virus* (AMV; *Alfamovirus*), *Tobacco etch virus* (TEV; *Potyvirus*), *Tomato bushy stunt* (TBSV; *Tombusvirus*), *Tobacco ringspot virus* (TRSV; *Nepovirus*) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV; *Tospovirus*). The specific commercial antibodies *Cymbidium ringspot virus* (CyRSV; *Tombusvirus*), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV; *Tobamovirus*) and *Cymbidium mosaic virus* (CymMV; *Potexvirus*), which commonly infect orchids worldwide (Brunt *et al.*, 1996) were also used.

Double chain viral RNA extraction and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Extraction and polyacrylamide gel electrophoresis of double chain viral RNA (dc-RNA) was done with 3.5 g of tissue that had positive results in the serological tests, following the protocol proposed by Valverde *et al.* (1990).

Molecular detection characterization of viruses by cloning and sequencing products of reverse transcription linked to polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR assays were done using viral double chain RNA (dc-RNA) as a template for RT-PCR from the orchid samples that were positive to virus in the serological assays. Two pairs of oligonucleotides that amplify two consensus segments of the replicase (RdRp) gene were used; these pairs were specific for the *Potexvirus* group, which includes CymMV, the virus that most frequently infects orchids (Conti, *et al.*, 2001; Ajikuttira, *et al.*, 2002; Grisoni, *et al.*, 2004). The oligonucleotides POTEX 1F/R5 and POTEX 2F/R5 amplify a fragment of 735 bp and 584 bp (Ryu and Park, 1995; Van der Vlugt and Berendes, 2002).

To determine the virus species detected by serology, specific oligonucleotides that amplify a fragment of the capsid protein gene (CP) and of the CymMV (CymMV CPF/CPR) that amplifies a 669 bp fragment (Lim *et al.*, 1993) were used. Specific oligonucleotides were also used to amplify the CP gene of ORSV (ORSV CPF/ CPR) that yields an amplification of 474 bp (Ryu and Park, 1995; Ajikuttira *et al.*, 2002). The

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección serológica de virus por ensayo inmunológico ligado a enzimas (DAS-ELISA)

Infecciones simples con CymMV se detectaron únicamente en tres muestras, con ORSV en cinco y con ambos virus en 15; esto confirma la incidencia alta de infección por virus en las muestras recolectadas. En todas las muestras, con excepción de una (*Encyclia* sp 3), se detectó la infección por uno o ambos virus (Cuadro 1), lo cual confirmó que los daños tienen origen viral.

Con los antiseros utilizados no se detectaron otros virus, pero es posible que estén presentes.

Extracción y electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) de ARN de doble cadena de origen viral

El patrón electroforético del CymMV consistió en una banda de aproximadamente 13.0×10^6 Da que corresponde al componente genómico viral y dos fragmentos subgenómicos, típico de *Potexvirus* (Figura 2). Sin embargo, no fue posible obtener regularmente el patrón ARN-dc del ORSV, un *Tobamovirus*, que consta de una banda principal de 4.3×10^6 Da (Valverde *et al.*, 1986). Los geles de poliacrilamida con todas las muestras no presentaron las bandas adicionales que indicaran la presencia de otros virus, excepto del CymMV en algunas muestras.

El análisis de ARN-dc por electroforesis en PAGE facilita la identificación, con cierta seguridad, de numerosos virus que infectan plantas y también permite detectar virus desconocidos en infecciones latentes. Sin embargo, la limitante principal del análisis de ARNdc viral es que requiere concentraciones altas del virus en su fase replicativa, para obtener, visualizar e identificar las bandas correspondientes al genoma del virus, por lo que podrían pasar desapercibidas las infecciones por los virus, por lo que se requieren otras técnicas de diagnóstico virales complementarias.

Es posible que la concentración de dsARN del ORSV fuera demasiado baja para detectar su patrón electroforético típico en PAGE al 6 %.

PR-PCR reactions were carried out in three steps, as indicated by the manufacturer (Promega Corp.). The RT-PCR products were fractionated by electrophoresis in 1 % agarose gels at 100 volts for 30 min. To calculate the weight of the obtained products, a 1 kb molecular weight marker (Invitrogen, Carlsbad, CA) was included (Dijkstra and De Jager, 1998).

Cloning and sequencing

The RT-PCR products of interest were separated from the agarose gels and purified using the WIZARD Kit (Promega Corp.). The products obtained from the CymMV and ORSV replicase and CP RT-PCR were linked to the vector pDrive and competing bacteria (*Escherichia coli*, strain DH5- α) were transformed. The bacteria were cultured in medium composed of LB-agar + ampicillin supplemented with IPTG (isopropyl-b-D-1-thiogalactopyranoside) + X-Gal (50 mg/mL) (Sambrook *et al.*, 1989). The presence of the insert was verified by a trial with the restriction enzyme (*EcoRI*) and electrophoresis in agarose gel. The nucleotide sequence of the insert was determined with the same oligonucleotides of the RT-PCR in a sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, model ABI 3100) with 16 capillary tubes using the BIG DYE method *Terminator fluorescence based sequencing* for sequence analysis. The obtained sequences were compared with those available in the GenBank (NCBI).

RESULTS AND DISCUSSION

Serological detection of viruses by enzyme-linked immune sorbent assay (DAS-ELISA)

Simple infections by CymMV alone were detected in only three samples, by ORSV in five, and by both viruses in 15. This confirms the high incidence of virus infection in the collected samples. In all of the samples, except one (*Encyclia* sp 3), infection by one or both viruses was detected (Table 1), confirming that the damage was caused by viruses.

The antisera used did not detect other viruses, although it is possible that they may be present.

Double chain viral RNA extraction and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

The electrophoretic pattern of CymMV consists of a band of approximately 13.0×10^6 Da, corresponding to the viral genomic component and of two subgenomic fragments, typical of *Potexvirus* (Figure 2). It was not possible, however, to obtain

Cuadro 1. Detección por serología (ELISA), RT-PCR punto final para la replicasa de CymMV (RdRp de Potexvirus) y proteína de la cápside (CP) de la infección a diferentes géneros de orquídeas por *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) y *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV).

Table 1. Serological detection (ELISA), RT-PCR final point for CymMv replicase (*Potexvirus* RdRp) and capsid protein (CP) of the infection in different genera of orchids by *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV).

Orquídea	Serología		RT-PCR RpRd (Potexvirus) CymMV		RT-PCR CP	
	CymMV	ORSV	F1/R5	F2/R5	CymMV	ORSV
<i>Brassia</i>	+	+				+
<i>Brassocattleya</i>	+	+		+	+	
<i>Cattleya</i> sp 1	+	+	+	+	+	
<i>Cattleya</i> sp 2		+	+	+	+	
<i>Encyclia</i> sp 1	+	+				
<i>Encyclia</i> sp 2	+					
<i>Encyclia</i> sp 3			+	+		
<i>Encyclia</i> sp 4	+	+	+	+		+
<i>Encyclia</i> sp 5		+	+	+		+
<i>Encyclia</i> sp 6	+	+	+	+		+
<i>Epidendrum</i> sp 1	+		+	+		+
<i>Epidendrum</i> sp 2	+		+	+	+	+
<i>Guarianthe</i>	+	+		+		
<i>Laelia</i> sp 1	+	+	+	+		+
<i>Laelia</i> sp 2	+	+				+
<i>Laelia</i> sp 3	+	+	+	+		
<i>Oncidium</i> sp 1	+	+	+	+		
<i>Oncidium</i> sp 2	+	+				
<i>Oncidium</i> sp 3		+	+	+		
<i>Oncidium</i> sp 4	+	+				
<i>Oncidium</i> sp 5		+	+	+		
<i>Schomburgkia</i> sp 1		+	+			
<i>Schomburgkia</i> sp 2	+	+		+		
<i>Vainilla</i>	+	+		+		
<i>Xylobium</i>	+	+		+	+	

+: Muestras positivas ♦ x

Detección y caracterización molecular de virus por clonación y secuenciación de productos de transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Ampliaciones del tamaño esperado se obtuvieron en las pruebas de RT-PCR, con los oligonucleótidos POTEXF1/R5 (735 pb) en 15 muestras (Figura 3), con los oligonucleótidos POTEX F2/R5 (584 pb) en 18 muestras (Figura 4) y 19 de las 25 muestras analizadas fueron positivas con ambos oligonucleótidos.

consistently the dc-RNA pattern of ORSV, a *Tobamovirus* that consists of a main band of 4.3×10^6 Da (Valverde *et al.*, 1986). With none of the samples did the polyacrylamide gels exhibit additional bands that would indicate the presence of other viruses.

Analysis of dc-RNA by electrophoresis in PAGE facilitates identification, with some certainty, of numerous viruses that infect plants and also allows detection of unknown viruses in latent infections. However, the main restriction of viral dc-RNA analysis is that it requires high concentrations of

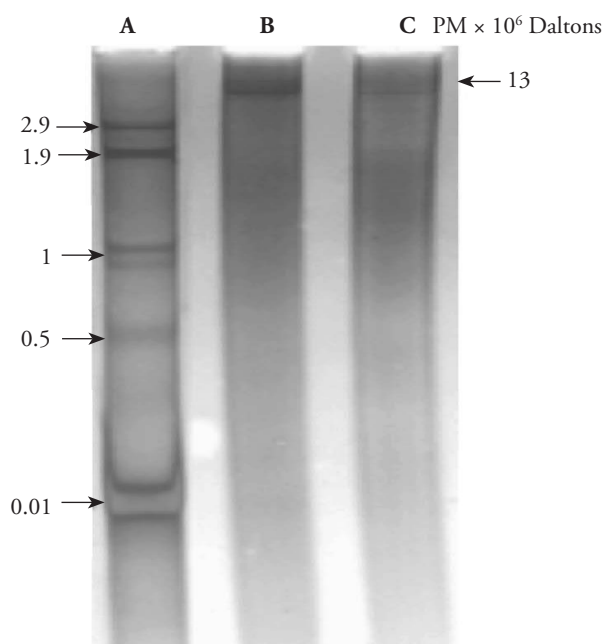


Figura 2. Gel de poliacrilamida al 6 % con ARN de doble cadena de CymMV obtenido de muestras de orquídeas con síntomas de virus (separado por 2.45 h a 100 voltios y teñido con AgNO_3 0.011 M). Carril 1: patrón de referencia ARNdc de CMV + CARNA-5 obtenido de *Nicotiana glauca*; carril 2: *Encyclia*; carril 3: *Oncidium*.

Figure 2. Polyacrylamide gel (6 %) with double chain RNA from CymMV obtained by sampling orchids with virus symptoms (separated by 2.45 h at 100 volts and dyed with AgNO_3 0.011 M). Track 1: dcRNA reference pattern of CMV + CARNA-5 obtained from *Nicotiana glauca*; track 2: *Encyclia*; track 3: *Oncidium*.

Con los oligonucleótidos específicos para la CP CymMV se detectaron nueve muestras infectadas con el virus (CPF/CPR. 669 pb) (Figura 5) y con los oligonucleótidos específicos para la CP de ORSV (CPF/CPR. 474 pb) nueve infectadas (Figura 6).

Los resultados de la detección por RT-PCR mostraron eficacia mayor para obtener amplicones positivos con los oligonucleótidos que amplifican parte del gen de la replicasa de Potexvirus y que con los oligonucleótidos específicos para la CP de CymMV y de ORSV.

La técnica ELISA fue más eficiente que las otras técnicas para detectar ambos virus, en infecciones simples y en mezcla; la detección fue similar con la RT-PCR específica para la replicasa de Potexvirus, como CymMV. La eficiencia menor se obtuvo con la RT-PCR específica para la CP de ambos virus, aunque

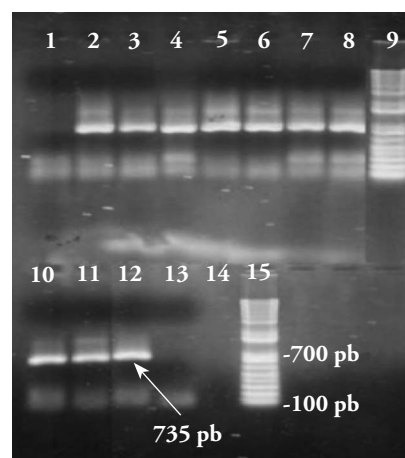


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % (30 min a 100 voltios y teñido con bromuro de etidio) de los productos de la RT-PCR con los oligonucleótidos POTEX F1/R5 (735 pb). Carril 1: *Shomburkia*; carril 2: *Cattleya*; carril 3: *Cattleya*; carril 4: *Epidendrum*; carril 5: *Vainilla*; carril 6: *Oncidium*; carril 7: *Epidendrum*; carril 8: *Xylobium*; carril 9: marcador de pesos moleculares; carril 10: *Oncidium*; carril 11: *Laelia*; carril 12: *Brassocattleya*; carril 13: testigo negativo H_2O dd; carril 14: vacío; carriles 9 y 15: marcadores de peso molecular 1 kb.

Figure 3. Electrophoresis in 1 % agarose gel (30 min at 100 volts and dyed with ethidium bromide) of the RT-PCR products with the oligonucleotides POTEX F1/R5 (735 bp). Track 1: *Shomburkia*; track 2: *Cattleya*; track 3: *Cattleya*; track 4: *Epidendrum*; track 5: *Vainilla*; track 6: *Oncidium*; track 7: *Epidendrum*; track 8: *Xylobium*; track 9: molecular weight marker; track 10: *Oncidium*; track 11: *Laelia*; track 12: *Brassocattleya*; track 13: negative check H_2O dd; track 14: empty; tracks 9 and 15: 1 kb molecular weight markers.

the virus in its replication phase to obtain, visualize and identify the bands corresponding to the virus genome. For this reason, virus infections may go unnoticed, and other complementary diagnostic techniques are needed.

It is possible that the concentration of dcRNA of ORSV was too low to detect the typical electrophoretic pattern in 6 % PAGE.

Detection and molecular characterization of viruses by cloning and sequencing products of reverse transcription linked to polymerase chain reaction (RT-PCR)

Amplifications of the expected size were obtained in the RT-PCR assays with the POTEXF1/

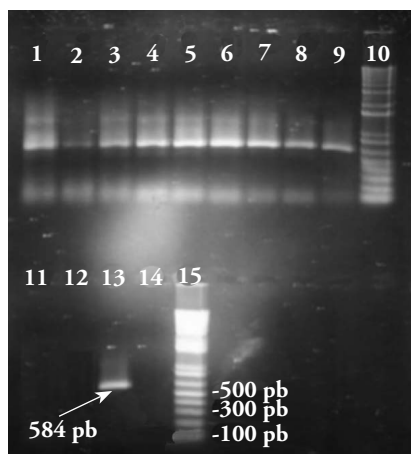


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (30 min a 100 voltios, teñido con bromuro de etidio) de los productos de la RT-PCR con los oligonucleótidos POTEX F2/R5 (584 pb). Carril 1: *Cattleia*; carril 2: *Epidendrum*; carril 3: *Vainilla*; carril 4: *Oncidium*; carril 5: *Epidendrum*; carril 6: *Xylobium*; carril 7: *Oncidium*; carril 8: *Laelia*; carril 9: *Encyclia*; carril 10: marcador de peso molecular; carriles 11 y 12: vacíos; carril 13: *Brasocattleya*; carril 14: testigo negativo. H₂O dd; carril 15: marcador de peso molecular 1 kb. Agua libre de nucleasas se usó como control negativo.

Figure 4. Electrophoresis in 1 % agarose gel (30 min at 100 volts and dyed with ethidium bromide) of the RT-PCR products with the oligonucleotides POTEX F1/R5 (584 bp). Track 1: *Cattleia*; track 2: *Epidendrum*; track 3: *Vainilla*; track 4: *Oncidium*; track 5: *Epidendrum*; track 6: *Xylobium*; track 7: *Oncidium*; track 8: *Laelia*; tracks 9: *Encyclia*; track 10: molecular weight marker; track 11 and 12: empty; track 13: *Brasocattleya*; track 14: negative check. H₂O dd; track 15: 1 kb molecular weight marker. Water free of nucleases was used as the negative check.

no se identificaron las causas de estos resultados. Sin embargo, los amplicones obtenidos permitieron precisar la identidad de ambos virus por clonación y secuenciación de ácidos nucleicos (Cuadro 1).

Además de la eficiencia de la técnica, parece conveniente evaluar el coste de cada técnica para evaluar su utilidad en el diagnóstico eficiente de ambos virus.

Clonación y secuenciación

Con los insertos de las pruebas de RT-PCR para un fragmento del gen de la replicasa del género de *Potexvirus* y un fragmento de los genes de la CP de

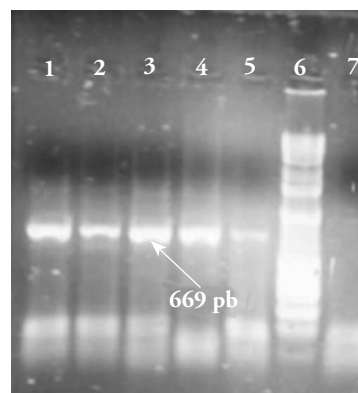


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % (30 min a 100 voltios, teñido con bromuro de etidio) de los productos de RT-PCR con los oligonucleótidos CymMV (CPF/CPR 669 pb). Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: *Cattleia*; carril 3: *Epidendrum*; carril 4: *Xylobium*; carril 5: *Oncidium*; carril 6: *Shomburkia*; carril 7: *Oncidium*; carril 8: *Laelia*; carril 9: *Encyclia*; carril 10: *Brasocattleya*; carril 11: marcador de peso molecular; carril 12: *Encyclia*; carril 13: testigo negativo H₂O dd.

Figure 5. Electrophoresis in 1 % agarose gel (30 min at 100 volts and dyed with ethidium bromide) of the RT-PCR products with the oligonucleotides CymMV (CPF/CPR 669 bp). Track 1: molecular weight marker; track 2: *Cattleia*; track 3: *Epidendrum*; track 4: *Xylobium*; track 5: *Oncidium*; track 6: *Shomburkia*; track 7: *Oncidium*; track 8: *Laelia*; track 9: *Encyclia*; track 10: *Brasocattleya*; track 11: molecular weight marker; track 12: *Encyclia*; track 13: negative check H₂O dd.

R5 (735 bp) oligonucleotides in 15 samples (Figure 3), with the POTEX F2/R5 (584 bp) nucleotides in 18 samples (Figure 4), and 19 of the 25 samples analyzed were positive for both oligonucleotides.

With oligonucleotides specific for CP of CymMV, nine samples infected by the virus (CPF/CPR. 669 bp) (Figure 5) were detected, and with the oligonucleotides specific for CP of ORSV (CPF/CPR. 474 bp) seven infected samples were found (Figure 6).

The results of detection by RT-PCR showed greater efficacy for obtaining positive amplicons with the oligonucleotides that amplified part of the replicase gene of *Potexvirus* and with the oligonucleotides specific for CP of CymMV and ORSV.

The ELISA technique was more efficient than the other techniques in detecting both viruses in single or mixed infections. Detection was similar

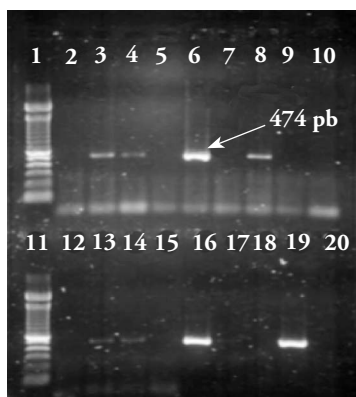


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (30 min a 100 voltios, teñido con bromuro de etidio) de los productos de RT-PCR con los oligonucleótidos ORSV CPF/CPR (474 pb). Carril 1: marcador de peso molecular; carril 3: *Epidendrum*; carril 4: *Xylobium*; carril 6: *Oncidium*; carril 8: *Shomburkia*; carril 11: marcador de peso molecular; carril 13: *Oncidium*; carril 14: *Laelia*; carril 16: *Encyclia*; carril 19: *Encyclia*; carril 20: testigo negativo H₂O dd.

Figure 6. Electrophoresis in 1 % agarose gel (30 min at 100 volts and dyed with ethidium bromide) of the RT-PCR products with the oligonucleotides ORSV CP/CPR (474 bp). Track 1: molecular weight marker; track 3: *Epidendrum*; track 4: *Xylobium*; track 6: *Oncidium*; track 8: *Shomburkia*; track 11: molecular weight marker; track 13: *Oncidium*; track 14: *Laelia*; track 16: *Encyclia*; track 19: *Encyclia*; track 20: negative check H₂O dd.

CymMV y de ORSV se seleccionaron y secuenciaron 10 clonas. Los productos de la RT-PCR de ambos virus para clonar fueron obtenidos de las plantas infectadas de *Encyclia* sp., *Laelia* sp. y *Oncidium* sp.

Los números de acceso del GenBank se obtuvieron por cada clona seleccionada y se confirmó la identidad de cada aislado por análisis y comparación de secuencias similares disponibles en el GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov, consultada en enero de 2013).

La comparación de las secuencias obtenidas para el gen de la replicasa de las clonas de CymMV, Cymclon 1 (Número de acceso Genbank HQ393958), Cymclon 2 (Número de acceso Genbank HQ393959), Cymclon 3 (Número de acceso Genbank HQ393960), Cymclon 4 (Número de acceso Genbank HQ393961) y Cymclon 5 (Número de acceso Genbank HQ393962), mostraron entre

with RT-PCR specific for replicase of both *Potexvirus* and CymMV. RT-PCR specific for CP of the two viruses was less efficient, although the causes of these results were not identified. However, the amplicons obtained enabled us to pin point the identity of both viruses by cloning and sequencing the nucleic acids (Table 1).

Besides the efficiency of each technique, it would be convenient to assess its cost to judge its usefulness in the efficient diagnosis of viruses.

Cloning and sequencing

With the inserts of the RT-PCR assays for a fragment of the replicase gene of the genus *Potexvirus* and a fragment of the CP genes of CymMV and ORSV, 10 clones were selected and sequenced. The RT-PCR products of both viruses for cloning were obtained from plants infected by *Encyclia* sp., *Laelia* sp. and *Oncidium* sp.

GenBank access numbers were obtained for each clone selected, and the identity of each isolate was confirmed by analysis and comparison with similar sequences available in the GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov, consulted January 2013).

Comparison of the sequences obtained for the replicase gene of the clones of CymMv, Cymclon 1 (GenBank accession number HQ393958), Cymclon 2 (GenBank accession number HQ393959), Cymclon 3 (GenBank accession number HQ393960), Cymclon 4 (GenBank accession number HQ393961) and Cymclon 5 (GenBank accession number HQ393962) showed 96 to 100% similarity to replicase gene with the sequences with access numbers AY571289 y AF016914.1, available in the GenBank and corresponding to CymMv isolates from Taiwan and Korea.

Comparison of the sequences of the CP clones of CymMV MorCym 1 (GenBank accession number HQ393956) and MorCym 2 (GenBank accession number HQ393957) were 96 to 98 % similar to the CP gene of the sequences AF405722.1 and AB541542.1 from Korea and available in the GenBank. Comparison of the sequences of the CP clones of ORSV MorOdon 1 (GenBank accession number HQ393953), MorOdon 2 (GenBank accession number HQ393954) and MorOdon 3 (GenBank accession number HQ393955) revealed 98 to 100 % similarity to the sequence JN584484.1,

96 y 100 % de similitud con el gen de la replicasa de las secuencias con número de acceso AY571289 y AF016914.1, disponibles en el Genbank, correspondientes con aislados de CymMV de Taiwan y Corea.

La comparación de las secuencias de las clonas de la CP de CymMV MorCym 1 (Número de acceso Genbank HQ393956) y MorCym 2 (Número de acceso Genbank HQ393957) mostraron similitud del 96 al 98 % con el gen de la CP de las secuencias AF405722.1 y AB541542.1 disponibles en el Genbank, procedentes de Corea.

La comparación de las secuencias de las clonas de la CP de ORSV MorOdon 1 (Número de acceso Genbank HQ393953), MorOdon 2 (Número de acceso Genbank HQ393954) y MorOdon 3 (Número de acceso Genbank HQ393955), mostraron similitud de 98 a 100 % con la secuencia JN584484.1 disponible en el Genbank, del gen de la CP de un aislado de ORSV procedente de Taiwan (Soto *et al.*, 2012).

El análisis y comparación de las secuencias obtenidas con las disponibles en el GenBank confirmaron la identidad de los virus CymMV y ORSV, detectados en las plantas de distintos géneros de orquídeas con síntomas de mosaico, moteados, manchas anulares y necrosis, que se cultivan en invernaderos del estado de Morelos.

La prueba serológica de DAS-ELISA permitió detectar rápidamente y con cierta eficiencia la presencia de CymMV y ORSV en la mayoría del material recolectado, por lo que considerando los síntomas observados en orquídeas, estos están relacionados con infecciones individuales y en mezcla de ambos virus. La detección de *Potexvirus* por RT-PCR, en este caso CymMV, fue similar a la serológica, al contrario de la RT-PCR con oligonucleótidos para la CP de CymMV y ORSV. Por el momento se desconoce la causa de la diferencia de eficiencia de estas pruebas.

La clonación y secuenciación de los productos de la RT-PCR, con dos juegos de oligonucleótidos degenerados para amplificar dos fragmentos del gen de la replicasa del género *Potexvirus*, y los específicos para amplificar los fragmentos de los genes de la CP de CymMV y ORSV, respectivamente, confirmaron la identidad de ambos virus en el material recolectado. La comparación de las secuencias de los fragmentos clonados, confirmó que los aislados de CymMV y ORSV son 96 a 100 % similares a los aislamientos comunes de orquídeas cultivadas en el mundo,

available in the GenBank, of the CP gene of an ORSV isolate from Taiwan (Soto *et al.*, 2012).

Analysis of the sequences obtained and their comparison with those available in the GenBank confirmed the identity of the viruses CymMV and ORSV detected in plants of different orchid genera, with symptoms of mosaic, mottle, ring-shaped spots and necrosis, cultivated in greenhouses in the state of Morelos.

The serological DAS-ELISA test allowed rapid, somewhat efficient detection of the presence of CymMV and ORSV in most of the collected plant material; thus, we conclude that the symptoms observed in the orchids are related to infections of single viruses and a mixture of the two. Detection of *Potexvirus* by RT-PCR, in this case CymMV, was similar to that with serology, contrasting with oligonucleotide RT-PCR for the CP of CymMV and ORSV. The cause of the differences in efficiency of these assays is still unknown.

Cloning and sequencing RT-PCR products with two sets of degenerated oligonucleotides to amplify two fragments of the replicase gene of the genus *Potexvirus* and those specific for amplifying fragments of the CP genes of CymMV and ORSV, respectively, confirmed the identity of both viruses in the collected material. Comparison of the sequences of the cloned fragments confirmed that the isolates of CymMV and ORSV are 96 to 100 % similar to the isolates common to orchids cultivated around the world, particularly to those from Korea and Taiwan. This confirms that the CymMV and ORSV isolates of México probably come from all of the regions where orchids are cultivated. The material used in this study, such as *Encyclia*, *Laelia* and *Oncidium* are widely distributed throughout the country, as are varieties or hybrids introduced from other regions of the world.

CymMV belongs to the genus *Potexvirus*, order Tymovirales, family Alphaflexiviridae. The *Potexvirus* species consist of flexible bar-shaped particles that measure 470 to 580 nm long and 11 to 13 nm in diameter. CymMV is the virus that most frequently infects orchid species all over the world and causes severe losses (Francki, 1991).

The CymMV genome is a simple linear chain (6227 nt) of RNA, positive sense, with five open reading frames (ORF). ORF1 codes RNA-dependent RNA replicase (RdRp); the following three ORFs

particularmente los de Corea y Taiwan. Esto confirma que los aislados de CymMV y ORSV de México, probablemente proceden de todas las regiones donde se cultivan orquídeas. El material usado en el presente estudio, como *Encyclia*, *Laelia* y *Oncidium*, está distribuido ampliamente en México, como variedades o híbridos introducidos de otras regiones del mundo.

CymMV pertenece al género *Potexvirus*, del orden *Tymovirales* y familia *Alphaflexiviridae*. Los virus que pertenecen a los *Potexvirus* consisten de partículas en forma de varilla flexible, que miden de 470 a 580 nm de largo y 11 a 13 nm de diámetro. El CymMV es el virus que infecta con más frecuencia las especies de orquídeas en el mundo y causa pérdidas elevadas (Francki, 1991).

El genoma de CymMV es de cadena sencilla lineal (6227 nt) de ARN, de sentido positivo, con cinco marcos de lectura abierta (ORF). El ORF1 codifica la ARN replicasa dependiente de ARN (RdRp), los tres siguientes ORF's (triple block) forman parte de la proteína del movimiento (MP), encargada del transporte viral entre las células, y el ORF5 codifica para la proteína de la cápside (CP). CymMV expresa su genoma con la producción de dos ARNm subgenómicos. Este virus se transmite principalmente en forma mecánica o por contacto entre plantas y no se conoce algún biovector (Brunt *et al.*, 1996).

ORSV pertenece al género *Tobamovirus* con partículas en forma de varilla rígida con longitud de 300 nm. Este virus es frecuente en numerosas especies de orquídeas y se asocia con lesiones necróticas severas en el material que infecta. El genoma del ORSV consiste de una cadena de ARN, de una sola banda de sentido positivo, con cuatro marcos de lectura abierta (ORF's). Los ORF1 y ORF2 codifican y regulan la traducción de la replicasa (RdRP), el ORF3 codifica para la MP y el ORF4 codifica para CP. Los dos últimos genes se expresan mediante dos ARNm subgenómicos. Este virus se transmite mecánicamente y por contacto entre plantas, y no se conocen sus biovectores (Brunt *et al.*, 1996).

Más de 30 virus que infectan a múltiples géneros de orquídeas se conocen en el mundo, pero CymMV y ORSV son los más frecuentes, principalmente en plantas cultivadas, lo cual está relacionado con la facilidad de dispersión y su capacidad infectiva alta (Jensen, 1970).

(triple block) form part of the movement protein (MP), responsible for transporting the virus to the cells, and ORF5 codes for the capsid protein (CP). CymMV expresses its genome with the production of two subgenomic mRNA. This virus spreads mainly through mechanical means or by contact between plants; no biovector is known (Brunt *et al.*, 1996).

ORSV belongs to the genus *Tobamovirus*; it is in the shape of a rigid bar 300 nm long. This virus frequently invades numerous species of orchids and is associated with severe necrotic lesions in the material it infects. The ORSV genome consists of an RNA chain of a single positive sense strand with four open reading frames (ORF). ORF1 and ORF2 code and regulate translation of replicase (RdRp), while ORF3 codes for MP and ORF4 codes for CP. The latter two genes are expressed through two subgenomic mRNA. This virus spreads mechanically and by contact between plants, and there are no known biovectors (Brunt *et al.*, 1996).

More than 30 viruses infecting multiple orchid genera are known worldwide, but CymMV and ORSV are the most frequent, mainly in cultivated plants, which is related to easy dispersion and high infective capacity (Jensen, 1979).

In this study detection and identification of CymMV and ORSV was frequent with the described methods and techniques. Other viruses, however, might be detected with other diagnostic methods or in a larger number of orchid species (Brunt *et al.*, 1996; You *et al.*, 2005).

CONCLUSIONS

Identification of CymMV and ORSV was confirmed through cloning and sequencing RT-PCR products obtained from different genera of orchids infected by these two viruses. Analysis of the nucleotide sequences obtained and compared with similar sequences available in the GenBank showed that the isolates of CymMV and ORSV are similar to those found in other regions of the world.

—End of the English version—

—*—

En el presente estudio la detección e identificación de CymMV y ORSV fue frecuente con los métodos y técnicas ya descritas. Pero se podrían detectar otros virus con otros métodos de diagnóstico o incrementando las especies de orquídeas (Brunt *et al.*, 1996; You *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

La identidad de CymMV y ORSV se confirmó mediante la clonación y secuenciación de productos de la RT-PCR obtenidos de distintos géneros de orquídeas infectadas por estos virus. Los análisis de comparación de las secuencias nucleotídicas obtenidas con secuencias similares y disponibles en el GenBank mostraron que los aislados de CymMV y ORSV son similares a los encontrados en otras regiones del mundo.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue apoyada económicamente por el PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT- IN 218411) de la UNAM.

LITERATURA CITADA

- Ajjikuttira, P. A., C. L. Lim-Ho, M. H. Woon, K. H. Ryu, C. A. Chang, C. S. Loh, and S. M. Wong. 2002. Genetic variability in the coat protein genes of two orchid viruses: *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. Arch. Virol. 147: 1943-1954.
- Albouy, J., and J. C. Devergne. 2000. Enfermedades Producidas por Virus de las Plantas Ornamentales. Ediciones Mundi-Prensa. pp: 204-208.
- Conti, M. D. Gatelli, V. Lisa, O. Lovisolo, G. Martelli P., A. Ragozzino, G. Rana L., y C. Volvas. 2001. Principales Virus de las Plantas Hortícolas. Ediciones Mundi-Prensa. pp: 11-56.
- Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, L. Watson, and E. J. Zurcher (eds). 1996. Plant Viruses Online: Description and Lists from the VIDE Database. Versión: 16th January 1997. URL. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vidé>. (Consulta: enero-febrero 2013).
- Clark, M. F., and A. M. Adams. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
- Dijkstra, J., and P. C. De Jager. 1998. Practical Plant Virology. Protocols and Exercises. Edit. Springer, Berlin. 459 p.
- Dole, J. y H. Wilkins. 1999. Principios de Floricultura y Especies. Edit. Printice-Hall. Inc. pp: 438-445.
- Francki, R. I. B. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Arch. Virol. Suppl. 2: 392-401.
- Grisoni, M., F. Davidson, C. Hyrondelle, K. Farreyrol, M. L. Caruana, and M. Pearson. 2004. Nature, incidence, and symptomatology of viruses infecting *Vanilla tabitensis* in French Polynesia. Plant Dis. 88: 119-124.
- INEGI. 1998. La Horticultura Ornamental en México. INEGI. México. pp: 1-81.
- Jensen, D. D. 1970. Virus diseases of orchids in the Netherlands. Neth. J. Pl. Path. 76: 135-139.
- La Croix, I. F. 2008. La Nueva Enciclopedia de las Orquídeas. Editorial Timber Press. pp: 22.
- Lim, S. T., S. M. Wong, C. Y. Yeong, S. C. Lee, and C. J. Goh. 1993. Rapid detection of *Cymbidium mosaic virus* by the polymerase chain reaction (PCR). J. Virol. Meth. 41: 37-46.
- NCBI. 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Rees, A. R. 1992. Ornamental Bulbs, Corms and Tuber. CAAB International. England. pp: 75-78.
- Ramírez, J. 1996. Orquídeas de México. CONABIO. Biodiversitas 5:1-5.
- Ryu, K. H., and W. M. Park. 1995. Rapid detection and identification of *Odontoglossum ringspot virus* by polymerase chain reaction amplification. FEMS Microbiol Lett. 133: 265-269.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Soto, V. A. G., R. De La Torre A., B. Xoconostle C., R. Ruíz M. 2012. First report of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in orchids in Mexico. Plant Dis. 96: 464.
- Valverde, R. A., J. A. Dodds, and J. A. Heick. 1986. Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. Phytopathology 76: 459-465.
- Valverde, R. A., Nameth, S. T. and R. L. Jordan. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. Plant Dis. 74: 255-258.
- Van der Vlugt, R. A. A. and M. Berendesen. 2002. Development of a general Potexvirus detection method. Eur. J. Plant Pathol. 108: 367-371.
- Wong, S. M., P. H. Mahtani, K. C. Lee, H. H. Yu, Y. Tan, K. K. Neo, Y. Chan, M. Wu, and C. G. Chang. 1997. *Cymbidium mosaic* potexvirus RNA: complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis. Arch. Virol. 142: 383-391.
- You, X. Z., C. C. Ching, K. Ch. Yuh, and J. J. Fuh. 2005. Identification and characterization of a potyvirus causing chlorotic spots on *Phalaenopsis* orchids. Eur. J. Plant Pathol. 121: 87-95.