

CONOCIMIENTO DEL AGENTE CAUSAL: VIRUS Y VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE LA MACANA

Daniel Osorio¹, Camilo Beltrán-Acosta², Leonardo Sastoque²,
María Caridad Cepero de García², Alba Marina Cotes² y Carolina González¹

¹Laboratorio de Microbiología Molecular, Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica

²Laboratorio de Control Biológico, CBB, Corpoica
cgonzaleza@corpoica.org.co

Introducción

Actualmente, la enfermedad de la macana o rayadilla es la limitante más común y de mayor impacto en el cultivo del fique; es causada por un virus que es posiblemente transmitido por el hongo *Olpidium* sp., (Cepero de García *et al.*, 2006). El hongo *Olpidium* spp. se encuentra distribuido en todo el mundo, es parásito obligado intracelular en raíces y logra infectar una gran variedad de plantas hospederas, monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluyendo malas hierbas que actúan como reservorios naturales. Este vector es económicamente importante debido a que transmite virus causantes de enfermedades destructivas en plantas (Rochon *et al.*, 2004; Koganezawa *et al.*, 2005).

Estudios realizados por Gálvez y colaboradores (1977), citado por Morales y colaboradores (2003), demostraron que el patógeno causal de la macana es un virus isométrico, aunque sin determinar con precisión su posición taxonómica ni su modo de transmisión. Gracias a estudios realizados por Morales y colaboradores (1992) se caracterizó el virus y lo denominaron *Virus de la raya necrótica del fique*, perteneciente al género *Dianthovirus*, de la familia Tombusviridae, del cual no se conocía un vector biológico. Estudios realizados por Cepero de García y colaboradores (2006) han demostrado la asociación entre el virus y un hongo vector subterráneo que puede transmitir virus vegetales. Dichas investigaciones confirmaron que el posible vector es el hongo *Olpidium* spp.

Generalidades del vector (*Olpidium* spp.)

Taxonomía, ecología y patología

Los Chytridiomycetes patógenos de plantas, comúnmente conocidos como quítridos, carecen de un micelio verdadero y constan, en su mayor parte, de un rizomicelio irregular o redondeado que vive completamente en el interior de las células de su hospedante. Cuando ha llegado a la madurez, el soma vegetativo se transforma en muchas esporas latentes de pared gruesa o en esporangios. Los hongos pertenecientes a esta clase son acuáticos. Dado que producen zoosporas, requieren de agua o de una película acuosa en el suelo o sobre la superficie de la planta. Para el caso de *Olpidium* spp., este transmite virus desde los hospederos en los que se propaga, hasta los que posteriormente infecta. Debido a ello, *Olpidium* spp. es un vector de por lo menos seis virus que producen enfermedades en las plantas, como el virus de la necrosis del tabaco (TNV-A, TNV-D) y de la vena ancha de la lechuga (MiLV y LBVV) (Sasaya y Koganezawa, 2006; Colariccio *et al.*, 2005; Rochon *et al.*, 2004).

Ciclo de vida de Olpidium spp.

Olpidium spp. presenta tres estados de desarrollo en su ciclo de vida: plasmodio y zoosporangio, zoosporas móviles y esporas de resistencia, que pueden sobrevivir hasta por veinte años en terrenos cultivables, siendo difícil erradicarlo una vez establecido (Tomlinson y Garrett, 1964; Colariccio *et al.*, 2005).

Modo de infección

Una zoospora, con un único flagelo posterior, se enquista en las células epidérmicas de la raíz del huésped, y el protoplasma del quiste se inyecta dentro del citoplasma de la célula, el cual aparentemente lleva el virus en su protoplasto, transmitiéndose a raíces sanas. Siete días después de la infección, los zoosporangios maduros descargan zoosporas por medio de tubos de descarga o de salida al exterior de la raíz, repitiendo finalmente su ciclo de vida. El virus también puede encontrarse dentro de esporas de resistencia del vector, sobreviviendo por años en ausencia de plantas hospederas (Temminck y Campbell, 1968; Temminck, 1971; Rochon *et al.*, 2004; Koganezawa *et al.*, 2005).

Plasmodio y zoosporangio

Cada uno de los plasmodios aparentemente germina de una zoospora, la cual, después de enquistarse sobre la superficie de la célula huésped, penetra en cuestión de pocas horas. El plasmodio joven puede llegar a ser inapreciable en algunas células huésped, después de 12 a 24 horas. Estos organelos son esféricos, de estructuras granulares que alcanzan rápidamente un diámetro igual al eje corto de la célula vegetal y que continúan su

crecimiento, alargándose, hasta adquirir una forma ovoide u elipsoide. Cuando el plasmodio madura a zoosporangio toma una forma granular en su interior y el protoplasma es separado dando lugar a las zoosporas. Cuando el zoosporangio germina, las zoosporas salen al agua circundante, pero, justo antes de su salida, las zoosporas pueden observarse en movimiento dentro del zoosporangio. Estas zoosporas pueden escapar a través de pequeños poros de la pared de la célula huésped y no a través de un tubo de salida definido (Tomlinson y Garrett, 1964) (Figura 1).

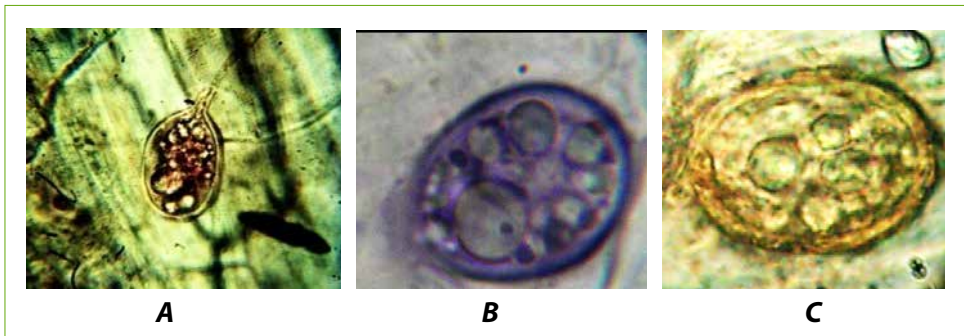


Figura 1. Zoosporangios cargados con zoosporas, visualizados en un microscopio de contraste de fases con el objetivo 100x-Ph3. **A.** Con la presencia del tubo de descarga. **B y C.** Sin la presencia de tubo de descarga.

Zoosporas

La zoospora es generalmente de forma esférica, de aproximadamente tres micras de diámetro y con un flagelo posterior pequeño. Poco después de su desarrollo nadan en direcciones aleatorias. Algunas zoosporas son biflageladas y presentan un mayor tamaño, dos veces más grandes que el de una zoospora uniflagelada. La presencia de los dos flagelos está asociada a la fusión de dos zoosporas en su fase sexual (Tomlinson y Garrett, 1964) (Figura 2).

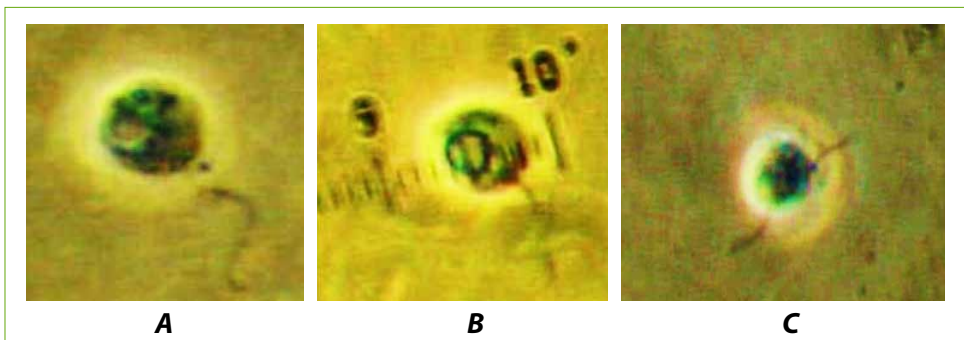


Figura 2. Zoosporas visualizadas en un microscopio de contraste de fases con el objetivo 100x-Ph3. **A.** Zoospora flagelada. **B.** Zoospora con tamaño de 6 μ (micras). **C.** Zoospora biflagelada.

Esporas de resistencia

Las esporas de resistencia se observan en las células de la epidermis de la raíz, cinco días después de la infección, en cantidades considerables y particularmente sobre las raíces más viejas. Al microscopio, ellas presentan una forma estrellada y un diámetro entre $14\ \mu$ y $25\ \mu$ (Tomlinson y Garrett, 1964). La pared de esta estructura es verdaderamente rígida y le permite al hongo sobrevivir en el suelo por más de 20 años. Bajo condiciones adecuadas de humedad y una vez dentro de las células huésped, las esporas entran a su fase asexual, pierden su pared gruesa, toman una forma granular y expulsan las zoosporas para reanudar así su ciclo de vida (Figura 3).

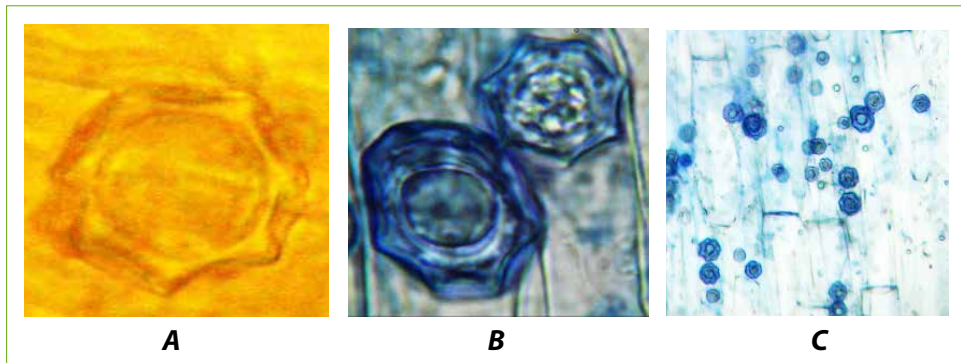


Figura 3. Esporas de resistencia. **A.** Espora de resistencia visualizada en un microscopio de contraste de fases con el objetivo 100x-Ph3. **B.** Esporas de resistencia teñidas con azul de tripan visualizadas en un microscopio de luz con el objetivo 100x. **C.** Tejido vegetal infectado con estructuras de resistencia de *Olpidium* spp.

Distribución

Olpidium spp. presenta una amplia distribución y se extiende en todas las áreas templadas del mundo (Koganezawa *et al.*, 2005). El rango de hospederos es muy extenso, por lo que se encuentran reportes de especies susceptibles, distribuidas en varias familias, entre ellas: Cucurbitaceae, Leguminosae, Chenopodiaceae, Compositae, Umbelliferae, Solanaceae, Cruciferae, Malvaceae, Liliaceae y Gramineae (Koganezawa *et al.*, 2005).

Síntomas y signos de la infección por *Olpidium* spp.

El hongo no presenta ninguna sintomatología externa; se determina su presencia cuando hay síntomas del virus. Para detectar la presencia del hongo se debe llevar a cabo el procedimiento de tinción de raíces con azul de Tripán, según la metodología descrita por Phillips y Hayman (1970) y modificada por Cepero de García y colaboradores (2006), en donde se observan y diferencian fácilmente las estructuras como las esporas de resistencia y los zoosporangios.

Identificación molecular de *Olpidium* spp.

El ADN ribosomal (ADNr) ha demostrado ser una región útil para estudiar relaciones evolutivas entre hongos y ha desempeñado un papel importante en la taxonomía de hongos (White *et al.*, 1990). Sin embargo, actualmente los genes 5.8S, 18S y 28S de esta región han mostrado relativamente pocas diferencias entre especies (Kularatne *et al.*, 2004). Ante esto, otras regiones han sido estudiadas y han demostrado ser mucho más variables, como es el caso de las regiones correspondientes al espaciador transcrito interno (ITS) entre los genes 18S y 28S del ADNr. Estas regiones para el caso de *Olpidium* spp. han arrojado resultados interesantes.

Estudios realizados por Herrera-Vásquez y colaboradores (2009), permitieron a partir de una PCR múltiple detectar tres especies de *Olpidium* spp. (*O. bornovanus*, *O. brassicae*, *O. virulentus*) utilizando cebadores que amplifican solo la región específica ADNr del hongo, a partir tanto de zoosporas como de raíces de la planta huésped. Estos cebadores fueron utilizados como la herramienta de identificación molecular del hongo *Olpidium* sp. detectado en raíces de plantas de fique.

PCR múltiple

La PCR múltiple se basa en la reacción en cadena de la ADN polimerasa (Polymerase Chain Reaction), con la única diferencia de que se utilizan varios juegos de cebadores en su proceso. Con esta técnica se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Sus únicos requerimientos son la existencia de nucleótidos que son la materia prima para fabricar el ADN, y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula "molde" de ADN que queremos copiar para que sirva como cebador (primer) (Crueger y Crueger, 1993).

Metodología

Producción masiva del inóculo de *Olpidium* sp.

Con el objetivo de establecer un protocolo para el aislamiento de las zoosporas de *Olpidium* sp. se utilizaron plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*) que presentaban entre 3 y 5 hojas verdaderas empleadas como cultivo modelo, dada la susceptibilidad que presenta esta hortaliza frente al vector del patógeno (Cepero de García *et al.*, 2006). Estas fueron trasplantadas a materas plásticas de 600 g de capacidad, a cada una de las cuales se le agregó una mezcla de suelo turba como sustrato base y en el centro de la misma se le adicionó suelo que contenía una cepa virulenta de *Olpidium* sp. en proporción 10:1.

Después de 30 a 40 días se extrajeron las plantas y se detectó la presencia del hongo en las raíces, gracias al protocolo de tinción de raíces que se describe a

continuación. Se lavaron las raíces con agua destilada estéril y se sumergieron en hidróxido de potasio (KOH) al 10%; esta solución se calentó en baño de María a 90°C, durante 10 minutos, y se lavaron con abundante agua. Luego se acidificó con HCl por 10 min, se descartó y por último se agregó azul de Tripán por 24 horas.

Montaje de las raíces infectadas y observación de las estructuras del hongo

Con el fin de verificar la infección del hongo en la raíces de la planta, se ubicaron e identificaron bajo el microscopio las estructuras, tales como las esporas de resistencia y los zoosporangios. Para ello, en primera instancia se sumergió un grupo de las raíces teñidas en agua destilada (Figura 4A), de tal forma que se pudieran cortar en segmentos de 2 cm, las cuales fueron colocadas de a 10 en un montaje lámina-laminilla. Para confirmar la presencia del hongo se analizaron 10 campos por cada raíz, usando el objetivo 10x (Figura 4). Posteriormente, se diferenció la morfología de las estructuras presentes bajo el objetivo 40x y para el caso de evidencia fotográfica se utilizó el objetivo 100x (Figura 4).

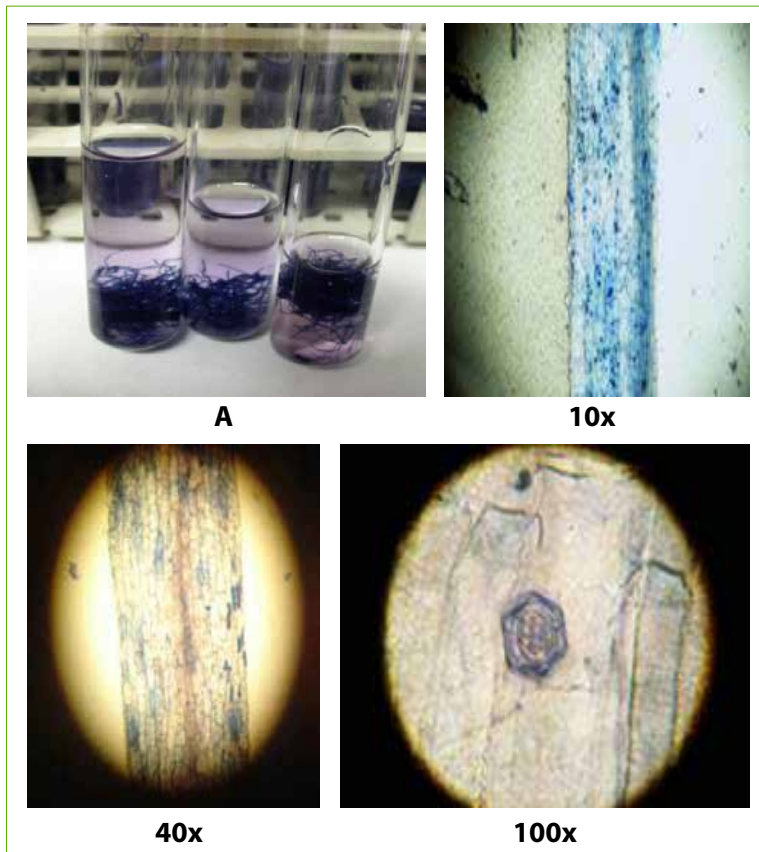


Figura 4. A. Raíces infectadas con *Olpidium* sp. **B.** Observación de las estructuras del hongo al microscopio (10x, 40x y 100x).

Con el propósito de aislar las zoosporas vivas del hongo, se realizó el montaje en fresco de las raíces, como se mencionó anteriormente, pero sin ningún tipo de tinción. El aislamiento fue efectuado según la metodología propuesta por Herrera-Vásquez y colaboradores (2009) con algunas modificaciones, para extraer un ADN puro y concentrado para la identificación molecular de *Olpidium* spp.

Aislamiento de las zoosporas de *Olpidium* sp.

Después de 17 días del trasplante, la mitad de las plantas fueron extraídas de los recipientes y el suelo adherido a las raíces fue retirado cuidadosamente para conservar en buen estado las estructuras del hongo. Una vez obtenidas las raíces, se lavaron con abundante agua corriente estéril y se mantuvieron a una temperatura entre 15°C y 20°C para evitar la expulsión de las zoosporas. Luego se colocaron sobre cajas de Petri y en ellas se continuaron los lavados con agua estéril, bajo las condiciones anteriormente mencionadas, mínimo cuatro veces más o hasta que los residuos del sustrato se eliminaran por completo.

Obtención y purificación de las zoosporas en suspensión

La siguiente fase experimental se focalizó en la purificación de la suspensión de zoosporas, ya que los aislamientos provienen de suelo donde la microbiota es muy extensa y la contaminación con bacterias es constante, lo cual puede afectar la identificación molecular.

La purificación de las zoosporas se realizó mediante una metodología que permitiera purificar la solución sin afectar las estructuras móviles de *Olpidium* sp. Para ello se utilizaron antibióticos de amplio espectro en concentraciones bajas, con el fin de evitar el daño de las estructuras del hongo. Se realizó la inmersión de las raíces en una mezcla de antibióticos (combinación de estreptomycin, penicilina y cloranfenicol a una concentración final de 4,5 mg/mL) durante 10 min aproximadamente, seguida de cuatro enjuagues con agua corriente estéril y mantenida entre 15°C y 20°C para eliminar los residuos de antibióticos (Figura 5). Una vez realizados los lavados se utilizó una solución de sacarosa al 1% y glicina 0,5 M 1:1 (v/v), sugerida por Herrera-Vásquez y colaboradores (2009), en la cual se incubaron las raíces lavadas a una temperatura de 25-30°C, durante 24h, con lo cual se redujo la presencia de bacterias contaminantes y se favoreció la expulsión de las zoosporas (Figura 5). Esto fue demostrado después de observar las muestras bajo el microscopio de contraste de fases, previa incubación y centrifugación a 10.000 rpm (Figura 6)

Identificación molecular de *Olpidium* sp.

Extracción de ADN: Para la identificación molecular de *Olpidium* sp. se realizaron extracciones de ADN ajustando el protocolo de Denman y McSweeney (2005). Este protocolo se aplicó a partir de una suspensión de

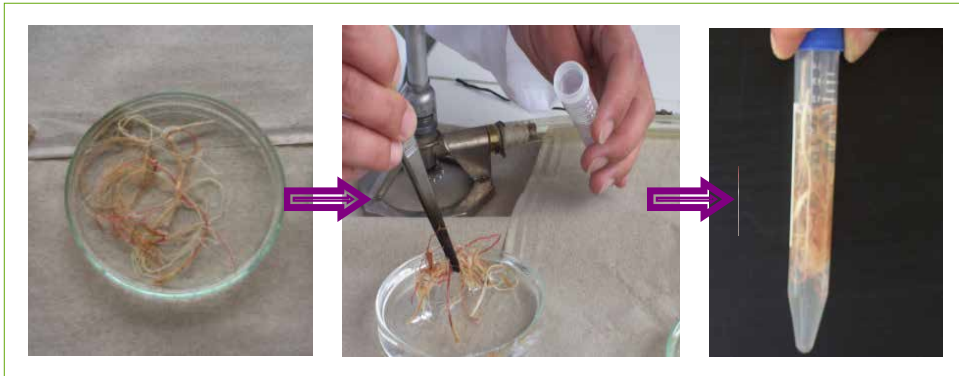


Figura 5. Inmersión de las raíces de lechuga de 17 días después del trasplante, infectadas con *Olpidium* spp. en una solución de antibióticos (Estreptomicina, Penicilina y Cloranfenicol a 4,5 mg.mL⁻¹), seguida de una solución de glicina (0,05 M glicina y 1% sacarosa).

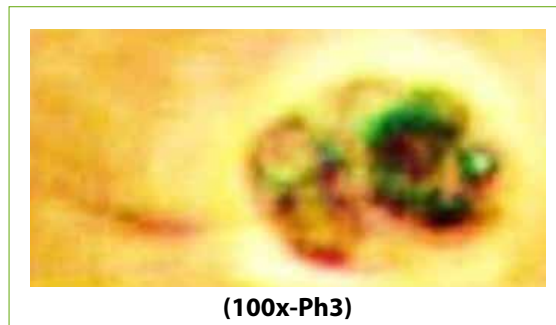


Figura 6. Observación de las zoosporas bajo microscopio de contraste de fases, 24 horas postincubación de las raíces a 30°C.

zoosporas y de raíces infectadas con el hongo, con el fin de encontrar la cantidad y la calidad óptima de ADN para la amplificación. La concentración de ADN y la pureza del mismo fue estimada por la medida de la absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop® 1000 (Thermo Scientific).

Amplificación por PCR para *Olpidium* sp.: Con el fin de determinar la especie de *Olpidium* sp. presente en las muestras de Cauca (Colombia), se recurrió a la técnica de PCR-múltiple, utilizando los cebadores específicos para *Olpidium* spp. sugeridos por Herrera-Vázquez y colaboradores (2009), tales como: OLPbor (*Olpidium bornovanus* sp.) (Accesión GenBank N°AB205215, tamaño 977 bp), OLPbra (*Olpidium brassicae* sp.) (N° AB205213, 204 bp) y OLPvir (*Olpidium virulentus* sp.) (N° AB205208, 579 bp). La amplificación específica de la región ADNr se realizó a partir de la suspensión de las zoosporas como de las raíces infectadas. Estos productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa para su análisis y su posterior secuenciación.

Resultados

Producción masiva del inóculo

Para la reactivación del ciclo de vida y la producción masiva de *Olpidium* sp. se trasplantaron 70 plantas de lechuga, de acuerdo con la metodología descrita, de las cuales 10 fueron sembradas en suelo estéril como control positivo y 60 fueron sembradas en suelo inoculado con *Olpidium* sp. A 30 plantas inoculadas se les realizó la tinción de las raíces con azul de Tripán, con el fin de verificar la presencia de *Olpidium* spp., y las 30 restantes se dejaron en invernadero como inóculo primario para los siguientes bioensayos.

Bajo observación en microscopio de contraste de fases se verificó la presencia del hongo en el 100% de las raíces analizadas, mediante la identificación de las esporas de resistencia. Dos tipos de esporas características del género *Olpidium* spp. fueron identificadas: esporas de pared lisa características de *O. bornovanus* y esporas de pared hexagonal propias *O. brassicae*, según Herrera-Vásquez y colaboradores (2009) (Figura 7). Este tipo de esporas se observó en todas las raíces analizadas.

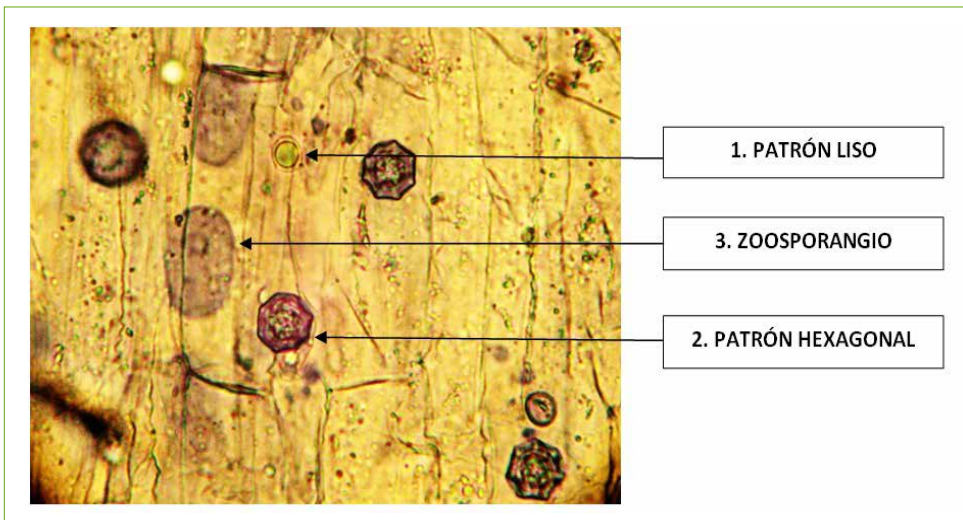


Figura 7. 1. Patrones de esporas de resistencia observadas en microscopio de contraste de fases 40x-Ph2, teñidas con azul de Tripán.

Identificación morfológica de las zoosporas de *Olpidium* sp.

Para la identificación taxonómica de *Olpidium* sp. es muy importante conocer la complejidad de la estructura interna y la organización de la zoospora. Para ello se realizó un montaje en fresco a partir de una suspensión de zoosporas,

en la cual se observaron las estructuras características de este hongo bajo microscopio de contraste de fases, objetivo 100x-Ph3, confirmando que se trata de *Olpidium* sp. (Figura 8).

Identificación molecular de *Olpidium* sp.

Extracción de ADN: Los ADN extraídos a partir de la suspensión de zoosporas y de raíces maceradas fueron cuantificados por espectrofotometría con la ayuda del NanoDrop®. De los resultados obtenidos, las muestras de ADN provenientes de raíces maceradas presentaron mejor concentración y pureza. Estas fueron elegidas para las pruebas de amplificación por PCR.

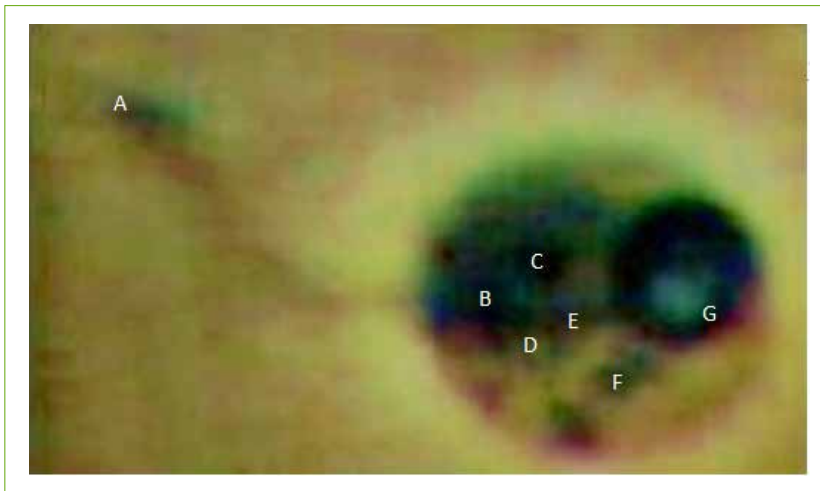


Figura 8. Estructura interna de la zoospora observada bajo microscopio de contraste de fases, 100x-Ph 3, a partir de zoosporas de *Olpidium* sp. **A.** Flagelo. **B.** Blefaroplasto funcional. **C.** Núcleo. **D.** Cápsula nuclear. **E.** Rizoplasto. **F.** Gránulos extranucleares, y **G.** Cuerpo lipídico.

Amplificación por PCR para *Olpidium* sp.

Para la identificación molecular a nivel de especie se empleó la técnica de PCR-múltiple, utilizando las tres parejas de cebadores correspondientes, cada una de ellas, a la región ITS del ADNr de tres especies de hongos pertenecientes a este género: *O. bornovanus* (OLPbor), *O. brassicae* (OLPbra) y *O. virulentus* (OLPvir). Las amplificaciones fueron realizadas con cada par de cebadores de manera independiente y así mismo de manera múltiple en una sola reacción de amplificación. Para ambos casos se determinó que la especie presente en las zonas figueras del departamento del Cauca podría ser *Olpidium virulentus*, dado que la pareja de cebadores (OLPvir) fue la única que permitió amplificar esta región en la totalidad de las muestras evaluadas (Figura 9).

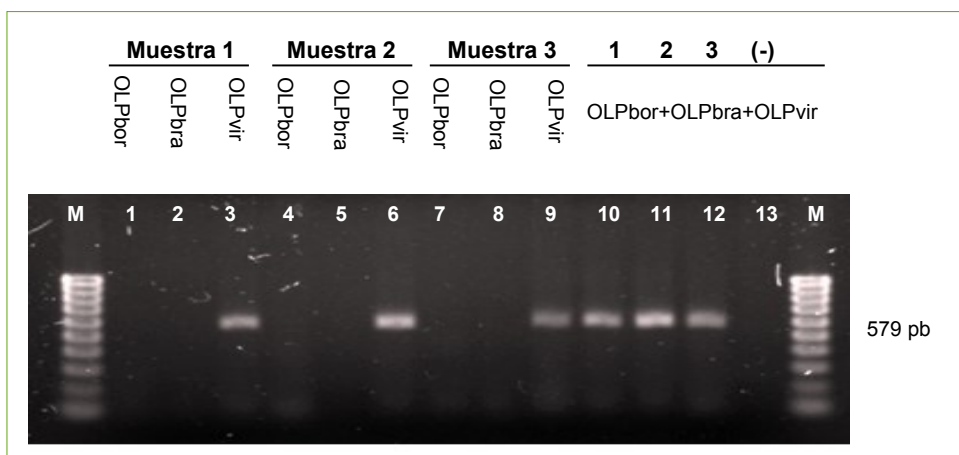


Figura 9. Amplificación PCR obtenida con cada una de las parejas de cebadores (carril 1 al 9) y con la mezcla de las tres parejas (carriles 10, 11 y 12) a partir de ADN de tres muestras de raíces infectadas con el hongo. Carril 13: Control (-), M: Marcador de peso molecular: 100 pb.

Con el ánimo de confirmar este resultado, se procedió a realizar la secuenciación de los productos obtenidos con la pareja de cebadores OLPvir. Los resultados de secuencia fueron analizados contra dos bases de datos públicas: la base de datos GenBank del Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI) y la base de datos del Centro de Biodiversidad Fúngica (CBS). Con estas bases de datos y la herramienta de alineamiento BlastN, las muestras analizadas mostraron una alta homología con la especie *O. brassicae* (cepa HY-1 GenBank: AB205204.1). La cepa HY-1 corresponde a la especie *O. virulentus*, de acuerdo con las investigaciones realizadas por Sasaya y Koganesawa (2006). Un alineamiento de la secuencia obtenida en este estudio con la cepa HY1 reportada en el GenBank, confirmó este resultado por medio de la herramienta bioinformática CLUSTALW.

Resultados y conclusiones

Con el ánimo de identificar la especie de *Olpidium* sp., posible vector del virus de la macana del fique, se realizaron estudios morfológicos de los zoosporangios bajo el microscopio. Dichas observaciones demostraron que estas estructuras no permiten establecer con certeza ninguna discriminación a nivel de especie, razón por la cual procedimos a estudiar las esporas de resistencia, las cuales son un factor determinante para este tipo de identificación.

Bajo el microscopio se observaron esporas de resistencia con dos patrones diferentes a partir de una misma muestra, uno de pared lisa, propio de *O. bornovanus*, y otro de pared hexagonal, propio de *O. brassicae*, e incluso se observó la ausencia total de ellas en algunas muestras analizadas. Por lo que

se demuestra que no fue una aproximación precisa para diferenciar especies dentro de este género.

Todo lo anterior llevó a recurrir a técnicas más finas, de tipo molecular, y menos complejas que pudieran identificar con mayor precisión la especie del hongo de este estudio. Para ello se utilizó la PCR múltiple, mediante la cual fue posible identificar, a partir de regiones ITS específicas del genoma de tres especies de *Olpidium* spp. (*O. bornavanus*, *O. brassicae* y *O. virulentus*), que la especie del hongo presente en las regiones productoras de fique en el departamento del Cauca es *O. virulentus*. Este resultado fue corroborado por el análisis de la secuencia.

Cabe destacar que la metodología molecular arrojó resultados satisfactorios que requirieron de procesos arduos de normalización, tanto para la obtención de la muestra (producción masiva de zoosporas), como para la purificación de la misma (baja carga bacteriana), pues para lograr una identificación precisa, la fuente y pureza del ADN, así como la especificidad de los cebadores, fueron fundamentales para la detección y diferenciación de la especie del hongo.

Referencias bibliográficas

1. Cepero de García, M.C. Beltrán, C.R. & Cotes, A.M. 2006. Detección de *Olpidium brassicae* en raíces de fique (*Furcraea* sp.), como posible vector del virus de la raya necrótica del fique. En: *Estudios micológicos para determinar la posible presencia del hongo O. brassicae en muestras de suelo procedentes de la rizosfera de plantas infectadas y no infectadas con el virus de la macana*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica. Documento interno.
2. Colariccio, A. Chaves, A.L.R. Eiras, M. Chagas, C.M. & Roggero, P. 2005. Detection of Varicosavirus and Ophiovirus in lettuce associated whit Lettuce Big-Vein symptoms in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 30(4). Pp. 416-419.
3. Crueger, W. & Crueger, A. 1993. *Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial*. Zaragoza, España: Ed. Acribia.
4. Herrera-Vásquez, J.Á. Cebrián, M.C. Alfaro-Fernández, A. Córdoba-Sellés, M.C. & Jordá, C. 2009. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae* and *O. virulentus*. *Mycological Research*. 113. Pp. 602-610.
5. Koganezawa, H. Inoue, H. & Sasaya, T. 2005. Host specificity and multiplication of eight isolates of *Olpidium brassicae* sensu lato and its related *Olpidium* sp. *Bulletin of the National Agricultural Research Center*. 4. Pp. 39-59.
6. Kularatne, H.A. Lawrie, A.C. Barber, P.A. & Keane, P.J. 2004. A specific primer PCR and RFLP assay for the rapid detection and differentiation in planta of some *Mycosphaerella* species associated with foliar diseases of *Eucalyptus globulus*. *Mycological Research*. 108. Pp. 1476-1493.
7. Denman, S.E. & McSweeney, C.S. 2005. Quantitative (real-time) PCR. En: *Methods in gut microbial ecology for ruminants*. Makkar, H. & McSweeney, C. (eds.). International Atomic Energy Agency. IAEA. Springer. The Netherlands. Pp. 105-115.

8. Morales, F. Castaño, M. Calvert, L. & Arroyave, A. 1992. Furcraea Necrotic Streak Virus: An apparent new member of the Dianthovirus group. *Journal of Phytopathology*. 134. Pp. 247-254.
9. Morales, F. Castaño, M. & Martínez, A.K. 2003. *La macana o radilla del fique (Furcraea sp.): Avances de la investigación y caracterización molecular del agente causal 1977-2003*. Documento interno. Unidad de Virología Vegetal. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
10. Phillips, J.M. & Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55 (1). Pp. 158-161.
11. Rochon, D. Kakani, K. Robbins, M. & Reade, R. 2004. Molecular aspects of plant virus transmission by *Olpidium* and plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology*. 42. Pp. 211-241.
12. Sasaya, T. & Koganezawa, H. 2006. Molecular analysis and virus transmission tests place *Olpidium virulentus*, a vector of Mirafiori lettuce big-vein virus and tobacco stunt virus, as a distinct species rather than a strain of *Olpidium brassicae*. *Journal of General Plant Pathology*. 72. Pp. 20-25.
13. Temmink, J.H.M. & Cambell, R.N. 1968. The ultrastructure of *Olpidium brassicae*. I. Formation esporangia. *Canadian Journal of Botany*. 46. Pp. 951-956.
14. Temmink, J.H.M. 1971. An ultrastructural study of *Olpidium brassicae* and its transmission of tobacco necrosis virus. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen*. Pp. 1-135.
15. Tomlinson, J.A. & Garret, R.G. 1964. Studies on the lettuce big-vein virus and its vector *Olpidium brassicae* (Wor.) Dang. *Annals of Applied Biology*. 54. Pp. 45-61.
16. White, T.J. Bruns, T. Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics. En: Innis, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds). *PCR Protocols: a guide to methods and amplifications*. San Diego, USA: Academic Press. Pp. 315-322.