



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE LA TRANSMISIÓN DE PAPAYA
MELEIRA VIRUS (PMeV) POR SEMILLAS**

Tesis que presenta

ANUAR AHMED MAGAÑA ÁLVAREZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Enero de 2013





Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

EVALUACIÓN DE LA TRANSMISIÓN DE PAPAYA
MELEIRA VIRUS (PMV) POR SEMILLAS

Tesis que presenta

ANUAR AHMED MAGAÑA ALVAREZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Enero de 2013





CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Evaluación de la transmisión de Papaya Meleira Virus (PMeV) por semillas" fue realizado en el laboratorio GeMBio del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la codirección del Dr. Inocencio Higuera Ciapara y la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito, dentro de la Opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

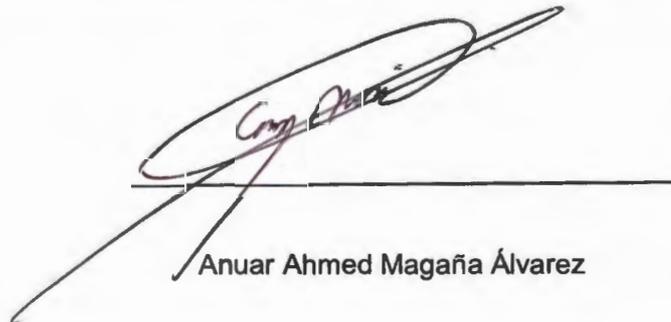
Atentamente,

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota
Coordinador de Docencia
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México; a 10 de Enero 2013

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración



Anuar Ahmed Magaña Álvarez

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Inocencio Higuera Ciapara, por su valiosa asesoría en la elaboración de la tesis, por todo su apoyo y por la confianza brindada.

A la Dra. Daisy Pérez Brito, por su coasesoría en la elaboración de este trabajo y por su dirección en el establecimiento de las metodologías empleadas.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., en especial al laboratorio GeMBio, por proporcionar los equipos necesarios en el desarrollo del trabajo.

A la Fundación Quintana Roo Produce, por el financiamiento otorgado al proyecto "Estrategias de manejo y prevención para el control del lloroso de la papaya" "2010-000338".

Al CONACYT, por la beca de manutención otorgada número **314806**.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell, por su inmensa ayuda en la fase experimental de este trabajo, así como en la redacción y revisión de la tesis.

Al I.Q.I. Alberto Cortés Velázquez, por su apoyo técnico en la fase experimental y en la fase de campo, así como sus comentarios en el escrito del documento y de la presentación.

Al Ing. Ángel Nexticapán Garcés, por su apoyo en la toma de muestras, así como en la asesoría sobre el manejo integrado de plagas realizado en el experimento y la elaboración de gráficas.

Al M.C. Andrés Quijano Ramayo, por su apoyo en la toma de muestras y en el manejo integrado de plagas en la casa sombra.

Al Ing. Rodolfo Martín Mex, por su apoyo en los análisis estadísticos de los resultados.

A la Dra. Luisa López Ochoa y la M. en C. Emily Zamudio, por proporcionarme los iniciadores y el método de diagnóstico para PMeV.

A la LAE. Bertha Arely Ramírez González, por su apoyo en la estructuración electrónica de este trabajo.

A la M.C. Claudia Guadalupe Torres Calzada, por apoyo en las técnicas moleculares, así como sus comentarios y conocimientos durante la realización de esta tesis

A la Ing. Bioq. Teresita de Jesús Valencia Yah, por su apoyo en el diseño de la presentación.

Al Ing. Bioq. Hansel Interian y al Ing. Bioq. Edgar Gamaliel Itzá Kuk, por todo su apoyo técnico durante la realización de la fase experimental del trabajo.

Al Biol. Francisco Cob, por proporcionarme las instalaciones para el establecimiento de la casa sombra.

Al Sr. Martín Moreno, por permitimos realizar la toma de muestras en la plantación SPR "Much Meyá"

A mi Comité Tutorial: Dr. Inocencio Higuera Ciapara, Dra. Daisy Pérez Brito, Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela y Dr. Rafael Rojas Herrera, por las observaciones y comentarios realizados en todo el proceso de elaboración de la tesis.

A mi Comité Revisor: Dr. Inocencio Higuera Ciapara, Dra. Daisy Pérez Brito, Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela, el Dr. Rafael Rojas Herrera y el Dr. Raúl Tapia Tussell, por la atenta lectura de este trabajo y por sus atinadas correcciones.

A todos los que de una forma u otra han contribuido a la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, mis hermanos y sobrina...

.....	1.A. Descripción	10
.....	1.B. Historia	11
.....	1.1.1. Transmisión de FIV	11
.....	1.1.2. Distribución del FIV	10
.....	1.1.3. Historia de FIV	20
.....	1.2.1. Síntomas	17
.....	1.2.2. Etiología	16
.....	1.2.3. FIV/ origen y distribución	15
.....	1.2.4. Transmisión por machos	17
.....	1.2.5. Transmisión por hembras	17
.....	1.2.6. Transmisión por machos	14
.....	1.2.7. Transmisión por machos	14
.....	1.2.8. Transmisión por machos	14
.....	1.2.9. Transmisión por machos	14
.....	1.2.10. Transmisión por machos	14
.....	1.2.11. Transmisión por machos	14
.....	1.2.12. Transmisión por machos	14
.....	1.2.13. Transmisión por machos	14
.....	1.2.14. Transmisión por machos	14
.....	1.2.15. Transmisión por machos	14
.....	1.2.16. Transmisión por machos	14
.....	1.2.17. Transmisión por machos	14
.....	1.2.18. Transmisión por machos	14
.....	1.2.19. Transmisión por machos	14
.....	1.2.20. Transmisión por machos	14
.....	1.2.21. Transmisión por machos	14
.....	1.2.22. Transmisión por machos	14
.....	1.2.23. Transmisión por machos	14
.....	1.2.24. Transmisión por machos	14
.....	1.2.25. Transmisión por machos	14
.....	1.2.26. Transmisión por machos	14
.....	1.2.27. Transmisión por machos	14
.....	1.2.28. Transmisión por machos	14
.....	1.2.29. Transmisión por machos	14
.....	1.2.30. Transmisión por machos	14
.....	1.2.31. Transmisión por machos	14
.....	1.2.32. Transmisión por machos	14
.....	1.2.33. Transmisión por machos	14
.....	1.2.34. Transmisión por machos	14
.....	1.2.35. Transmisión por machos	14
.....	1.2.36. Transmisión por machos	14
.....	1.2.37. Transmisión por machos	14
.....	1.2.38. Transmisión por machos	14
.....	1.2.39. Transmisión por machos	14
.....	1.2.40. Transmisión por machos	14
.....	1.2.41. Transmisión por machos	14
.....	1.2.42. Transmisión por machos	14
.....	1.2.43. Transmisión por machos	14
.....	1.2.44. Transmisión por machos	14
.....	1.2.45. Transmisión por machos	14
.....	1.2.46. Transmisión por machos	14
.....	1.2.47. Transmisión por machos	14
.....	1.2.48. Transmisión por machos	14
.....	1.2.49. Transmisión por machos	14
.....	1.2.50. Transmisión por machos	14
.....	1.2.51. Transmisión por machos	14
.....	1.2.52. Transmisión por machos	14
.....	1.2.53. Transmisión por machos	14
.....	1.2.54. Transmisión por machos	14
.....	1.2.55. Transmisión por machos	14
.....	1.2.56. Transmisión por machos	14
.....	1.2.57. Transmisión por machos	14
.....	1.2.58. Transmisión por machos	14
.....	1.2.59. Transmisión por machos	14
.....	1.2.60. Transmisión por machos	14
.....	1.2.61. Transmisión por machos	14
.....	1.2.62. Transmisión por machos	14
.....	1.2.63. Transmisión por machos	14
.....	1.2.64. Transmisión por machos	14
.....	1.2.65. Transmisión por machos	14
.....	1.2.66. Transmisión por machos	14
.....	1.2.67. Transmisión por machos	14
.....	1.2.68. Transmisión por machos	14
.....	1.2.69. Transmisión por machos	14
.....	1.2.70. Transmisión por machos	14
.....	1.2.71. Transmisión por machos	14
.....	1.2.72. Transmisión por machos	14
.....	1.2.73. Transmisión por machos	14
.....	1.2.74. Transmisión por machos	14
.....	1.2.75. Transmisión por machos	14
.....	1.2.76. Transmisión por machos	14
.....	1.2.77. Transmisión por machos	14
.....	1.2.78. Transmisión por machos	14
.....	1.2.79. Transmisión por machos	14
.....	1.2.80. Transmisión por machos	14
.....	1.2.81. Transmisión por machos	14
.....	1.2.82. Transmisión por machos	14
.....	1.2.83. Transmisión por machos	14
.....	1.2.84. Transmisión por machos	14
.....	1.2.85. Transmisión por machos	14
.....	1.2.86. Transmisión por machos	14
.....	1.2.87. Transmisión por machos	14
.....	1.2.88. Transmisión por machos	14
.....	1.2.89. Transmisión por machos	14
.....	1.2.90. Transmisión por machos	14
.....	1.2.91. Transmisión por machos	14
.....	1.2.92. Transmisión por machos	14
.....	1.2.93. Transmisión por machos	14
.....	1.2.94. Transmisión por machos	14
.....	1.2.95. Transmisión por machos	14
.....	1.2.96. Transmisión por machos	14
.....	1.2.97. Transmisión por machos	14
.....	1.2.98. Transmisión por machos	14
.....	1.2.99. Transmisión por machos	14
.....	1.3. Abstracto	12
.....	RESUMEN	14
.....	ABREVIATURAS	16
.....	ANEXO	16
.....	ÍNDICE DE CUADROS	16
.....	ÍNDICE DE FIGURAS	16
.....	ÍNDICE GENERAL	16

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	VI
ANEXO	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES GENERALES	1
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. ANTECEDENTES	3
1.2.1. <i>Papaya, origen e importancia</i>	3
1.2.2. <i>Clasificación taxonómica de papaya</i>	4
1.2.3. <i>Características botánicas</i>	4
1.2.4. <i>Producción en México y problemática fitosanitaria</i>	6
1.2.5. <i>Los virus fitopatógenos y su importancia en la agricultura</i>	9
1.2.5.1. <i>Movimiento del virus en la planta</i>	12
1.2.5.2. <i>Transmisión de los virus</i>	13
1.2.5.3. <i>Transmisión por propagación vegetativa</i>	13
1.2.5.4. <i>Transmisión mecánica</i>	14
1.2.5.5. <i>Transmisión por semilla</i>	14
1.2.5.6. <i>Transmisión por insectos</i>	15
1.2.6. <i>PMeV, origen y distribución</i>	16
1.2.6.1. <i>Etiología</i>	16
1.2.6.2. <i>Síntomas</i>	17
1.2.6.3. <i>Mecanismo de infección del PMeV</i>	18
1.2.7. <i>Hospederos de PMeV</i>	20
1.2.8. <i>Distribución del PMeV</i>	20
1.2.9. <i>Transmisión de PMeV</i>	21
1.3. HIPÓTESIS	23
1.4. OBJETIVOS	23

1.4.1.	General	23
1.4.2.	Específicos	23
1.5.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
1.5.1.	Transmisión de P _{MeV} por semillas	24
1.5.2.	Dispersión de P _{MeV}	25
1.6.	JUSTIFICACIÓN.....	26
1.7.	REFERENCIAS	27
CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN DE P_{MEV} POR SEMILLA.		35
2.1.	INTRODUCCIÓN	35
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.2.1.	Selección de semillas	37
2.2.2.	Germinación de semillas	37
2.2.2.1.	Trasplante a la casa sombra.....	38
2.2.2.2.	Manejo integrado del experimento y monitoreo de condiciones ambientales	38
2.2.2.3.	Monitoreo de condiciones ambientales	38
2.2.3.	Toma de muestras	38
2.2.3.1.	Extracción de Ácidos nucleicos a partir de látex.....	39
2.2.3.2.	Extracción de ARN total en semillas.....	39
2.2.3.3.	Síntesis de ADNc (Transcripción Reversa)	40
2.2.4.	PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	40
2.2.4.1.	Iniciadores del gen actina.....	40
2.2.4.2.	Iniciadores específicos a P _{MeV}	41
2.3.	RESULTADOS	42
2.3.1.	Germinación de semillas	42
2.3.2.	Monitoreo meteorológico y control fitosanitario	43
2.3.3.	Diagnóstico del P _{MeV}	44
2.4.	DISCUSIÓN	55
2.5.	REFERENCIAS	57
CAPÍTULO 3. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DEL P_{MEV}		61
3.1.	INTRODUCCIÓN	61
3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
3.2.1.	Establecimiento de parcelas experimentales.....	63

3.2.2.	Monitoreo de condiciones ambientales.....	65
3.2.3.	Toma de muestras	65
3.2.4.	Extracción de ácidos nucleicos	66
3.3.	RESULTADOS	66
3.3.1.	Monitoreo condiciones ambientales	66
3.3.2.	Análisis de la dispersión de PMeV en huerto comercial.....	67
3.3.3.	Incidencia del PMeV en una huerta comercial bajo control fitosanitario.....	71
3.3.4.	Distribución de PMeV en México.	73
3.3.5.	Mapa de la Zona Sur.	75
3.3.6.	Mapa de la Zona del Golfo.....	76
3.3.7.	Mapa de la Zona del Centro.	77
3.3.8.	Mapa de la Zona del pacífico.....	78
3.4.	DISCUSIÓN	79
3.5.	REFERENCIAS	81
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....		83
4.1.	DISCUSIÓN GENERAL.....	83
4.2.	CONCLUSIONES	86
4.3.	PERSPECTIVAS	87
4.4.	REFERENCIAS	88
ANEXOS		90

Índice de figuras

Figura 1-1 Principales síntomas del PMeV	18
Figura 2-1. A) Porcentaje de germinación de cada uno de los tratamientos; B) Vigor de las plántulas provenientes de MSG1 y MQ217. MSG1: Semillas sanas certificadas MSG1; MQ217: semillas procedentes de frutos enfermos.	43
Figura 2-2. Temperaturas y Humedad relativa de la casa sombra	44
Figura 2-3. Amplificación con los iniciadores que amplifica el gen de actina en semillas certificadas y en semillas provenientes de diferentes frutos enfermos.	45
Figura 2-4. Amplificación con los iniciadores CBL38/39 de las plantas provenientes de semillas certificadas y de semillas provenientes de frutos enfermos.	46
Figura 2-5. Plantas en la casa sombra.....	48
Figura 2-6. Amplificación con los iniciadores CBL38/39 en semillas sanas y semillas provenientes de frutos enfermos.	49
Figura 2-7. Amplificación con los iniciadores CBL38-CBL39 en semillas sanas y en semillas provenientes de diferentes frutos enfermos.....	50
Figura 2-8. Amplificación con los iniciadores CBL38-CBL39 en semillas certificadas y en semillas provenientes de diferentes frutos de diferentes estados.	51
Figura 2-9. Amplificación con los iniciadores CBL38-CBL39 en testa y embrión en semillas provenientes de diferentes frutos diagnosticado positivos a PMeV.....	52
Figura 2-10. Sintomatología característica de la enfermedad “lloroso” de la papaya ocasionada por el PMeV.....	52
Figura 2-11. Detección del PMeV en la cavidad del fruto.....	53
Figura 3-1. Ubicación de las parcelas experimentales dentro de la SPR Quizás.....	63
Figura 3-2. Ubicación de la plantación en la SPR Much-Meyá (15 ha) bajo manejo fitosanitario durante el periodo de noviembre 2011 a abril 2012.....	65
Figura 3-4. Distribución de PMeV en las parcelas experimentales en el primer muestreo.	68
Figura 3-5. Incidencia de PMeV en las parcelas experimentales (2011-2012)	70

Figura 3-6. Diagnóstico de PMeV en huerta de Much Meyá en el quinto muestreo..... 72

Figura 3-7. Distribución del PMeV en la huerta Much Meyá..... 73

Figura 3-8. Municipios muestreados a nivel nacional con su resultado al Virus de la Meleira de la Papaya. 74

Figura 3-9. Municipios muestreados en la zona sur de México 75

Figura 3-10. Municipios muestreados en la zona del Golfo de México..... 76

Figura 3-11. Municipios muestreados en la zona centro de México con su resultado al Virus de la Meleira de la Papaya..... 77

Figura 3-12. Municipios muestreados en la zona del Pacífico de México con su resultado al Virus de la Meleira de la Papaya..... 78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1-1. Clasificación taxonómica de papaya	4
Cuadro 1-2. Principales Estados productores de papaya en México	6
Cuadro 1-3. Principales plagas que afectan el cultivo de papaya en el mundo.	7
Cuadro 1-4. Principales enfermedades bacterianas en el cultivo de papaya en el mundo	8
Cuadro 1-5. Principales enfermedades causadas por hongos en papaya en el mundo.	8
Cuadro 1-6. Principales Virus que afectan al cultivo de papaya en el mundo	9
Cuadro 2-1. Plantas analizadas en los diferentes tratamientos	47
Cuadro 3-1. Porcentaje de incidencia por línea en las tres parcelas de papaya	69
Cuadro 3-2. Evaluación de PMeV en la huerta comercial bajo control fitosanitario (SPR Much Meyá).	72

ANEXO

Anexo 1. Extracción de ARN

Anexo 2. Síntesis de ADNc

ABREVIATURAS

ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
PMeV	Papaya Meleira Virus
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
dsARN	Ácido ribonucleico de doble cadena
Kb	Kilobase
Pb	Pares de bases
Kda	KiloDalton
nm	nanómetros
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
μl	microlitro
rpm	revoluciones por minuto
NTC	No contiene ADN molde
ml	mililitros
TBE	Tris-Borato-EDTA
mM	milimolar
μM	micromolar
SPR	Sociedad productora rural
p/v	Peso/volumen
ADNc	ADN complementario

RESUMEN

México es uno de los principales productores de papaya (*Carica papaya* L.) a nivel mundial, este cultivo está amenazado por una nueva enfermedad conocida como el "lloroso" de la papaya, caracterizada por la exudación espontánea de látex en los frutos que, al oxidarse, forma costras que provocan la pérdida de su valor comercial. El agente causal de esta enfermedad es un virus de ARN bicatenario denominado *Papaya Meleira Virus* (PMeV), que fue reportado en Brasil desde 1980, donde causó grandes pérdidas. En 2009 el laboratorio GeMBio detectó por primera vez la presencia de este virus en la Península de Yucatán. En la actualidad existe poca información sobre el PMeV, tanto acerca de sus mecanismos de transmisión, como de su estado en México.

Se realizó el estudio de la transmisión del PMeV por semillas de papaya, la distribución del PMeV en dos plantaciones comerciales bajo diferentes esquemas de manejo y se realizó un muestreo en diez estados productores de papaya para detectar si el PMeV estaba presente en ellos. Se demostró que el PMeV es transmitido por la semilla de papaya y el virus fue encontrado en ocho de los principales estados productores de papaya muestreados. También se demostró que el PMeV puede ser controlado si se implementan las estrategias de manejo fitosanitarias recomendadas por el laboratorio GeMBio.

ABSTRACT

Mexico is one of the leading producers of papaya (*Carica papaya* L.) worldwide. This crop is threatened by a new disease known as papaya sticky disease, characterized by spontaneous exudation of latex in the fruit that, when oxidized, forms scabs that cause loss of commercial value. The causal agent of this disease is a dsRNA virus called Papaya Meleira Virus (PMeV), which was reported as causing great losses in Brazil since 1980. In 2009, the GeMBio laboratory detected, for the first time, the presence of this virus in the Yucatan Peninsula. At present there is scarce information on PMeV concerning both its transmission mechanisms and its nationwide status.

This work studied the transmission of PMeV by papaya seeds, PMeV distribution in two commercial plantations under different management schemes. In addition, a sampling was made in ten papaya producer states for determining the presence or absence of PMeV in them. It was found that PMeV is transmitted by papaya botanical seed. Besides, the presence of the PMeV was found in eight of the mayor papaya producer states. It was also observed that PMeV can be controlled implementing the phytosanitary management strategies provided by the GeMBio laboratory.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. Introducción

La enfermedad conocida como Meleira, sticky disease o "lloroso", es un problema importante en el cultivo de papaya (*Carica papaya* L.), ya que puede ser capaz de causar la pérdida total de la producción en las plantaciones afectadas. El agente causal de la enfermedad del lloroso, es el virus de la meleira de la Papaya (PMeV), cuyo genoma es de ARN de doble cadena (dsARN) y su tamaño es de aproximadamente 12Kb (Kitajima *et al*, 1993; Zambolim *et al*, 2003). Se ha encontrado al PMeV en los conductos lactíferos de la planta, donde propicia un desequilibrio osmótico que se refleja en la disminución de los niveles de potasio en las membranas, dando como consecuencia la ruptura de las células y la exudación espontánea del látex, que es el síntoma distintivo de la enfermedad. (Rodrigues *et al.*, 2009c).

Además de la exudación del látex y la subsecuente oxidación de éste al estar en contacto con el ambiente, que da como resultado la formación de costras sobre la superficie de los frutos; se pueden observar otros síntomas en las plantas, como manchas necróticas en las hojas jóvenes y manchas en la pulpa del fruto (Kitajima *et al*, 1993; Zambolim *et al*, 2003 y Ventura *et al.*, 2004). Varios de estos síntomas relacionados con la enfermedad fueron observados por primera vez en los estados de Campeche y Quintana Roo, México en el año 2008, y con la posterior detección molecular por parte del laboratorio GeMBio del CICY, se dio a conocer la presencia del PMeV en México.

En la actualidad no se conoce ningún cultivar de papaya que sea resistente a PMeV. Generalmente la única estrategia de control de la enfermedad es mediante la identificación visual de las plantas enfermas y su erradicación (raleo) (Ventura *et al*. 2004). Sin embargo el diagnóstico visual es impreciso ya que se ha detectado molecularmente el PMeV en plantas asintomáticas, esta situación posibilita la presencia de fuentes de inóculo de PMeV en las plantaciones de papaya y su rápida diseminación (Ventura *et al.*, 2004). A pesar del tiempo que ha estado presente esta enfermedad en

Brasil, hay pocos estudios sobre su epidemiología y los resultados obtenidos no son concluyentes. (Rodrigues *et al*; 2009a). Esto hace difícil implementar medidas de control de la enfermedad.

De acuerdo a lo observado en las plantaciones comerciales afectadas por el PMeV en México, en donde se pudo constatar que la distribución de las plantas positivas no presentaba un patrón que pudiera evidenciar la posible presencia de algún vector, aunado a que los productores tomaban semillas de frutos enfermos y las nuevas plantaciones alcanzaban una incidencia mayor al 50%, se desprende la hipótesis de que PMeV puede ser transmitido por semilla.

Por lo que los objetivos de este trabajo fueron conocer la posible transmisión del PMeV, por semilla y la distribución del virus en plantaciones comerciales y en diferentes estados productores. Esto permitirá implementar estrategias de manejo fitosanitario enfocadas al control y a la prevención de la diseminación del "loroso" de la papaya, para evitar pérdidas económicas que puedan afectar la producción del fruto de la papaya.

1.2. Antecedentes

1.2.1. Papaya, origen e importancia

La Papaya (*Carica papaya* L.), es considerada una de las frutas más importantes a nivel mundial. Esta planta es originaria de Centroamérica y del sur de México. Sus semillas se distribuyeron en el Caribe y el sudeste de Asia durante la exploración española en el siglo XVI. Posteriormente la especie fue introducida en la India y en África (Villegas, 1997; Fitch, 2005 y Teixeira da Silva *et al.*, 2007). En la actualidad, el 68% de la producción total de este fruto se concentra en seis países de las regiones tropicales y subtropicales del planeta, destacando Brasil, India, República Dominicana, Nigeria, Indonesia y México, con una producción que varía entre 1800 y 621 millones de toneladas del fruto (FAOSTAT, 2011).

La importancia económica de este cultivo se debe a su alto valor nutritivo y propiedades medicinales, lo que representa gran utilidad en el sector industrial (Jiménez, 2002). La mayor demanda de papaya se da en su estado fresco o procesado, que puede ser en forma de jugo, néctares, vinos, mermeladas, trozos de almíbar, entre otros. (Pantoja *et al.*, 2002). De los tallos y las hojas se obtienen pequeñas cantidades de carpaina (alcaloide estimulante del ritmo cardíaco) y del látex de los frutos verdes, se extrae la papaína, enzima proteolítica, que es utilizada en la industria alimenticia como ablandador de carnes y también en la clarificación de cervezas y otras bebidas, además de formar parte de suplementos alimentarios. En la industria cosmética, se aprovecha su poder cicatrizante y para desmanchar. En la industria farmacéutica se utiliza para tratar males hepáticos, problemas digestivos y dolores lumbares. La papaína también es utilizada en los laboratorios oftalmológicos para elaborar un producto para la limpieza de lentes de contacto (Mandujano, 2007).

1.2.2. Clasificación taxonómica de papaya

La clasificación taxonómica de *Carica papaya* L, según USDA, (2011), es la siguiente:

Cuadro 1-1. Clasificación taxonómica de papaya

Reino	Plantae
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Dillenidae</i>
Orden	<i>Violales</i>
Familia	<i>Caricaceae</i>
Género	<i>Carica</i>
Especie	<i>Carica papaya</i> L.

La papaya pertenece a la familia *Caricaceae* que comprende seis géneros con origen en América tropical: *Vasconcella* (21 especies), *Carica* (21 especies), *Jacaratia* (nueve especies), *Jarilla* (tres especies), *Horovitzia* (una especie) y el género *Cylicomorpha* (dos especies) con origen en África ecuatorial. El género de mayor importancia es *Carica*, y dentro de las 21 especies que componen el mismo, *Carica papaya* L. es la más importante y cultivada (Nishijima *et al.* 1998 y Badillo 2000).

1.2.3. Características botánicas

Carica papaya es un frutal tropical, que puede crecer hasta 6 m. El tallo cuya altura y grosor depende de la variedad, es hueco, cónico, rara vez ramificado, y posee la

característica muy peculiar de mostrar, de manera conspicua, las cicatrices que dejan sus hojas al caer. Las hojas son grandes, largas, anchas y palmadas, sostenidas por un largo pecíolo tubular que sale del tallo (Malo *et al.*, 1994 y Jiménez, 2002). Se pueden encontrar plantas de papaya con flores masculinas, femeninas y hermafroditas (Samson, 1991). El tipo de planta depende del estado sexual, el cual se determina en la floración. La planta masculina se caracteriza por tener un racimo floral largo con varias inflorescencias, no producen frutas, salvo que debido a bajas temperaturas ($\leq 15^{\circ}$ C.) ocurra la conversión de la flor masculina a hermafrodita (Ibar, 1979). Su importancia está limitada a la siembra para polinización de plantas femeninas. Esto es una práctica cada vez menos usada, debido a la mayor demanda por plantas femeninas y hermafroditas (Nishijima *et al.* 1998 y Jiménez, 2002) y a que se han desarrollado marcadores moleculares para determinar el sexo en las plántulas (Ming *et al.*, 2007).

Las plantas femeninas tienen flores individuales, más grandes que las masculinas, y necesitan la presencia de plantas masculinas o hermafroditas para su polinización. Las flores femeninas tienen la forma de una pera cuando están cerradas y producen frutos redondeados (Jiménez, 2002). Las plantas hermafroditas poseen flores bisexuales individuales, cuya forma es tubular cuando están cerradas. Son las de mayor importancia y las preferidas por los productores, ya que la fruta de este tipo de planta es de forma alargada, lo que facilita su manejo y empaque (Chia, 1989). El fruto es una baya que se encuentra en las axilas de las hojas y se caracteriza por presentar alto contenido de vitaminas A, B₁, B₂ y C. Su tamaño y forma son específicos para cada cultivar (Jiménez, 2002). La semilla de papaya es de forma ovoide, de color marrón oscuro en la madurez, con un tamaño entre 4 y 6 mm. El hilo es conspicuo, de color amarillo claro, y el micrópilo se encuentra muy próximo al hilo. El funículo es evidente, prominente y grueso, con una longitud entre 0,5 y 1 cm, y las semillas se encuentran unidas a él en posición parietal. La rafe es fácilmente apreciable, a manera de cicatriz (Gil y Miranda, 2005).

Debido a que proviene de un rudimento con dos tegumentos, la semilla de papaya es bitementada. La exotesta (sarcotesta) es carnosa y jugosa, la mesotesta es oscura, rugosa y dura. El endospermo es entero, con superficie lisa, suave y de consistencia

carnosa, y presenta posición externa debido a que rodea por completo al embrión. El embrión presenta división axial y subdivisión folial, de forma espatulada, con cotiledones rectos que no cubren la radícula (Gil y Miranda, 2005).

1.2.4. Producción en México y problemática fitosanitaria

En México en el año 2011 se cultivaron alrededor de 16, 984.43 hectáreas, con una producción de 634,368.99 toneladas de papaya, lo cual lo convirtió en el país que más exportó esta fruta en ese año (SIAP, 2011). Actualmente, se dedican cerca de siete mil productores a la producción de papaya, destacando los estados de Chiapas, Veracruz y Oaxaca como los principales productores de este fruto (Cuadro 1.2).

Cuadro 1-2. Principales Estados productores de papaya en México (SIAP, 2011)

Posición	Estado	Producción (Ton)
1	Chiapas	140,721.50
2	Veracruz	115,056.50
3	Oaxaca	113,705.25
4	Colima	59,134.31
5	Guerrero	45,180.30
6	Michoacán	45,147.26
7	Yucatán	18,424.50
8	Tabasco	16,257.00
9	Quintana Roo	13,122.25
10	Campeche	13,077.95
11	Jalisco	12,383.20

La producción de papaya en México es una alternativa económica atractiva para el sector agrícola, esto se debe a la rentabilidad que proporciona a los productores dedicados a

este cultivo (FAOSTAT, 2011). Sin embargo, ellos se enfrentan a diversos factores que afectan la plantación y la calidad de los frutos poscosecha, principalmente los de carácter fitosanitario, a nivel mundial la producción de papaya se ve afectada por hongos, virus, bacterias y plagas (Ventura *et al.*, 2004).

Cuadro 1-3. Principales plagas que afectan el cultivo de papaya en el mundo.

Nombre común	Nombre científico
Mosca de la fruta	<i>Toxotrypana curvicauda</i> , <i>Ceratitis capitata</i> (Pantoja <i>et al.</i> , 2002; SAGARPA, 2005; Guzmán <i>et al.</i> , 2008)
Mosca blanca	<i>Trialeuroides variabilis</i> , <i>Bemisia tabaci</i> (Pantoja y Peña 2007)
Araña roja	<i>Tetranychus urticae</i> , <i>Tetranychus cinnabarinus</i> (Martins, 2003; SAGARPA, 2005; Guzman <i>et al.</i> , 2008)
Chicharrilla verde	<i>Empoasca sp</i> (SAGARPA, 2005)
Piojo harinoso	<i>Paracoccus marginatus</i> (Texeira da Silva <i>et al.</i> , 2007)
Trips	<i>Thrips tabaci</i> (Texeira da Silva <i>et al.</i> , 2007).
Gusano de cuerno	<i>Erinnys ello</i> (SAGARPA, 2005)

Cuadro 1-4. Principales enfermedades bacterianas en el cultivo de papaya en el mundo (American Phytopathological Society, 2009).

Enfermedad	Agente causal
Cáncer bacterial	<i>Erwinia sp.</i>
Mancha foliar bacterial	<i>Pseudomonas caricae-papayae</i>
Marchitez bacteriana	<i>Pseudomonas solanacearum</i>
Pudrición negra	<i>Erwinia cypripedii</i>
Amarillamiento interno	<i>Enterobacter cloacae</i>
Tinción púrpura	<i>Erwinia herbicola</i>

Cuadro 1-5. Principales enfermedades causadas por hongos en papaya en el mundo. (Teixeira da Silva *et al.*, 2007; Tapia-Tussell *et al.*, 2008; American Phytopathological Society, 2009).

Enfermedad	Agente causal
Antracnosis	<i>Colletotrichum gloeosporioides, C. capsici</i>
Pudrición de la raíz	<i>Pythium sp; Fusarium sp</i>
Mancha foliar	<i>Corynespora cassicola</i>
	<i>Asperisporium caricae</i>
Mancha blanca	<i>Cercospora papayae</i>
Tizón interior	<i>Cladosporium sp.</i>

Cuadro 1-6. Principales Virus que afectan al cultivo de papaya en el mundo (Ventura *et al.*, 2004 y APS, 2009).

Agente causal	Síntomas
Papaya Ring Spot Virus (PRSV)	Deformación de hojas. Amarillamiento y aclaramiento de las nervaduras. Formación de anillos en la fruta. Disminución de la producción
Papaya Meleira Virus (PMeV)	Exudación de látex en los frutos verdes, formación de costras en los mismos, necrosis en peciolo y hojas nuevas. Disminución de la calidad de los frutos.
Papaya Mosaic Virus (PapMV)	Aclaramiento de las nervaduras. Mosaico en hojas. Crecimiento ligeramente retardado de la planta.
Papaya Lethal Yellowing Virus (PLYV)	Amarillamiento de las hojas jóvenes y caída de las mismas. Mancha amarilla en los frutos.

1.2.5. Los virus fitopatógenos y su importancia en la agricultura

Los virus son parásitos obligados, que sólo se multiplican en el interior de las células de su hospedero y están formados por partículas ultramicroscópicas, cuyo genoma puede estar compuesto por: ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla o de doble cadena, o por ácido desoxiribonucleico (ADN) de cadena sencilla o cadena doble. En todos los casos el genoma se encuentra protegido por una cubierta proteínica. (Fauquet *et al.*, 2005). Dado que los virus vegetales son parásitos obligados, su ciclo de vida comienza con la penetración del virión a la célula. Los virus vegetales no pueden penetrar, se cree que el virión ingresa al citoplasma de la célula en forma pasiva, a través de heridas causadas por daño mecánico en la cutícula y pared celular. El paso siguiente en la

infección viral es la remoción parcial o total de la cubierta proteica del virión en el citoplasma. Luego, la célula interviene en la expresión del genoma viral proveyendo un aparato de transcripción (para los virus de ADN) y un aparato de traducción (para los virus de ARN). Los virus de ADN deben ser transportados al núcleo para la transcripción y de esta manera tener acceso a las proteínas celulares necesarias para la producción de ARN mensajero a partir de ADN viral. La traducción del ARN viral en el citoplasma produce proteínas virales que son necesarias para completar el ciclo de vida del virus (Schaad *et al.*, 1997; Denison, 2008).

Todos los virus deben formar al menos tres tipos de proteínas: proteínas de replicación esenciales para la producción de ácidos nucleicos, proteínas estructurales que conforman la cubierta proteica así como otros componentes de los viriones, y proteínas de movimiento que sirven de intermediarias en el transporte de los virus entre las células vegetales. Las proteínas de replicación viral se combinan con las proteínas celulares para producir un complejo de proteínas que fabrican múltiples copias del genoma viral. Estos nuevos genomas interactúan con las proteínas estructurales para formar nuevos viriones (Lewis *et al.*, 2003 y Talbot, 2004). Como consecuencia de lo anterior el metabolismo de las células vegetales infectadas por virus, se altera lo que induce el desarrollo de síntomas, que pueden variar desde simples cambios de color hasta necrosis severa o muerte de la planta, entre otras. En otros casos el efecto es casi imperceptible y se presenta el caso de los hospederos asintomáticos (Stange, 2006).

Los virus se encuentran entre los más importantes patógenos de plantas. El 90% de virus que afectan a plantas tienen su genoma de ARN y el 10% restante de ADN. Las infecciones por virus provocan una variedad de efectos adversos en las plantas, que van desde la reducción de la cosecha y calidad de los frutos hasta la muerte de la planta que desencadenan grandes pérdidas económicas (Fauquet *et al.*, 2005 y Cann 2005).

La importancia de estas pérdidas queda demostrada por los siguientes ejemplos de virus que limitan la producción de los cultivos de mayor importancia económica en el mundo: en África, el virus del hinchamiento de los brotes del cacao (*Cacao swollen shoot virus*) (Bowers *et al.*, 2001). En el sudeste asiático, la infección del arroz con el virus del tungro

del arroz (*Rice tungro virus*) generó grandes pérdidas (Hull 2002). El virus del marchitamiento manchado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*) que infecta a una amplia variedad de plantas, incluyendo tomate, maní y tabaco (Sherwood *et al.*, 2003). El virus Y de la papa (VYP) está ampliamente distribuido en todo el mundo, este virus afecta a las plantas de papa, chile, tomate y tabaco, causando considerables pérdidas en estos cultivos (Agris, 2005). Otro virus que causó grandes pérdidas es el Virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV Tomato yellow leaf curl virus) fue descubierto en las décadas 1930-1940 en Israel. Posteriormente, a finales de la década de 1980 comenzaron a presentarse los primeros reportes de este virus en América y Europa (Varma y Malathi, 2003; Accotto *et al.*, 2000). En Florida fue reportado por primera vez en 1997 y un año más tarde en ese mismo estado fueron registradas incidencias de 100 % de plantas con presencia del virus en campo (Polston *et al.*, 1999).

El virus de la tristeza de los cítricos (VTC) afectó de manera significativa a plantaciones de naranja dulce en Argentina y después en las principales plantaciones citrícolas de Brasil, posteriormente se encontró el virus en California, Florida y España, causando grandes pérdidas en la producción de cítricos (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

Un virus que causó pérdidas en el cultivo de papaya fue el Papaya rings spot virus (PRSV) que afectó a los principales países productores de papaya como: Brasil, México y Nigeria (Tripathi *et al.*, 2008)

La especificidad de los virus es muy variable, algunos virus son capaces de colonizar diferentes hospederos, mientras que otros sólo pueden infectar una especie definida, esto se debe a las intrincadas interacciones específicas con la maquinaria de la célula vegetal (Rodrigues *et al.*, 2009). Como resultado de diferentes mutaciones en el genoma viral, nuevas variantes de virus pueden emerger, mientras que otras pueden ser excluidas (Mangrauthia *et al.*, 2008; Jones 2009). Dando como resultado la aparición de cepas más virulentas que afectan considerablemente a la agricultura. Para poder llevar a cabo estrategias adecuadas para el control de enfermedades virales, se necesita tener un amplio conocimiento del proceso de infección del virus, así como de su efecto sobre las

plantas hospedantes. Con estos conocimientos se podrán reducir eventualmente la pérdidas del cultivo, (Ventura *et al.*, 2004).

El estudio de la epidemiología de una enfermedad viral nos puede indicar el (o los) mecanismo(s) de transmisión del virus fitopatógeno y con esto podremos tomar acciones para evitar la propagación del virus en las plantaciones y las posibles pérdidas que conlleva (Gilligan y van den Bosch, 2008, Rodrigues *et al.*, 2009).

1.2.5.1. Movimiento del virus en la planta

Los virus que afectan a las plantas usan diferentes estrategias que les permiten aumentar la infección en las células de la planta huésped. Estos procesos inician, con la replicación del genoma viral, que da como consecuencia la formación de nuevas partículas de virales (Hills *et al.*, 1987). En esta etapa, algunos virus son capaces de suprimir la maquinaria de defensa que utiliza la planta para resistir o eliminar la infección (Wang y Metzloff, 2005; Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2007). Entre las repercusiones que se conocen producto de la acción de los virus en las plantas están: la interferencia en la regulación del ciclo celular y en el tráfico celular (Crawford y Zambryski, 1999), así como la pérdida de la actividad fotosintética (Balachandran *et al.*, 1994).

La propagación del virus dentro de la planta se da de célula a célula (Taliany *et al.*, 2008), los plasmodesmos son los que permiten que las partículas virales puedan moverse desde el sitio de inoculación a las células adyacentes. Dado que los plasmodesmos son los que regulan el tráfico celular de las plantas, muchos virus producen proteínas de movimiento, que pueden aumentar el diámetro de los canales plasmodemáticos y posibilitan el movimiento viral para infectar otras células (Lucas, 2006). La mayoría de los virus se encuentran en los vasos del floema, y se transportan a otros órganos de la planta (Kehr y Buhtz, 2008). En esta etapa, muchas partículas están disponibles para ser transmitidas a otra planta, mediante un vector. Las plantas pueden combatir la infección si los mecanismos de resistencia generales se activan o si poseen genes de resistencia, contra los virus invasores (Baker *et al.*, 1997).

1.2.5.2. Transmisión de los virus

La propiedad de transmitirse de una planta enferma a una sana, es una característica fundamental de los virus al igual que otros agentes biológicos que causan enfermedades. Los virus, a diferencia de hongos y bacterias, no tienen la capacidad de diseminarse por el viento o el agua, porque fuera de las células se inactivan con rapidez, además, no pueden penetrar a la planta por sus propios medios y requieren que se les deposite directamente dentro de una célula (Lewis *et al.*, 2003 y Talbot, 2004). Dada su condición de parásitos obligados, los virus no se pueden desarrollar en materia orgánica muerta; requieren del albergue en tejido vivo, ya sea en estado de reposo o de multiplicación activa. El Virus Mosaico del Tabaco (VMT) constituye una de las pocas excepciones, ya que puede sobrevivir en restos de tejidos infectados que quedan en el campo después de la cosecha, de tal manera que estos materiales sirven como fuente de inóculo primario en el siguiente ciclo. Los virus requieren pasar constantemente de un hospedante infectado a otro sano, para poder sobrevivir en cualquier región (Dickson, 2005).

Los virus no penetran a las plantas de manera directa, ni salen de estas por sus propios medios. La dispersión es pasiva y se da mediante diferentes mecanismos de transmisión (Dickson, 2005). Las formas en que los virus son transmitidos de plantas enfermas a plantas sanas son a) por la propagación vegetativa; b) mecánicamente; c) por semilla; y d) por vectores.

1.2.5.3. Transmisión por propagación vegetativa.

Generalmente cuando las plantas se propagan vegetativamente (por yemas, esquejes, tubérculos, bulbos o rizomas), si la planta “madre” está infectada por un virus, éste se transmitirá a través de los propágulos a las nuevas plantas obtenidas. Tomando en cuenta que casi todas las frutales, varias hortalizas y la mayoría de los árboles de ornato, así como muchos otros cultivos se propagan vegetativamente, este tipo de transmisión adquiere importancia significativa (Carter y Saunders, 2007).

1.2.5.4. Transmisión mecánica.

Todos los virus de plantas pueden ser transmitidos mediante inoculación mecánica, pero eso no significa que puedan establecer la infección. En teoría las partículas virales pueden ser introducidas a células vivas por este método, pero para que el virus llegue a ser funcional depende de una gran variedad de condiciones como: el grado de susceptibilidad de la célula receptora, funcionamiento del genoma viral dentro de la célula, condiciones necesarias para la maduración del virus, factores ambientales, etc.

La transmisión mecánica es definida como el proceso por el cual las partículas virales son introducidas a una planta sana, mediante heridas producidas por instrumentos de labor o cualquier otra forma que permita la iniciación de la infección. Una vez que el virus penetra a la célula vegetal hospedante, comienza con la replicación del ARN y la traducción de proteínas; así como el ensamble y liberación de partículas virales en la célula hospedante (Talbot, 2004; Dickson, 2005 y Carter y Saunders, 2007). La transmisión mecánica puede ocurrir de manera natural (campo) y de forma artificial (laboratorio). En campo, dicha transmisión puede efectuarse entre plantas bastantes próximas al rozarse con el viento o cuando las plantas son dañadas por el hombre en las labores de cultivo (Talbot, 2004; Dickson, 2005 y Carter y Saunders, 2007). La transmisión mecánica artificial es de gran importancia a nivel experimental y se puede realizar de diferentes formas: frotis; simulación de lesiones y/o inyecciones.

1.2.5.5. Transmisión por semilla.

Cuando un virus infecta a una planta, invade todos los tejidos y puede llegar hasta la semilla. La evidencia más concluyente de que los virus se transmitían por medio de la semilla fue la presentada por Reddick y Stewart en 1919, cuando demostraron que las semillas de frijol, infectadas con el Virus Mosaico Común del Frijol, producían plantas infectadas desde un 10-90 %. Doolittle y Gilbert (1919), también demostraron que el Virus Mosaico del Pepino se transmitía por este medio en pepinillo. En la actualidad se sabe que alrededor del 20 % de los virus de plantas conocidos se transmiten a través de la semilla. La transmisión de virus por este medio ocurre cuando: el hospedante es infectado sistémicamente en la floración, el virus es capaz de invadir el polen y el óvulo, o es capaz

de sobrevivir en el gameto, también si sobrevive a la deshidratación de la semilla y al almacenamiento y durante el desarrollo de la semilla puede permanecer latente hasta que las condiciones favorables para el virus puedan permitir la infección (Talbot, 2004; Disckson, 2005 y Carter y Saunders, 2007).

La transmisión por semilla constituye uno de los factores más importantes en el desarrollo epidémico de algunas enfermedades virales. Las semillas infectadas dan origen a plántulas que constituyen la fuente de inóculo inicial, y que propician la distribución uniforme del virus. Las plántulas infectadas constituyen reservorios a partir de los cuales ocurre la dispersión secundaria del virus, lo cual sucede por transmisión mecánica o mediante vectores (Talbot, 2004 y Disckson, 2005). La gran mayoría de los virus que se transmiten por semilla, persisten en el embrión; el porcentaje de transmisión depende de la variante del virus, del hospedante, de las condiciones ambientales, entre otros factores, y su "longevidad" depende del hospedante, del inóculo, y de las condiciones y período de almacenamiento (Talbot, 2004 y Disckson, 2005).

1.2.5.6. Transmisión por insectos.

Los insectos constituyen el grupo de bio-transmisores más importante de los virus. La primera evidencia que se tuvo de la transmisión por este medio, fue la publicada por Takata en Japón (1895) y Takami (1901), donde se señaló que las chicharritas *Inzuma dorsalis* y *Nephotettix cinctipes*, estaban asociadas con el Virus Enanismo del Arroz. Más tarde Doolittle (1916) demostró que el pulgón *Aphis gossypii* transmitía al Virus Mosaico del Pepino. Botjes (1920) encontró que *Myzus persicae* podía transmitir al Virus del Enrollamiento de la Hoja de Papa. Actualmente se reconoce que más de 400 especies de insectos transmiten virus, y de todas estas especies *Myzus persicae*, es la más importante, ya que transmite alrededor de 85 virus diferentes. Las especies de insectos reportadas como transmisores de virus se encuentran principalmente en los órdenes Homóptera (pulgones, moscas blancas, chicharritas, escamas, psilidos, etc.); Thysanóptera (trips); Coleóptera (escarabajos); Orthóptera (chapulines); Dermáptera (tijeretas); Lepidóptera (palomillas y mariposas); Díptera (mosquitos) y Hemíptera (tingidos) (Carter y Saunders, 2007).

1.2.6. PMeV, origen y distribución.

La enfermedad conocida como Meleira o *sticky disease*, fue detectada por productores en huertos comerciales de Brasil en la década de 1970, sin embargo fue hasta diez años después, cuando la enfermedad mostró una mayor incidencia, que se iniciaron los estudios sobre ella (Lima *et al.*, 2001). Desde entonces se considera uno de los principales problemas fitosanitarios en este cultivo en ese país, debido a que en áreas afectadas por el virus se alcanzó hasta el 100% de incidencia. En la actualidad esta enfermedad afecta a todos los estados de Brasil donde se produce la papaya (Ventura *et al.*, 2004).

En México en el año del 2008 se observaron síntomas similares al del PMeV, pero fue hasta su posterior diagnóstico molecular mediante la extracción de los ácidos nucleicos que se confirmó por primera vez la presencia del PMeV en México. En la actualidad se ha encontrado en siete estados productores de papaya (Campeche, Jalisco, Quintana Roo, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y Yucatán) (Pérez-Brito *et al.*, 2012).

1.2.6.1. Etiología

En un principio, los síntomas de la enfermedad se atribuían a la deficiencia en la absorción de calcio y boro, o al desbalance de estos elementos en el suelo y también se asociaron a estrés hídrico (Nakagawa *et al.*, 1987; Correa *et al.*, 1988). La primera evidencia de que esta enfermedad era de etiología viral, fue mostrada por Kitajima *et al.*, (1993), mediante análisis de microscopía electrónica, en el que se detectó en el látex de tallos y frutos, la presencia de partículas virales isométricas, de 50 nm de diámetro. Pero esto no fue confirmado hasta diez años después, cuando se purificó el virus y se obtuvo la reproducción de los síntomas en plantas sanas, a través de los postulados de Koch. En dicho estudio se determinó que las partículas virales isométricas eran de dos tipos: "llenas" de 42 nm y "vacías" de 38 nm; y que el genoma viral consiste en una sola molécula de ARN de doble cadena (dsRNA) de 12 kb, así mismo que las proteínas de la cápside varían en tamaño de 14.4 a 45 KDa. Este virus, que sólo se puede detectar en el látex, aún no ha sido clasificado, y se considera que podría representar un nuevo grupo

de virus, del cual no se ha encontrado similitud entre los virus que infectan a procariotes y eucariotes (Zambolim *et al.*, 2003).

Posteriormente, se llevaron a cabo pruebas bioquímicas para detectar posibles cambios que fueran inducidos por PMeV en el látex y se encontró que el látex de las plantas infectadas presentaba un aumento en el contenido de agua, mientras que los niveles de azúcar disminuyeron en comparación con el de las plantas sanas (Rodrigues *et al.*, 2009a).

1.2.6.2. Síntomas

El primer síntoma observado en los frutos verdes, es una exudación abundante de látex acuoso, que debido a la oxidación pronto oscurece, y por lo cual la superficie del fruto presenta costras de color café. El látex de los frutos infectados se caracteriza por escurrir con mayor facilidad, y demorar en solidificarse, en comparación con el látex de frutos sanos. Otros síntomas observables en las plantas enfermas, son la presencia de manchas necróticas en los peciolo, en los bordes de las hojas nuevas y la presencia de pequeñas manchas internas en la pulpa de los frutos así como “mapeo” en el fruto (Figura 1.1) Zambolim *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2009a y Pérez-Brito *et al.*, 2012).

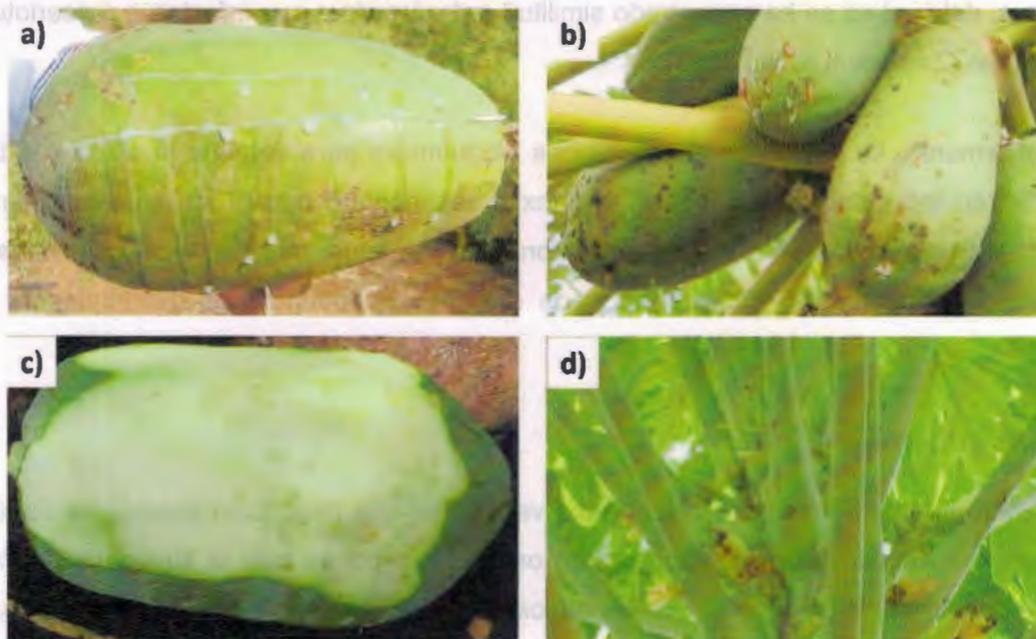


Figura 1-1 Principales síntomas del PMeV: a) Exudación espontánea; b) Frutos Manchados; c) pequeñas manchas en la pulpa; d) Manchas necróticas en el peciolo.

1.2.6.3. Mecanismo de infección del PMeV

Las plantas están expuestas a un gran número de fitopatógenos, sin embargo, a pesar de ser sésiles y de carecer de sistema inmune, la muerte de las plantas por enfermedad es una situación excepcional (Wenham *et al.*, 1986). Esto hace pensar que han desarrollado sistemas de defensa altamente efectivos para detener o contrarrestar la infección (Wenham *et al.*, 1986). Entre los mecanismo de defensa que usan comúnmente las plantas están las que evitan la entrada del patógeno a los tejidos, utilizando estrategias químicas. Lo cual consiste en la producción por parte de la planta de una gran diversidad de sustancias tóxicas para los patógenos tales como: alcaloides, fenoles, polifenoles, aceites esenciales y terpenos en general (Carver *et al.*, 1994; Mouch-Mani y Morschbacher *et al.*, 1990).

Entre estas sustancias toxicas también está el látex, que es un fluido complejo producido por muchas plantas y que es característico de la papaya. Esta sustancia es de

consistencia "lechosa", y coagula cuando se expone al aire, típicamente tiene color blanco, pero este puede variar en cantidad y en color, de acuerdo a la especie (Metcalf, 1967). Un caso específico es *Carica papaya*, que contiene látex en sus frutos y en el tallo de la planta, donde se han encontrado títulos muy altos de proteasas, que son tóxicos para algunos insectos, así como un medio hostil para los virus (Konno *et al.*, 2004). Sin embargo PMeV se detectó en los conductos lactíferos de las plantas, esto es algo inusual, ya que se han realizados estudios donde mencionan que las proteasas y cisteínas que están presentes en el látex son usados por la plantas como mecanismo de defensa anti-virales.

Se ha observado que las plantas infectadas con el PMeV producen una exudación espontánea y el látex no coagula fácilmente en comparación con las sanas, esto es debido a que las células de látex en las plantas enfermas presentan una reducción en número y su morfología es diferente, por lo que la coagulación es más retardada, esto se puede deber posiblemente a que el PMeV se une a las proteínas y bloquea los receptores que están involucrados en la agregación de las partículas de látex, lo que con lleva a que no coagule (Rodrigues *et al.*, 2009 y Rodrigues *et al.*, 2012).

Estudios realizados en látex de papaya con PMeV han demostrado que existen cambios bioquímicos en éste, ya que se determinó que hay una disminución de aproximadamente la mitad de la concentración de azúcares en comparación con el látex de plantas sanas (Rodrigues *et al.*, 2009). La infección de PMeV provoca un aumento en el nivel de potasio en el látex de papaya, posiblemente debido a la cambios en los niveles de K^+ en los conductos lactíferos, lo que a su vez aumenta la absorción de agua, lo cual ocasiona la ruptura espontánea de los conductos lactíferos que conlleva a la exudación de látex en los tejidos infectados (Bouteau *et al.*, 1999). Todos los cambios fisiológicos y bioquímicos anteriores (en la forma de las partículas del látex, disminución del contenido de azúcares y aumento en el agua de los conductos lactíferos) explican la principal sintomatología de la enfermedad (Bouteau *et al.*, 1999).

También se han encontrado en los conductos lactíferos de plantas positivas a PMeV una elevada producción de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), mecanismo de señalización de

infecciones virales en plantas. La producción del H_2O_2 se localizó en células adyacentes al floema que se relacionan con el transporte sistémico y en respuesta a estrés (Orozco *et al.*, 2001). El que el PMeV sea capaz de colonizar los conductos laticíferos de papaya, puede funcionar como una estrategia para desplazarse, dentro de la planta, así como el de infectar a otras células, la exudación espontánea del látex, le podría proporcionar al PMeV un mecanismo de transporte que permite la dispersión del virus en las plantaciones enfermas (Rodrigues *et al.*, 2011)

1.2.7. Hospederos de PMeV

Estudios realizados por Barbosa *et al.* (1998) en 47 hospederos de diferentes familias, indicaron que PMeV sólo es capaz de infectar a *Carica papaya*. Aún cuando estos autores encontraron ARN de doble cadena en *C. papaya* en *Brachiaria decumbes* y *Trichane insulares* (pastos que crece comúnmente cerca de los huertos de papaya en Brasil), los postulados de Koch mostraron que la única planta que desarrolló los síntomas de la infección fue la papaya.

1.2.8. Distribución del PMeV

Además de la transmisión del virus, ya han sido investigados algunos otros aspectos de la epidemiología de la enfermedad, en un trabajo sobre la evolución temporal de la Meleira, se detectó un aumento en el porcentaje de plantas sintomáticas, especialmente con necrosis en las hojas, conforme las temperaturas medias disminuían en la región de estudio (Tagitaba *et al.*, 2002). En cuanto a la distribución espacial de la enfermedad, se ha usado la técnica de secuencias ordinarias, para mostrar que las epidemias comienzan de manera aleatoria, pero tienden a la agregación dentro de las líneas de la plantación. El estudio del progreso y diseminación del patógeno es esencial para la correcta caracterización del mismo. El análisis del arreglo espacial nos permite entender la etiología, así como evaluar la eficiencia de su dispersión y generar información sobre la influencia de los factores culturales, biológicos y del ambiente de los patógenos y/o enfermedades (Rodrigues *et al.* 1989b).

1.2.9. Transmisión de PMeV.

Al observar la distribución de las plantas infectadas en plantaciones en Brasil, se sugirió que PMeV podría ser transmitido por algún vector o durante las labores agrícolas (Ventura *et al.*, 2004). Para conocer si el virus era transmitido por vectores, Vidal *et al.*, (2005), evaluaron la infección de las plantas de papaya con varias especies de insectos en condiciones de campo. Las plantas que desarrollaron los síntomas de la enfermedad y de las que se recuperó el ARN de doble cadena, fueron las expuestas a la mosca blanca *Bemisia tabaci* Biotipo B, lo cual indicó la posible transmisión del virus por vectores, específicamente por el insecto mencionado, aunque no se determinó la presencia del virus en los posibles vectores. También se han realizado estudios sobre la transmisión de PMeV por *Trialeurodes variabilis*, dando como resultado que esta mosquita no transmite el virus de plantas enfermas a plantas sanas y tampoco se determinó la presencia del virus en el insecto (Rodrigues *et al.*, 2009b).

En otro reporte de Rodrigues *et al.*,(2009b), se simuló lesiones mecánicas en plantas sanas para facilitar la infección por PMeV; sin embargo, no se obtuvieron resultados concluyentes que indiquen la efectividad de esta forma de transmisión, debido a que el látex solidifica rápidamente formando una barrera entre la lesión y el ambiente. Para verificar si existía otra vía de infección, las plantas fueron inyectadas directamente en el ápice resultando posible la transmisión del virus de esta forma.

En cuanto a la posible transmisión por semilla, sólo existen dos reportes , el primero que indica que el virus no se transmite de esta forma, sin embargo el diagnóstico se realizó en plantas a los 210 días de la siembra, utilizando el método de extracción de ácidos nucleicos (Meissner Filho *et al.*, 2003). Si se considera que estos autores hicieron un solo muestreo en un estadio en que las plantas aún están en proceso de fructificación, y que utilizaron una técnica de detección que necesita que haya un título viral considerable, no se puede asumir que este resultado sea concluyente.

El segundo reporte de la posible transmisión por semilla del PMeV fue realizado por Abreu *et al.*, (2012), donde evaluaron plántulas provenientes de semillas de frutos sanos y de

frutos enfermos, estas plántulas evaluadas tenían de 15-20 días después de su germinación. La presencia de virus se evaluó mediante la técnica RT-PCR convencional utilizando iniciadores específicos para PMeV, sin embargo las plántulas analizadas fueron negativas al PMeV. Sin embargo, los autores del trabajo sugieren que no se puede descartar del todo la transmisión del PMeV por semilla, esto es porque posiblemente la frecuencia de transmisión del virus puede ser muy baja, por lo que se requiere evaluar un mayor número de plántulas provenientes de semillas de frutos enfermos.

1.3. Hipótesis

El Papaya Meleira Virus es transmitido por semilla.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

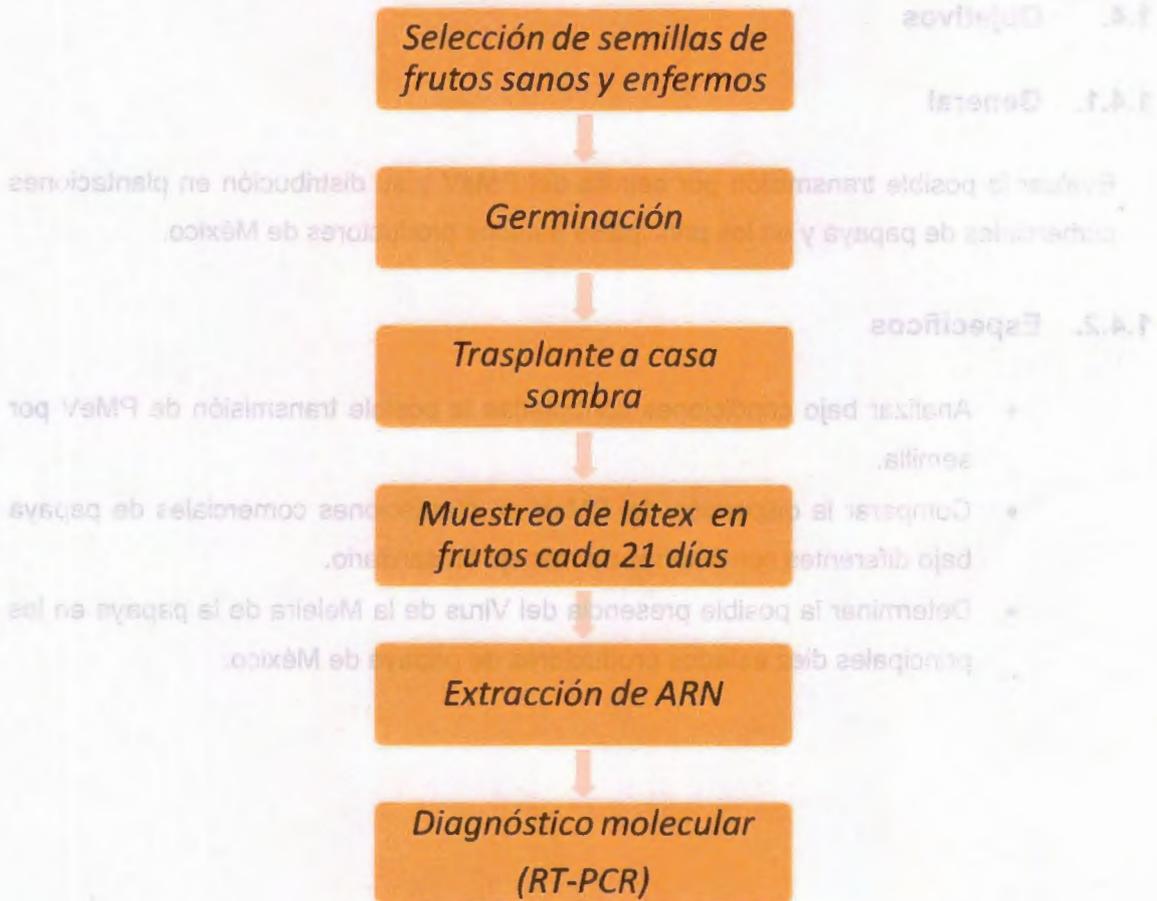
Evaluar la posible transmisión por semilla del PMeV y su distribución en plantaciones comerciales de papaya y en los principales estados productores de México.

1.4.2. Específicos

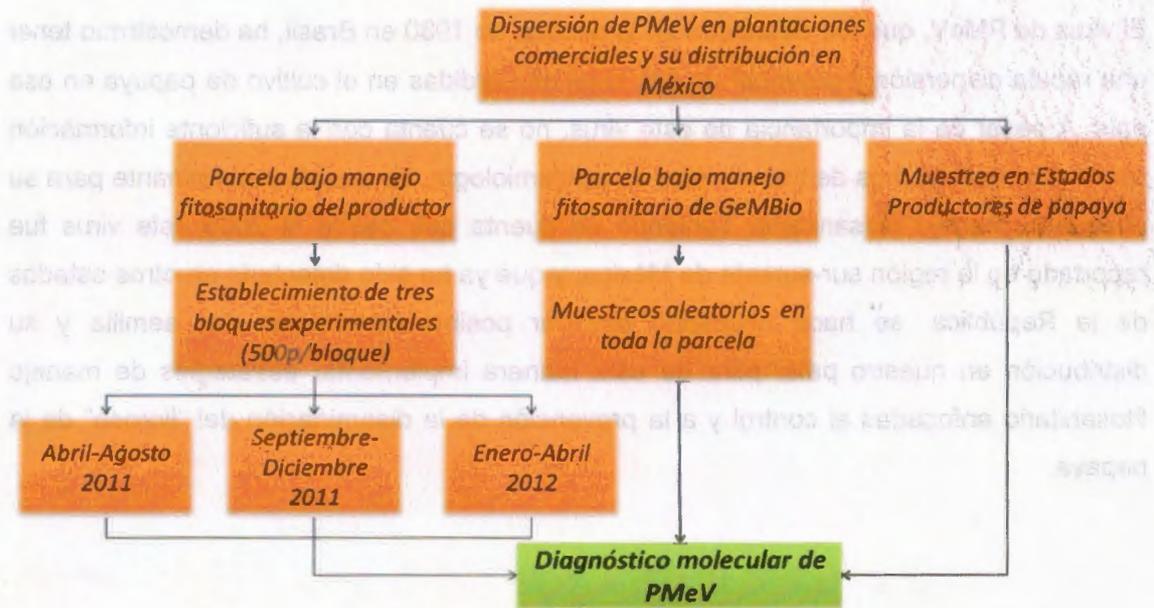
- Analizar bajo condiciones controladas la posible transmisión de PMeV por semilla.
- Comparar la dispersión del PMeV en plantaciones comerciales de papaya bajo diferentes condiciones de manejo fitosanitario.
- Determinar la posible presencia del Virus de la Meleira de la papaya en los principales diez estados productores de papaya de México.

1.5. Estrategia Experimental.

1.5.1. Transmisión de PMeV por semillas

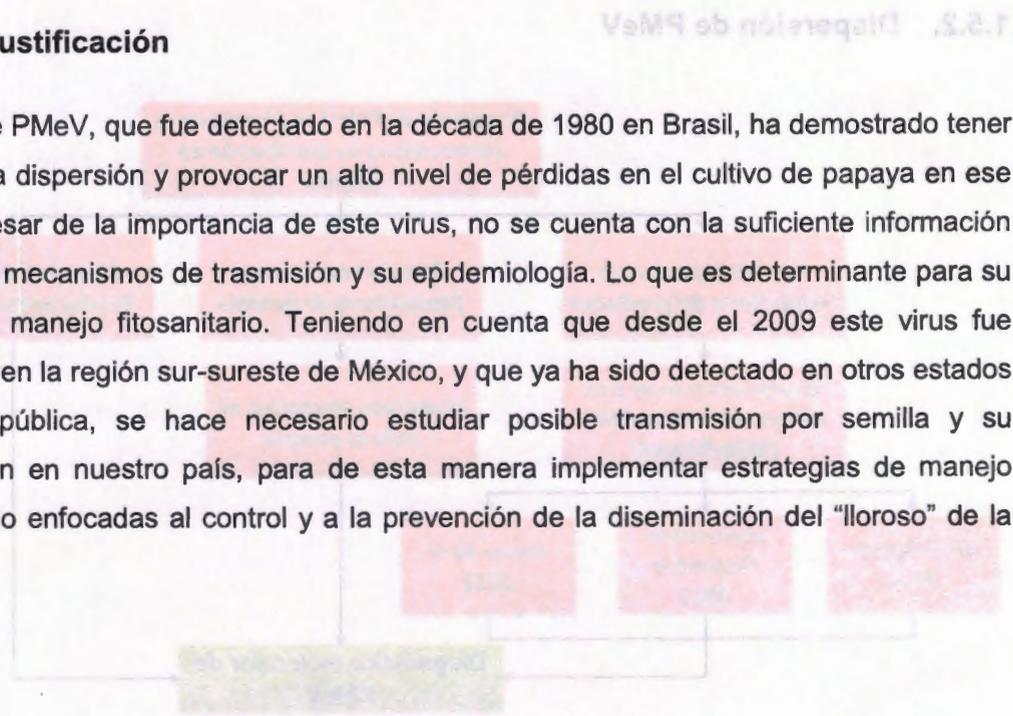


1.5.2. Dispersión de PMeV



1.6. Justificación

El virus de PMeV, que fue detectado en la década de 1980 en Brasil, ha demostrado tener una rápida dispersión y provocar un alto nivel de pérdidas en el cultivo de papaya en ese país. A pesar de la importancia de este virus, no se cuenta con la suficiente información sobre sus mecanismos de trasmisión y su epidemiología. Lo que es determinante para su adecuado manejo fitosanitario. Teniendo en cuenta que desde el 2009 este virus fue reportado en la región sur-sureste de México, y que ya ha sido detectado en otros estados de la República, se hace necesario estudiar posible transmisión por semilla y su distribución en nuestro país, para de esta manera implementar estrategias de manejo fitosanitario enfocadas al control y a la prevención de la diseminación del "lloroso" de la papaya.



1.7. Referencias

- Abreu P.M., J.G. Piccin, S.P. Rodrigues, D. S. Buss, J.A. Ventura, P.M. Fernandes (2012). Molecular diagnosis of Papaya meleira virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 180, 11-17.
- Accotto, G., J. Navas-Castillo, E. Noris, E. Moriones y D. Louro (2000). Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *Eur. J. Plant Pathol*, 106, 179-186.
- Agrios, G. N. 2005. *Fitopatología*. 2ª Edición. Limusa. México. Pp 838.
- American Phytopathological Society (APS) (2009). *Diseases of Papaya (Carica papaya L.)* <http://www.apsnet.org/online/common/names/papaya/asp>. Consultado 24-octubre-2012
- Badillo, V.M (2000). *Vasconcella St.-Hil. (Caricaceae)* con la rehabilitación de este ultimo. *Ernstia, Costa Rica*, 10, 74-79.
- Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz, S. P. Dinesh-Kumar (1997). Signaling in plant microbe interaction. *Science*, 276, 726-733.
- Balachandran. S., V. M. Hurry, S. E. Kelley, C. B. Osmond, S. A. Robinson, J. Rohozinski, G.G. R. Seaton, D. A. Sims (1997). Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 100, 203-213
- Barbosa, C. de J., P.E. Meissner Filho, T. C. Habibe, E. Patrocio, J. A. Ventura y O. J. Marques (1998). Distribuição de formas replicativas de vírus em plantas de mamoeiro afetadas pela meleira. In: "Congresso Paulista de Fitopatologia, 21, Botucatu-SP: FCA/GPF, 1998. *Anais Botucatu-SP: FCA/GPF*", 1998. p.64.
- Bar-Joseph, M., R. Marcus, R. Lee (1989). The Continuous challenge citrus tristeza virus control. *Ann. Rev. Phytopathol*, 27, 291-316.
- Bouteau, F., O. Dellis, U. Bousquet, J. P. Rona (1999). Evidence of multiple sugar uptake across the plasma membrane of laticifer protoplasts from *Hevea*. *Bioelectrochem Bioenerg*, 48, 135-139.

- Bowers, J.H., B.A. Bailey, P.K. Hebbar, S. Sanogo, and R.D. Lumsden (2001). The impact of plant diseases on world chocolate production. Online. Plant Health Progress DOI:10.1094/PHP-2001-0709-01-RV.
- Cann, A. J. (2005). Principles of molecular virology. Elsevier Inc. USA. Pp 315.
- Carter, J. y V. Saunders (2007). Virology: principles and applications. Ed. John Wiley & Sons Ltd. USA. Pp 358
- Carver, T. L. W., R. J. Zegen, W. R. Brashnell, M. P. Robbins (1994). Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol deshydrogenase increases quantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiohe graminis*). *Physiology and molecular plant pathology*, 44, 261-272.
- Chia, C. L (1989). The papaya industry in Hawaii. Proceedings of the Papua New Guinea First International Fruit Conference. Bala, A. A. Rebaul, Department of Agriculture and Livestock and PNG Fruit and Vegetable Advisory Board, p 121-128.
- Correa, F.J.F., B. J. D. C. Franco, H. S. Watanabe, M. Y. Sakayy, E. M. A. Yamashita (1988). Estudio preliminar sobre exsudacao do latex do mamoeiro-Teixeira de Freitas. 2º Simposio Brasileiro da Cultura do Mamoeiro. Jacoticabal: UNESP, 409-428.
- Crawford, K.M, P. C. Zambryski (1999). Plasmodesmata signaling: many roles, sophisticated statutes. *Curr. Opin. Plant Biol*, 2, 382-387.
- Denison M. R (2008). Seeking membranes: Positive-strand RNA virus replication complexes. *PLoS Biol*, 6 (10), 2098-2100.
- Dickson, M (2005). *Molecular plant pathology*. BIOS Scientific Publishers. London. Pp 273.
- FAOSTAT (2011). Consulta de bases indicadoras de producción mundial y comercio internacional de papaya. FAO [en línea]. Disponible en <http://faostat.fao.org>. Consultado 28 Octubre 2012.
- Fauquet, C.M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberg, y L. A. Ball (2005). *Virus taxonomy*. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Inc. USA, Pp 1273.
- Fitch, M.M.M. (2005). *Carica papaya, in: Biotechnology of Fruit and nuts crops*, Litz, R.E. (ed). CABI Publishing. Wallingford, Oxfordshire, pp 174-207.

- Gil, A. I. y D. Miranda (2005). Morfología de la flor y de la semilla de papaya (*Carica papaya* L.): variedad Maradol e híbrido Tainung-1. *Agronomía Colombiana*, 23 (2), 217-222.
- Gilligan, C.A., F. Van den Bosch (2008). Epidemiological models for invasion and persistence of pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 46, 385-418.
- Guzmán, R.E., A. R. Gómez, H. A. J. Pohlan, R.J. C. Álvarez, F.J.M. Pat y V. Geissen (2008). La producción de papaya en Tabasco y los retos del desarrollo sustentable. *El cotidiano*, 23, 99-106.
- Hills, G.H., K. A. Plaskitt, N. D. Young, D. D. Dunigan, J. W. Watts, T.M.A. Wilson, M. Zaitlin (1987). Immunogold localization of the intracellular sites of structural and nonstructural tobacco mosaic virus proteins. *Virology*, 161, 488-496.
- Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*. 4th Edition. Academic Press, San Diego, CA. pp 1800.
- Ibar, L. (1979). El cultivo del aguacate, chirimoya, mango y papaya. Editorial Aedos. Barcelona. España, pp 151-171.
- Jimenez D.J.A. (2002). Manual práctico para el cultivo de la papaya hawaiana. Guácimo, Costa Rica. EARTH, pp 108.
- Jones, R.A (2009). Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Res*, 141(2), 113-130.
- Kehr, J., A. Buhtz, (2008). Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J Exp Bot*, 59, 85-92.
- Kitajima, E.W., C. Rodrigues, J. Silveira, F. Alves, J. A. Ventura, F.J.L. Aragao, L.H.R. Oliveira. (1993). Association of isometric virus-like particles restricted to lactifers, with meleira (sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). *Fitopatologia Brasileira*, 8, 118-122.
- Konno, K., C. Hirayama, M. Nakamura, K. Tateishi, Y. Tamura, M. Hattori, K. Kohno (2004). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J*, 37, 370-378.
- Lewis, R., D. Gaffin, M. Hoefnagels, M. y B. Parker (2003). *Life*. The McGraw-Hill. USA, pp 2700

- Lima, R.C.A., J. A. A. Lima, M. T. Souza Jr., G. Pio-Ribeiro, G. y G. P. Andrade (2001). Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 26,689-702.
- Lucas, W.J. (2006). Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*, 344, 169-184.
- Malo, S.E., C. W. Campbell, C.F. Balerdi, J.H. Crane (1994). La papaya en Florida. Departamento de Horticultural Sciences, Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, (UF/IUFAS) <http://edis.ifas.ufl.edu>. acceso: 20-octubre-2012.
- Mandujano, B. R. 2007. Como cultivar papaya orgánica en México (en línea). http://vinulado.org/mercado/full/cultivo_organico_papaya_en_mexico.html. Consultado 29 Mayo 2011.
- Mangrauthia, S.K., B. Parameswari, R. K. Jain, S. Praveen (2008). Role of genetic recombination in the molecular architecture of Papaya ringspot virus. *Biochem Genet*, 46, 835-846.
- Martins, D. 2003. Manejo de pragas do mamoeiro, In: A cultura do mamoeiro: tecnologías de producao. Vitoria Incaper, 309-344.
- Meissner Filho, P. E., L.S. Santos, C.V. Moreira, A.I. Santos y T.C. Habibe (2003). Avaliacao da transmissao da Meleira pelas sementes de mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 28, S394. (Resumo).
- Metcalf, C.R (1967). Distribution of latex in the plant kingdom. *Econ. Bot*, 21, 115-127.
- Ming, Y., Q. Yu y P. Moore (2007). Sex determination in papaya. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18, 401-408.
- Morschbacher, B., U. Noll, L. Gorrichor, H. Reiseiner (1990). Specific Inhibition of lignifications breaks hypersensitive resistance of wheat stem rust. *Plant Physiology*, 93, 465-470.
- Mouch-Mani, B., A. J. Slurenko (1996). Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of Arabidopsis to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell*, 8, 203-212.

- Nakagawa, J., Y. Takayawa, Y. Suzakawa (1987). Exsudacao do latex pelo mamoeiro: estudo da ocorrencia em Texeira de Freitas, BA. Anais, 9º Congresso Brasileiro de fruticultura, Campinas-SP, 555-559.
- Nishijima, W. T., H. D. Ohr, R. C. Ploetz, K.G. Rohrbach, G. A. Zentmyer (1998). Compendium of Tropical Fruit Diseases. APS Press, Minnesota, USA, pp 88.
- Orozco-Cardenas, M. L., J. Narvaez-Vasquez, C. A. Ryan, 2011. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell*, 13, 179-191.
- Pantoja, A. y J. E. Peña (2007). Papaya Insects: Ecology and Control, *in*: Encyclopedia of pest management. Pimentel D. (Ed), Advisory Board Ithaca, New York 2, 440-444.
- Pantoja, A., P.A. Follet, J.A., Villanueva-Jiménez (2002). Pests of papaya, *in*: Tropical Fruit Pests and Pollinators: Biology, Economic Importance, Natural Enemies and Control. Pena J., J. Sharp, M. Wysoki (Eds). CABI Publishing, Cambridge, 131-156.
- Pérez-Brito, D., R. Tapia-Tussell, A. Cortés-Velázquez, A. Quijano-Ramayo, A. Nexticapan-Garcez, R. Martín-Mex (2012). First report of papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. *Afr. J. Biotechnol*, 11(71), 13564-13570.
- Polston, J., R. McGovern y L. Brown (1999). Introduction of tomato yellow leaf curl virus in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses of tomato. *Plant Dis*, 83, 984-988.
- Rodrigues, C.H., J. A. Ventura and L. A. Maffia (1989b). distribuição e transmissão da meleira em pomares de mamão no Estado do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, 14, (Supl.): 118.
- Rodrigues, S. P., G. G. Lindsay, P.M.B. Fernandes (2009). Biotechnological approaches for plant viruses resistance: From general to the modern RNA silencing Pathway. *Brazilian archives of biology and technology*, 52 (4), 795-808.
- Rodrigues, S.P., J. A. Ventura, C. Aguilar, E. S. Nakayasu, H. Choi, T. J. Sobreira, L. L. Nohara, L. S. Wermelinger, I. C. Almeida, R. B. Zingali, P.M. Fernandes (2012). Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in the latex of sticky diseased *Carica papaya* 409 L. plants. *J. Proteomics*, 75, 3191-3198.

- Rodrigues, S.P., J. A. Ventura, C. Aguilar, E. S. Nakayasu, I. C. Almeida, P.M.B. Fernandes, R.B. Zingali (2011). Proteomic analysis of papaya (*Carica papaya* L.) displaying typical sticky disease 386 symptoms. *Proteomics*, 11, 2592-2602.
- Rodrigues, S.P., J. S. Andrade, J. A. Ventura, G. G. Lindsey, P.M.B. Fernandes (2009b). Papaya meleira virus is neither transmitted by infection at wound sites nor by the whitefly *Trialeurodes variabilis*. *Journal of Plant Pathology*, 91(1), 87-91.
- Rodrigues, S.P., J. S. Andrade, J.A. Ventura, P.M.B. Fernandes (2009a). New approach for papaya latex storage without virus degradation. *Brazilian J. Microbiol*, 40, 122–124.
- Rodrigues, S.P., M. da Cunha, J.A. Ventura, P. M. B. Fernandes (2009c). Effects of the papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. *Plant Cell Report*, 28, 861-871.
- Ruiz-Ferrer, V., O. Voinnet (2008). Roles of Plant Small RNAs in Biotic Stress Responses. *Annu Rev Plant Biol*, 60, 485-510.
- SAGARPA 2005. Plan rector sistema nacional papaya. México DF. Consultado-24-octubre-2012.
- Samson, J. A. (1991). *Fruticultura Tropical*. Editorial Limusa. México, pp 396.
- Schaad, M. C., P. E. Jensen, J.C. Carrington, (1997). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *The EMBO Journal*, 16 (13), 4049–4059.
- Sherwood, J.L., T.L. German, J.W. Moyer, and D.E. Ullman (2003). Tomato spotted wilt. *The Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2003-0613-02. <http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/TomatoSpottedWilt/default.htm> consultado 24-octubre-2012.
- Sistema de información Agrícola y Pesquera (SIAP). 2011. <http://www.siap.gob.mx/sispro/portales/agricolas/papaya/descripción.pdf>. consultado 24-October-2012
- Stange, C. (2006). Interacción planta-virus durante el proceso de infectivo. *Cien. Inv. Agr*, 33 (1), 3-21.

- Tagitaba, P.F., J. R. Liberato, L. Zambolim, J. A. Ventura, H. Costa (2002). Controle e condições climáticas favoráveis a antracnose do mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 27(2), 186-192.
- Talbot, N (2004). *Plant-Pathogen Interactions*. Blackwell Publishing Ltd. USA. Pp 248.
- Taliansky, M., L.Torrance, N. O. Kalinina (2008). Role of plant virus movement proteins. *Methods Mol Biol*, 451, 33-54.
- Tapia-Tussell R., A. Quijano-Ramayo , A. Cortés-Velázquez, P. Lappe, A. Larque-Saavedra , D. Perez-Brito (2008). PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan peninsula. *Mol Biotechnol*, 40(3), 293-298.
- Texeira da Silva, J.A., R. Zinia, T. N. Duong, D. Sivakumar, A. Gera, M. T. Souza Jr, P. F. Tennant (2007). Papaya (*Carica papaya* L.) Biology and Biotechnology. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 1, 47-73.
- Tripathi, S., J. Y. Suzuki, S. A. Ferreira, D. Gonsalves (2008). Papaya ringspot virus -P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Molecular plant pathology*, 9 (3), 269 –280.
- USDA (2011). United States Department of Agriculture [en línea]. Disponible en <http://www.usda.gov/wps/portal/usdahome>. Consulta 31 Mayo 2011.
- Varma, A y V. Malathi (2003). Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Ann. App. Biology*, 142, 145-164.
- Ventura, J.A., H. Costa, J. Tatagiba (2004). Papaya diseases and integrated control. in: *Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management*, Naqvi, S.A.H. (ed). Kluwer, London. Pp 244-246.
- Vidal, C.A., A. S. Nascimento, T. C. Habibe (2005). Transmissao do virus da meleira do mamoeiro (papaya sticky disease virus) por insectos. *Magistra*, Cruz das Almas-BA, 17 (2), 101-106.
- Villegas, V.N (1997). Edible fruits and nuts, in: *Carica papaya* L. Verheij E.W.M, R. E Coronel, eds. Wageningen University, The Netherlands, pp. 220-229.
- Wang, M.B., M. Metzloff (2005). RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr. Opin. Plant Biol*, 8, 216-222.

- Whenham, R. J., R. S. S. Fraser, L. P. Brown, J. A. Payne (1986). Tobacco mosaic virus-induced increase in abscisic acid concentration in tobacco leaves: intracellular location in light and dark-green areas and relationship to symptom development. *Planta*, 168, 592-598.
- Zambolin, E.M., S. K. Alonso, K. Matsuoka, M.G. Cravalho, F. M. Zerbini. (2003). Purification and some properties of papaya meleira virus, a novel virus infecting papaya in Brazil. *Plant Pathology*, 52, 389-394.

CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN DE PMeV POR SEMILLA.

2.1. Introducción

La meleira o “lloroso” de la papaya es una enfermedad que se ha convertido en un problema creciente en el cultivo de este frutal en países como Brasil y México (Abreu *et al.*, 2012; Pérez-Brito *et al.*, 2012). Esta enfermedad se caracteriza por la exudación espontánea del látex en los frutos en una forma acuosa y translúcida, que al oxidarse resulta en costras de color café en la superficie de los mismos, provocando la pérdida de su valor comercial (Kitajima *et al.*, 1993; Zambolim *et al.*, 2003). El agente causal del “lloroso” de la papaya ha sido identificado como el Papaya Meleira Virus (PMeV), un virus cuyo genoma está compuesto por ARN de doble cadena cuyo tamaño es de 12 Kb y que se presenta en forma de partículas esféricas de 50 nm en las plantas infectadas (Kitajima *et al.*, 1993). Este patógeno se encuentra en los conductos lactíferos (Kitajima *et al.*, 1993; Zambolim *et al.*, 2003).

Esta enfermedad tiene un alto nivel de incidencia que puede alcanzar el 100% de la plantación en pocos meses, lo que ha sido constatado por los estudios llevados a cabo en Brasil por diversos investigadores (Ventura *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2009b) y en México por el laboratorio de GeMBio, en diferentes estudios realizados desde 2008. Hasta el presente no se ha encontrado ninguna variedad de papaya que sea resistente o al menos tolerante a PMeV. Y a pesar de que ya se cuenta con protocolos para su detección molecular (Tavares *et al.*, 2004, Abreu *et al.*, 2012), poco se conoce de la epidemiología de la misma, específicamente se desconoce su modo de transmisión. A pesar del tiempo que ha estado presente esta enfermedad en Brasil, hay pocos estudios sobre la transmisión de este virus y los resultados obtenidos no son concluyentes. (Rodrigues *et al.*, 2009b). Por lo que se hace difícil implementar medidas de control de la enfermedad.

De acuerdo a lo anterior y tomando en cuenta la velocidad de diseminación del PMeV en México, y las pérdidas económicas potenciales que representa, es de suma importancia

conocer si este virus se transmite a través de la semilla. Para poder implementar estrategias de manejo fitosanitario enfocadas al control y a la prevención de la diseminación del "lloroso".

Esta enfermedad tiene un alto nivel de incidencia que puede alcanzar el 100% de la producción en zonas afectadas, lo que ha sido constatado por los estudios llevados a cabo en varias zonas de investigación (Ventura et al., 2004; Vidal et al., 2008; Rodríguez et al., 2011). En México por el Instituto de Genética y Mejoramiento de Cultivos Agrícolas (INGENIA) en diferentes estudios realizados desde 1993 hasta el presente no se ha encontrado ninguna variedad de papaya que sea resistente al virus causante de PMV. Y a pesar de que ya se cuenta con protocolos para la producción masiva (Tavares et al., 2004; Alvaré et al., 2012), poco se conoce de la epidemiología de la misma, específicamente se desconoce su modo de transmisión. A pesar del tiempo que ha estado presente esta enfermedad en Brasil, hoy pocos estudios sobre la transmisión de este virus y los resultados obtenidos no son concluyentes (Rodríguez et al., 2008). Por lo que se hace difícil implementar medidas de control de la enfermedad.

La ausencia de un control y manejo en cuanto a velocidad de diseminación del PMV en México, y las pérdidas económicas potencialmente que representará, es de suma importancia

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Selección de semillas

Se seleccionaron 130 semillas para cada tratamiento, los cuales se describen a continuación:

- ✓ Semillas comerciales de la variedad Maradol (MSG1).
- ✓ Semillas provenientes de frutos diagnosticados positivos a PMeV (MQ217)

2.2.2. Germinación de semillas

A todas las semillas se les removió el mucílago y se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 10%. Luego se remojaron durante 3 días en agua estéril, a la que se le añadieron dos fungicidas: Alliete ® (Fosetyl-Al 1gr/ L.) y Derosal ® (Carbendazim 1ml/ L).

Estas semillas ya tratadas se colocaron en charolas de germinación, con sustrato de vermiculita, en completa oscuridad. Durante este proceso se midió el porcentaje de germinación cada tercer día, en un periodo de siete días, de cada uno de los tratamientos.

Las plántulas obtenidas se fertilizaron cada dos días con Polyfeed ® Triple 19 (0.19gr/L) y con MKP ® fosfato monopotásico 0-52-34 (1gr/L) hasta su trasplante a la casa sombra.

2.2.2.1. Trasplante a la casa sombra

Se sembraron 30 plántulas de cada uno de los tratamientos, en un área protegida con malla antiáfidos (40 x 25 hilos/pulgada cuadrada, bicolor, ancho 4.10m), en túneles independientes 100 m², para evitar la presencia de posibles vectores. El marco de plantación fue de dos hileras, con una distancia de 1.5 m entre cada una de las plantas, en túneles independientes para cada tratamiento.

2.2.2.2. Manejo integrado del experimento y monitoreo de condiciones ambientales

Manejo integrado

Una vez realizado el trasplante, se llevó a cabo la fertilización, así como acciones preventivas para evitar la presencia de fitopatógenos que pudieran afectar los resultados. Estas prácticas se realizaron cada semana, para mantener el área experimental en óptimas condiciones y tener un control fitosanitario adecuado. De igual manera, en el área experimental se colocaron trampas para insectos y se realizó la aplicación de insecticidas sistémicos para garantizar que no existiera ningún tipo de posibles vectores.

2.2.2.3. Monitoreo de condiciones ambientales

Se registraron las temperaturas y la humedad relativa cada dos horas con un registrador de datos (*datalogger*, Spectrum Technologies, Inc. USA). La información meteorológica fue recabada y exportada a una hoja de cálculo (Excel® de Microsoft®) para su análisis.

2.2.3. Toma de muestras

La colecta de látex se realizó en los primeros frutos verdes (≤ 13 cm). Posteriormente a la primera colecta se hicieron muestreos cada 21 días. El látex se obtuvo mediante ralladuras en la superficie del fruto con palillos estériles. Por cada fruto se colectaron 500 μ l de látex en tubos eppendorf de 2 ml, que contenían 1000 μ l de citrato de amonio 0.1 M (pH 6.5) para su análisis. Todas las plantas muestreadas fueron marcadas en el tallo para su identificación.

2.2.3.1. Extracción de Ácidos nucleicos a partir de látex

Para el diagnóstico molecular del PMeV a partir de látex del frutos se realizó la extracción de ácidos nucleicos y se utilizó el protocolo 1 descrito por Tavares *et al.*, (2004). La metodología del mismo se detalla a continuación:

Se tomaron 350 μ l del látex, se adicionaron 350 μ l de amortiguador de extracción (Tris 0.2 M, NaCl 0.3 M, EDTA 25 mM y SDS 2%, pH 7.5) y 14 μ l de proteinasa K (20 mg/ml). Se mezcló suavemente y se incubó a 37 °C durante 30 min. Se adicionó 1V de fenol saturado con Tris-HCl (pH 7.5), y después las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 4 min a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se le añadió 1V de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugaron bajo las mismas condiciones del paso anterior. Se transfirieron 400 μ l de la fase acuosa a un tubo estéril y se les añadió 0.1 V de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 2.5 V de etanol absoluto frío. Se mezclaron suavemente y se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se decantó. El precipitado se secó a temperatura ambiente durante 5 min y se resuspendió en 50 μ l de agua libre de endonucleasas (Tavares *et al.*, 2004).

El análisis de las bandas de ácidos nucleicos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (p/v) previamente teñidos con Bromuro de Etidio, (10 μ g/ μ l), en amortiguador TBE 1X (Tris-borato-EDTA). Las condiciones de corrida de los geles fueron de 120 V durante 50 min. Se utilizó como marcador el 1 kb ladder. Los geles fueron visualizados en un transiluminador UV y las imágenes fueron capturadas y analizadas con el programa UVP BioImaging Systems.

2.2.3.2. Extracción de ARN total en semillas

Se tomaron muestras compuestas por siete semillas. Para saber en qué parte de la semilla se encontraba el PMeV, se separaron el endospermo-embrión y la testa de manera independiente. El ARN total fue extraído utilizando el Kit RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare) de acuerdo a las condiciones recomendadas por el proveedor (Ver Anexos).

El ARN total se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y la concentración se calculó teniendo en cuenta que 40 µg/ml equivalen a una unidad de absorbancia. La integridad del ARN fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v) en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, teñido con bromuro de etidio.

2.2.3.3. Síntesis de ADNc (Transcripción Reversa)

La síntesis de la primera hebra del ADNc se realizó utilizando 1 µg de ARN como molde y 100 ng/µl de hexámeros; con la enzima M-MLV Reversa Transcriptasa (Invitrogen), siguiendo las condiciones recomendadas por el proveedor (Ver anexo 1).

2.2.4. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

2.2.4.1. Iniciadores del gen actina

Para verificar la integridad del ARN se realizó una reacción de PCR con los iniciadores del gen de la actina (Santos, 2005).

Las condiciones de reacción se realizaron de acuerdo a las condiciones mencionados por el Kit GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega). La amplificación se realizó en el termociclador I-Cycler, de la siguiente manera: un paso de desnaturalización inicial 94 °C por 4 minutos, seguido de 36 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1.5 minutos y 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72 °C por 5 minutos (Abreu *et al.*, 2012). Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (p/v), teñidos con bromuro de etidio. La corrida se realizó a 90V por 60 minutos en amortiguador TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen), los geles se visualizaron en un transiluminador UVP. Las imágenes fueron digitalizadas y procesadas con el programa UVB BioImaging Systems.

2.2.4.2. Iniciadores específicos a PMeV

Los iniciadores utilizados para la detección de PMeV fueron CBL38/39, las reacciones de PCR y sus condiciones se realizaron de acuerdo a lo indicado por los autores de estos iniciadores (Zamudio y Lopez- Ochoa, 2012 *en proceso de patente*).

Las condiciones de reacción fueron: para un volumen final de 50 μ l, se usaron 100 ng de ADNc, 1X de amortiguador de PCR (Invitrogen), 0.20 mM de dNTPs (Invitrogen), 2.5 mM de $MgCl_2$, 1 μ M de cada iniciador, y 1U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen). La amplificación se realizó en el termociclador I-Cycler, de la siguiente manera: un paso de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 62 °C por 1 minuto y 70 °C por 1 minuto, y un último paso de extensión a 70 °C por 5 minutos.

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (p/v), teñidos con bromuro de etidio. La corrida se realizó a 90V por 60 minutos en amortiguador TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen), los geles se visualizaron en un transiluminador UVP. Las imágenes fueron digitalizadas y procesadas con el programa UVB BioImaging Systems.

2.3. Resultados

2.3.1. Germinación de semillas

Como puede apreciarse en la Figura 2-1a, el porcentaje de germinación fue superior en las semillas sanas que en las enfermas. Las semillas sanas MSG1 alcanzaron un 96% de germinación, en comparación con las semillas enfermas MQ217, que obtuvieron sólo un 64%, observándose por tanto una reducción en la germinación de alrededor de un 20 a 30% en las enfermas.

La reducción en el porcentaje de germinación de las semillas procedentes de frutos diagnosticados enfermos con PMeV, pudiera estar asociada con la presencia del virus en la semilla, ya que el resto de los factores que podrían influir en el proceso se mantuvieron constantes para cada tratamiento. Estos resultados concuerdan con estudios que han reportado que los virus, presentes en las semillas, retardan la germinación de las mismas, e influyen de manera negativa en el porcentaje de germinación, provocando reducciones de hasta un 35% (Hemmati y McLean, 1977).

Con respecto al vigor y altura de las plántulas, se pudo observar que las plantas de semillas sanas mostraron mayor altura y mayor vigor, con respecto a las plántulas de semillas enfermas (Figura 2-1b).

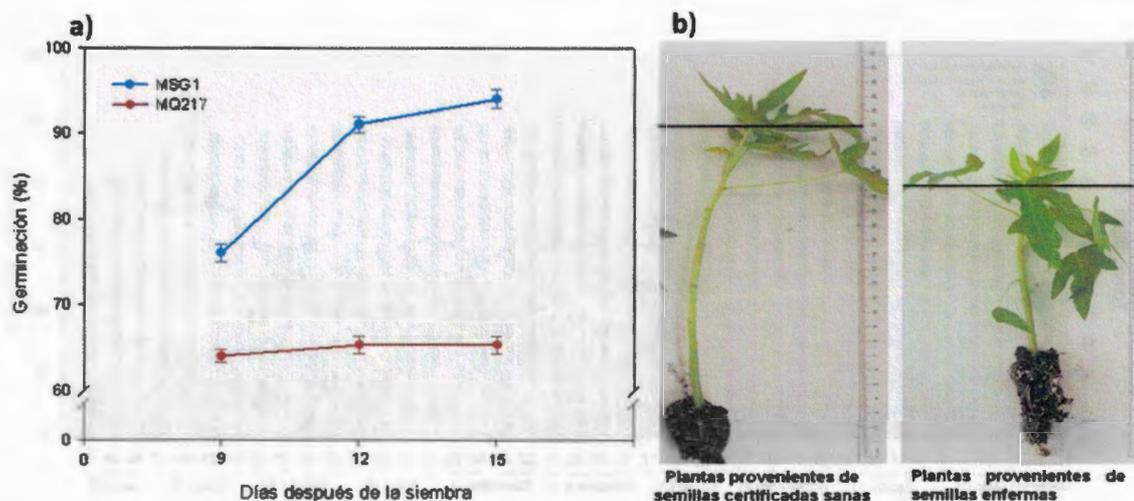


Figura 2-1. a) Porcentaje de germinación de cada uno de los tratamientos; b) Vigor de las plántulas provenientes de MSG1 y MQ217. MSG1: Semillas sanas certificadas MSG1; MQ217: semillas procedentes de frutos enfermos.

2.3.2. Monitoreo meteorológico y control fitosanitario

En la Figura 2-2 se presentan los valores de temperatura y de humedad relativa que se registraron en la casa sombra en el período de junio de 2011 a abril de 2012.

Como se aprecia en dicha figura, las temperaturas de la casa sombra oscilaron entre 25 y 41°C, mientras que la humedad relativa fue alta (casi el 100%) durante la noche y el transcurso de la madrugada en todo el período monitoreado. Las temperaturas más altas se registraron a mediados de Julio entre las 13 hrs y 15hrs del día, llegando a alcanzar valores superiores a los 40°C.

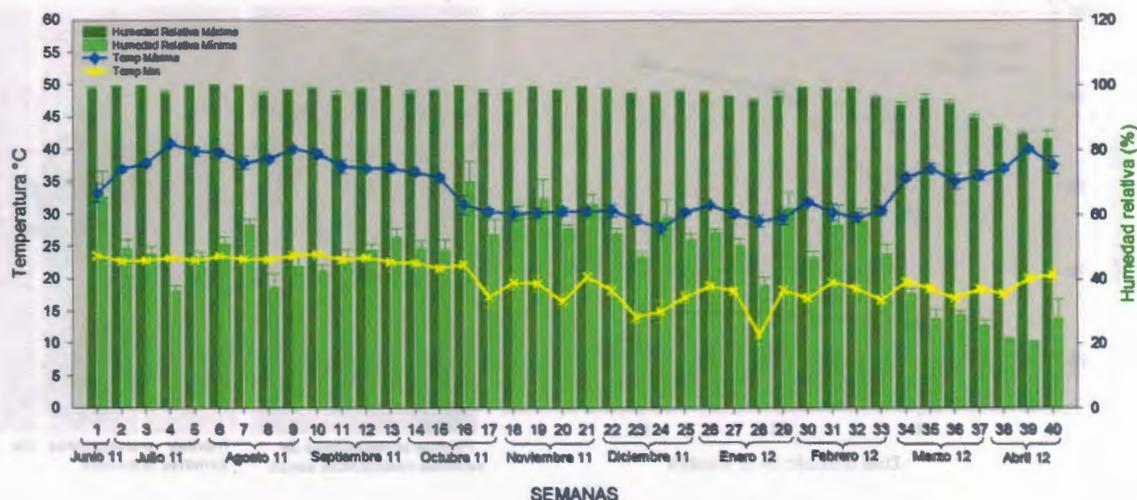


Figura 2-2. Temperaturas y Humedad relativa de la casa sombra

Las condiciones ambientales que se registraron dentro de la casa sombra durante los primeros dos meses posteriores al trasplante, pudieron haber repercutido en el desarrollo de las papayas, ya que se observó un atraso en el crecimiento y en su período de fructificación por 60 días. Esto último se debió principalmente al aborto floral como consecuencia de las altas temperaturas prevalecientes en la casa sombra y que se ha indicado son un factor determinante en el “amarre” de los frutos (Meyer, 1966; Restrepo-Díaz *et al.*, 2010).

2.3.3. Diagnóstico del PMeV

Para verificar la integridad del ARN se realizó una PCR a partir del ADNc con los iniciadores que amplifican el gen de la actina. Como se aprecia en la Figura 2-3 en todas las muestras analizadas en este estudio se observó una amplificación de aproximadamente 200 pb que corresponde al gen de actina de acuerdo a lo reportado por Abreu *et al.*, (2012).

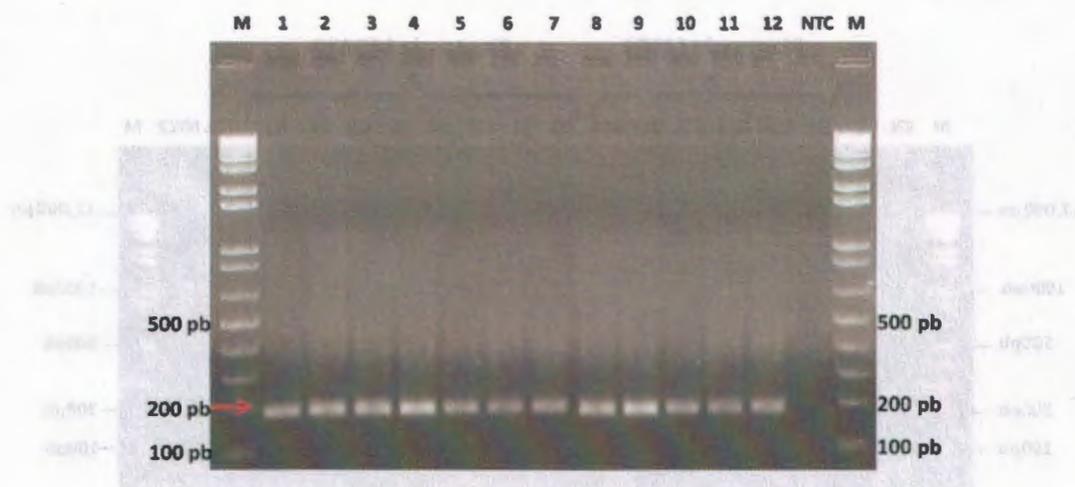


Figura 2-3. Amplificación con los iniciadores que amplifica el gen de actina en semillas certificadas y en semillas provenientes de diferentes frutos enfermos. M: Marcador molecular (1 Kb); Líneas 1-6: semillas sanas; Líneas 7-12: semillas provenientes de frutos enfermos. NTC1: Control de la PCR que no contiene ADN molde.

El análisis del PMeV se realizó por RT-PCR, los resultados del muestreo a los 160 días posteriores al trasplante, se pueden observar en la Figura 2-4. En la misma se aprecia que las plantas infectadas con el virus mostraron una amplificación de aproximadamente 500 pb, banda que corresponde al PMeV (Zamudio y Lopez- Ochoa, 2012 *en proceso de patente*); en tanto que las plantas sanas no presentaron esta banda.

En el Cuadro 2-1, se muestra el número de plantas analizadas, así como su porcentaje de infección con PMeV. Todas las plantas procedentes de semillas sanas fueron negativas a PMeV. Mientras que de las 30 plantas provenientes de semillas enfermas evaluadas, 22 fueron positivas al virus. Este alto porcentaje de infección en plantas procedentes de semillas enfermas coincide con los valores obtenidos en otros estudios, donde mencionan que la probabilidad de infección de las plantas a virus que se transmiten por semillas, cuando se usan semillas infectadas, es alta aunque no del 100% (Hemmati y McLean, 1977; Johansen y Edwards; 1994).

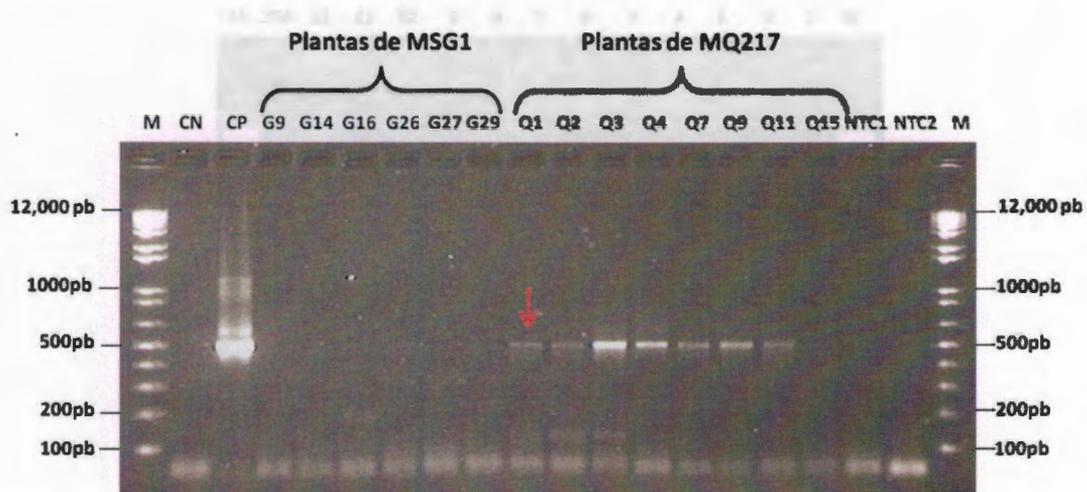


Figura 2-4. Amplificación con los iniciadores CBL38/39 de las plantas provenientes de semillas certificadas y de semillas provenientes de frutos enfermos. M: Marcador molecular (1 Kb); línea 1: control negativo; línea 2: Control positivo; línea 3: G9; línea 4: G14; línea 5: G16; línea 6: G26; línea 7: G27; Línea 8: G29; Línea 9: Q1; línea 10: Q2; línea 11: Q3; Línea 12: Q4; Línea 13: Q7, Línea 14: Q9; línea 15: Q11; Línea 16: Q15; línea 17: NTC1: control del ADNc que no contiene ARN molde, Línea 18: NTC2: Control de la PCR que no contiene ADN molde. Plantas G: plantas provenientes de semillas sanas; Plantas Q: plantas provenientes de semillas de frutos enfermos.

Cuadro 2-1. Plantas analizadas en los diferentes tratamientos

Tratamientos	Número de plantas analizadas	Positivas	Negativas	Porcentaje de plantas infectadas
Semillas certificadas sanas	30	0	30	0%
Semillas enfermas	30	22	8	73.3%

Estos resultados indican que uno de los mecanismos de transmisión del PMeV es por las semillas que provienen de frutos enfermos. Ya que el área de estudio, estaba protegida con malla antiáfidos, por lo que no había otra posible fuente primaria de inóculo del virus para las plantas, que no fuera la semilla de origen. Esto refuerza la necesidad de contar con semillas certificadas libres de PMeV para la producción de papaya, lo cual es lo recomendado para el caso de virus transmitidos por semillas (Hemmati y McLean, 1977; Johansen y Edwards; 1994)

Por otro lado en la Figura 2-5 se puede observar que las plantas sanas presentaron un banco de frutos mayor, en comparación con las plantas enfermas; así como que los frutos de plantas sanas no presentan ningún síntoma relacionado con PMeV, mientras que los frutos de las plantas enfermas fueron más pequeños, y aunque asintomáticos al momento del muestreo (160 días posteriores al trasplante) posteriormente sí mostraron los síntomas típicos del "lloroso".



Figura 2-5. Plantas en la casa sombra: a) plantas sanas; b) plantas enfermas; c) frutos sanos; d) frutos enfermos.

Paralelamente a los estudios antes mencionados, se realizó el diagnóstico molecular a semillas provenientes de frutos sanos y enfermos. Las semillas sanas no mostraron ningún producto de amplificación (Figura 2-6), en contraste con las semillas enfermas que presentaron la banda de amplificación de 500 pb que corresponde al PMeV. Cabe señalar que de las once muestras de semillas enfermas, sólo se observó la banda de 500 pb en seis muestras, lo que representa un 54% de infección en semillas enfermas, esto es debido quizás a que no todas las semillas procedentes de frutos enfermos estaban infectadas, lo que ha sido reportado en otros virus que son transmitidos por semilla (Hemmati y McLean, 1977; Johansen y Edwards; 1994 y Domier *et al.*, 2007).

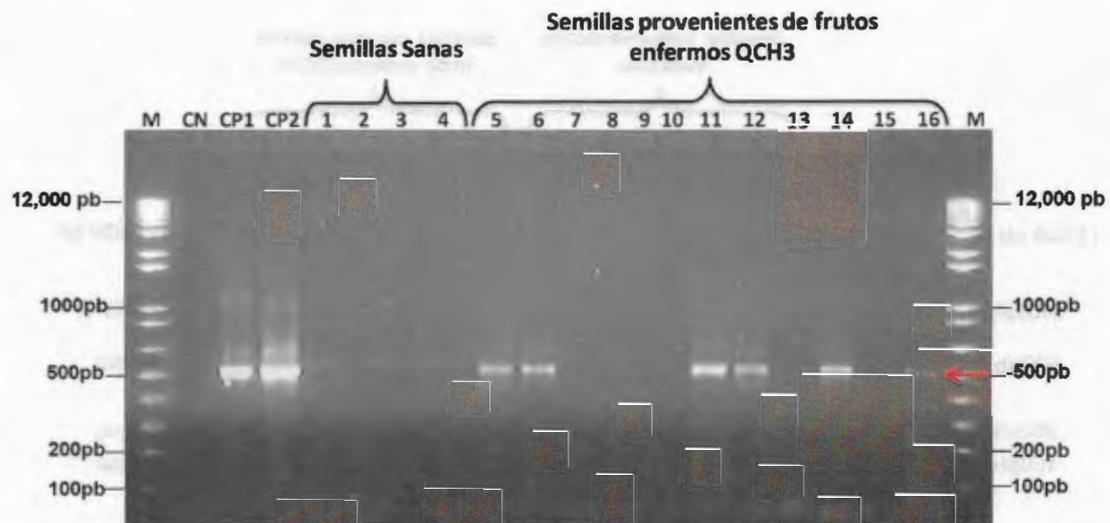


Figura 2-6. Amplificación con los iniciadores CBL38/39 en semillas sanas y semillas provenientes de frutos enfermos. M: Marcador molecular (1 Kb); CN: Control negativo; CP1: México; CP2: Brasil; línea 1-4: semilla certificada; línea 5-16: Semilla proveniente de frutos enfermos QCH3.

De igual manera se realizó el diagnóstico molecular en semillas de diferentes frutos con síntomas de PMeV (Figura 2-7), así como en semillas provenientes de frutos de diferentes estados (Figura 2-8). Como se aprecia en ambas figuras, las semillas provenientes de frutos sanos no presentaron ninguna amplificación, en contraste con las semillas provenientes de diferentes frutos enfermos que presentaron una amplificación de 500pb que corresponde al PMeV.

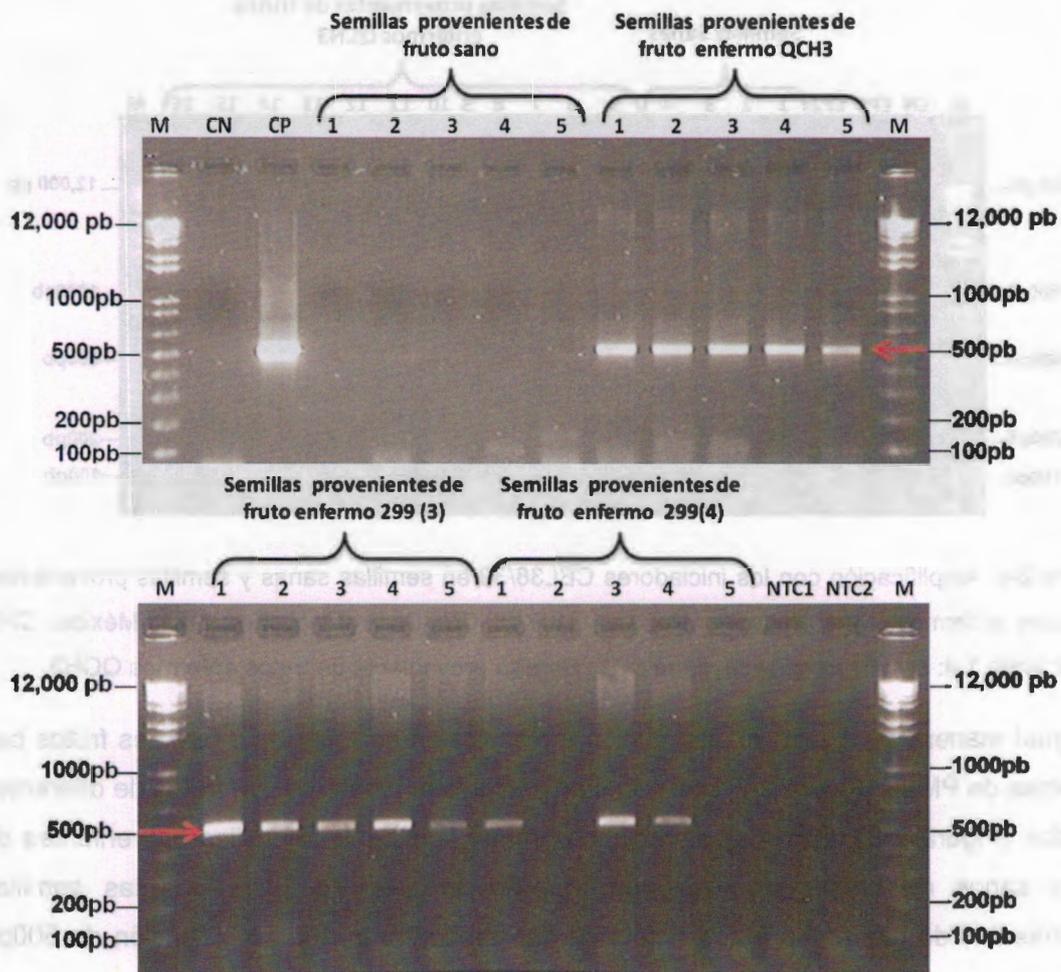


Figura 2-7. Amplificación con los iniciadores CBL38-CBL39 en semillas sanas y en semillas provenientes de diferentes frutos enfermos. M: Marcador molecular (1 Kb); CN: Control negativo; CP: Control positivo; NTC1: control del ADNc que no contiene ARN molde; NTC2: Control de la PCR que no contiene ADN molde.

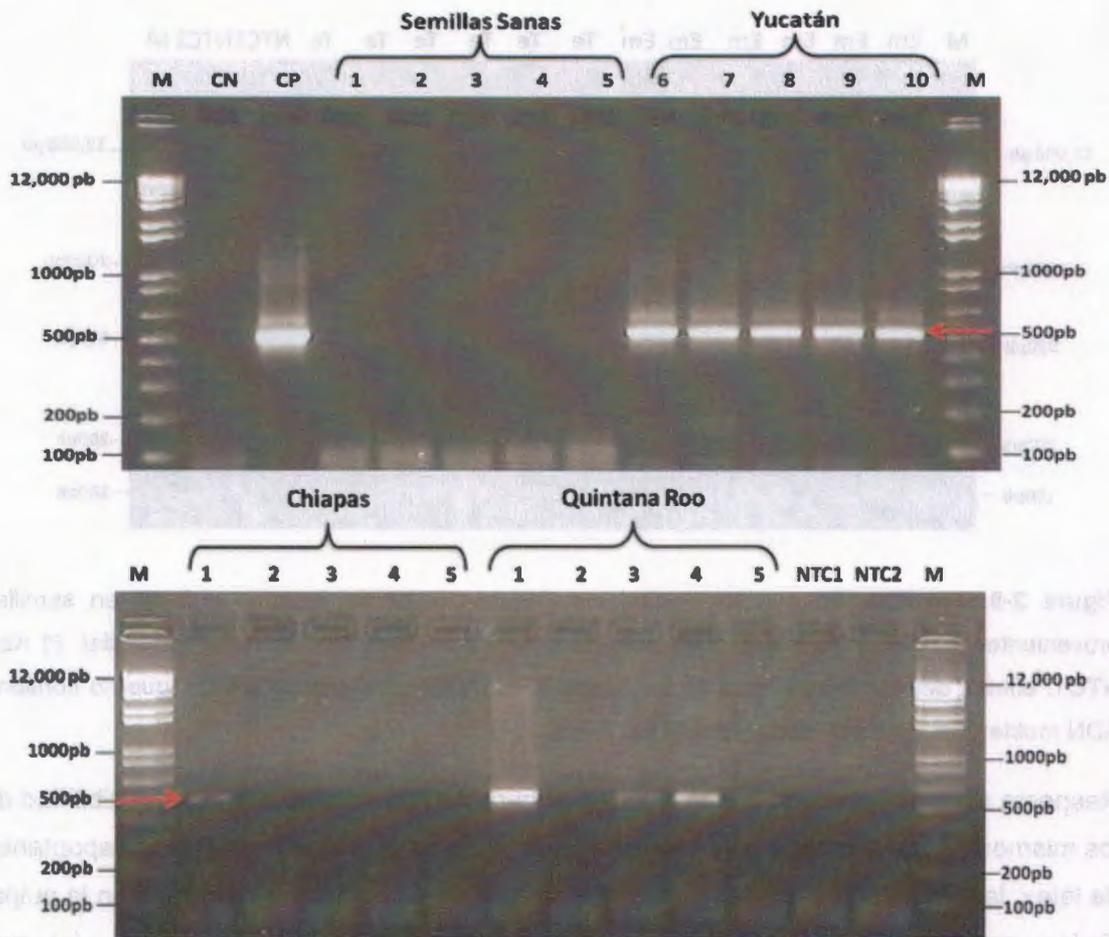


Figura 2-8. Amplificación con los iniciadores CBL38-CBL39 en semillas certificadas y en semillas provenientes de diferentes frutos de diferentes estados. M: Marcador molecular (1 Kb); CN: Control negativo; CP: Control positivo; NTC1: control del ADNc que no contiene ARN molde; NTC2: Control de la PCR que no contiene ADN molde.

Para conocer en que parte de la semilla se hallaba el virus, se realizó el diagnóstico molecular en el embrión-endospermo y la testa. Como se muestra en la Figura 2-9 se observó la banda de 500 pb que corresponde al PMeV en ambas partes, aunque la banda presentó una mayor intensidad del producto de amplificación en las muestras de la testa, estos resultados confirman que el PMeV es transmitido por semilla.

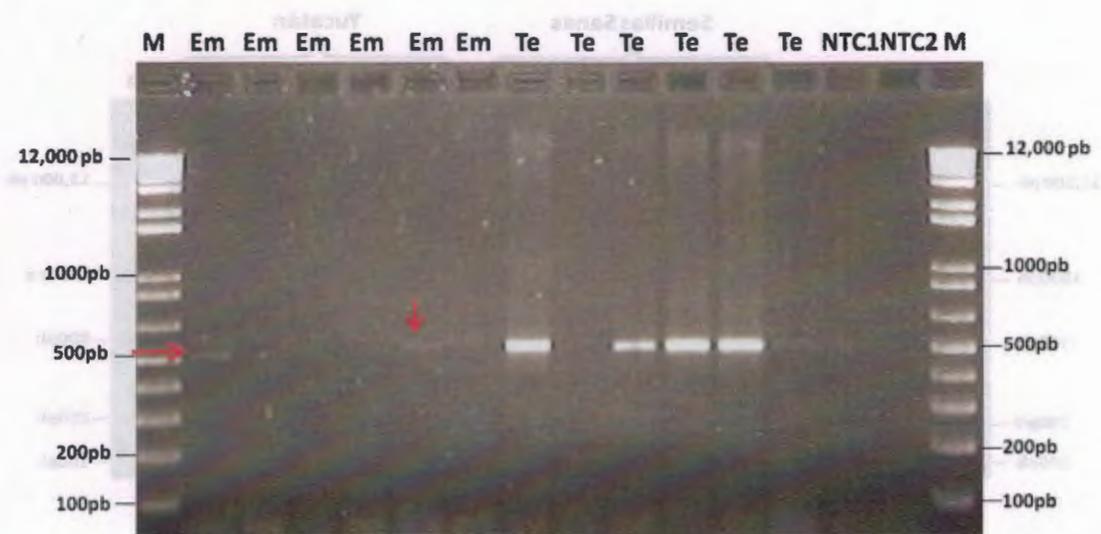


Figura 2-9. Amplificación con los iniciadores CBL38-CBL39 en testa y embrión en semillas provenientes de diferentes frutos diagnosticado positivo a PMeV M: Marcador molecular (1 Kb); NTC1: control del ADNc que no contiene molde ARN; NTC2: Control de la PCR que no contiene ADN molde; Em: Embrión-endospermo; Te: Testa.

Respecto a los síntomas de la enfermedad (Figura 2-10) se observó la reproducibilidad de los mismos en las plantas afectadas por PMeV, pues se produjo la exudación espontánea de látex, la formación de costras por oxidación de éste y las manchas internas en la pulpa. Todos estos coinciden con los reportados por diversos autores como síntomas característicos del PMeV (Zambolin *et al.*; 2003, Rodrigues *et al.*; 2009a; Abreu *et al.*; 2012; Pérez-Brito *et al.*, 2012).



Figura 2-10. Sintomatología característica de la enfermedad “lloroso” de la papaya ocasionada por el PMeV.

Al cortar los frutos con la sintomatología de la enfermedad, se observó una exudación de látex hacia el interior de la cavidad donde se encuentran las semillas (L1) así como la formación de nódulos de látex (L2 y L3) (Figura 2-11a) que al ser analizados molecularmente por análisis de ácidos nucleicos, como se puede observar en la Figura 2-11b, y por RT-PCR (Figura 2-11c), se obtuvieron resultados positivos a PMeV, esto confirma aún más nuestra hipótesis de que el PMeV es transmitido por semillas y constituye el primer reporte de este hallazgo.

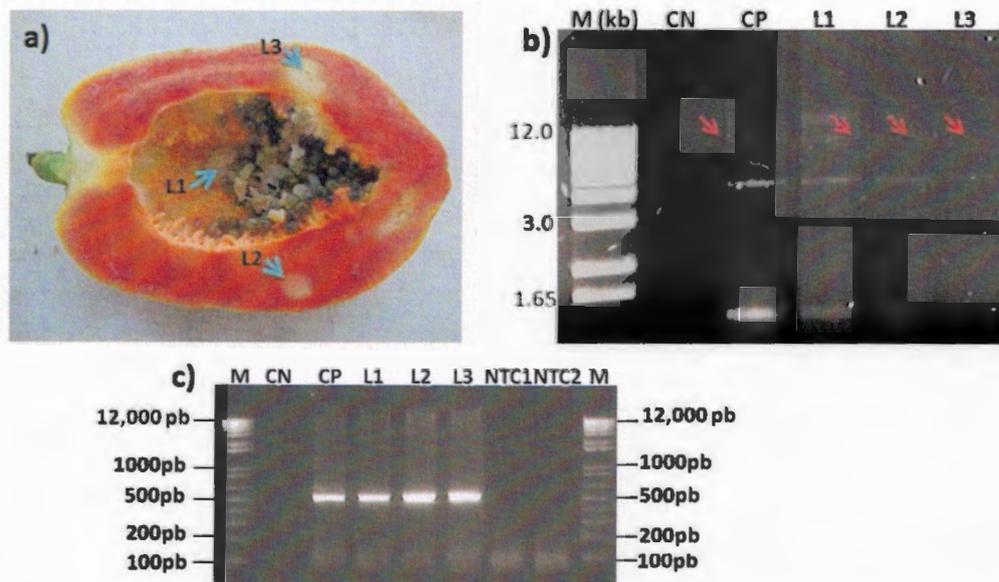


Figura 2-11. Detección del PMeV en la cavidad del fruto. a) Látex en contacto con las semillas y en la pulpa; b) gel de agarosa al 0.8 % y c) gel de la amplificación con los iniciadores específicos: línea M: Marcador molecular de 1Kb; línea CN: control negativo; línea CP: control positivo; línea L1-L3 muestra tomado en la cavidad del fruto.

Los resultados obtenidos demuestran que el PMeV sí es transmitido por semilla, y que la presencia del virus en la semilla reduce hasta un 30% el porcentaje de germinación. También que las plántulas provenientes de semillas enfermas muestran un menor vigor y altura, en comparación con las plántulas de semillas sanas.

2.4. Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que PMeV sí es transmitido por semilla. La transmisión alcanzó valores superiores al 50% en las plantas cultivadas en condiciones controladas, provenientes de semillas de frutos enfermos. Estos resultados concuerdan con estudios realizados en otros virus que son transmitidos por semilla, tales como el virus del mosaico del pepino (CMV) en chile (*Capsicum annuum* L. cv Marengo), el virus del mosaico de la semilla del chícharo (PSbMV) y el Virus del mosaico del pepino en tomate (PepMV) donde los porcentajes de infección en las plántulas fueron también superiores al 50% (Kobayashi y Ali, 2010; Wang y Maule, 1994; Ling, 2008).

Hasta la fecha en el cultivo de papaya, no se ha reportado ningún virus que sea transmitido por semillas, ya que los virus que afectan a esta planta se transmiten de manera mecánica como el *Papaya mosaic virus*, o por medio de vectores como el virus del amarillamiento letal de la papaya y el virus de la mancha anular (Ventura *et al.*, 2004).

En otros estudios sobre virus que son transmitidos por semillas, se ha observado que la presencia del virus repercute desfavorablemente en el porcentaje de germinación, ya que el mismo puede llegar a disminuir hasta en un 30%, como sucedió en el presente estudio, esto se ha reportado en el caso del virus del mosaico de la alfafa (AMV) y en el virus del mosaico de la soya (SMV) (Hemmati y McLean, 1977; Johansen y Edwards 1994; Domier *et al.*, 2007).

Con respecto a las características morfológicas de las plántulas, aunque no existieron diferencias significativas en la altura entre sanas y enfermas, sí se pudo observar una reducción en el vigor de las que provenían de frutos enfermos con PMeV, lo que pone de manifiesto que este virus ejerce un efecto negativo sobre las plántulas. Estos efectos desfavorables para el vigor de las plántulas han sido observados en espinaca, tabaco y plantas del género *Chenopodium*, ocasionados por: el virus latente de la espinaca (SLV) y el virus del mosaico del *Arabis* (ArMV) (Walkey *et al.*, 1985).

En cuanto a los resultados obtenidos al analizar semillas de frutos de papaya enfermos, se observó que el porcentaje de semillas infectadas era del 53% de las muestras analizadas dentro del mismo fruto. Este porcentaje se encuentra en el rango de infección reportado para el Virus del mosaico del Sowbane (SoMV) en espinaca, y el Virus del mosaico del tabaco en *Arabidopsis thaliana*, cuyos porcentajes de infección variaron de 40 a 80% en semillas infectadas con dichos virus (Boss y Huijberts, 1996; Tu, 1989).

Por lo que respecta al diagnóstico realizado en diferentes frutos de diferentes plantas, se pudo observar que de los tres frutos analizados el porcentaje de infección total fue de un 86%, este porcentaje coincide con lo reportado por el virus del amarillamiento del nabo (TYMV), donde se observó que el porcentaje de infección puede alcanzar más de un 80% en semillas provenientes de diferentes frutos con síntomas de dicho virus (Assis Filho y Sherwood, 2000).

Respecto a la expresión de la enfermedad, además de los síntomas típicos, es importante destacar que se observó una exudación de látex hacia el interior de la cavidad del fruto donde se encuentran las semillas, lo que podría estar favoreciendo la contaminación de las mismas al estar en contacto con el látex infectado, reforzando de esta manera el hallazgo de que PMeV se encuentra tanto en endospermo como en la testa.

La presencia de PMeV en la testa puede deberse a que es un virus de ARN de doble cadena que es muy estable, por lo que puede mantenerse latente en esta parte de la semilla por largos períodos de tiempo y no sufrir afectaciones durante la germinación y por ende poder infectar a las plántulas de papaya.

2.5. Referencias

- Abreu P.M., J.G. Piccin, S.P. Rodrigues, D. S. Buss, J.A. Ventura, P.M. Fernandes (2012). Molecular diagnosis of Papaya meleira virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 180, 11-17.
- Assis Filho, F. M, J. L. Sherwood (2000). Evaluation of Seed Transmission of *Turnip yellow mosaic virus* and *Tobacco mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*, 90,1233-1238.
- Bos, L., N. Huijberts (1996). Occurrence and transmission of sowbane mosaic virus in seed from naturally infected plants of spinach (*Spinacia oleracea*). *European Journal of Plant Pathology*,102,707-711.
- Domier, L. L., T. A. Steinlage, H. A. Hobbs, Y. Wang, G. Herrera-Rodriguez, J. S. Haudenschild, N. K. McCoppin, G. L.Hartman (2007). Similarities in seed and aphid transmission among Soybean mosaic virus isolates. *Plant Dis*, 91,546-550.
- Hemmati, K. and D. L. McLean (1977). Gamete-seed transmission of alfalfa mosaic virus and its effect on seed germination and yield in alfalfa plants. *Phytopathology*, 67,576-79.
- Johansen, E. and Edwards, M. (1994). Seed transmission of viruses: Currents Perspectives. *Annu. Rev. Phytopathol*, 32,363-386.
- Kitajima, E.W., C. Rodrigues, J. Silveira, F. Alves, J. A. Ventura, F.J.L. Aragao, L.H.R. Oliveira. (1993). Association of isometric virus-like particles restricted to lactifers, with meleira (sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). *Fitopatologia Brasileira*, 8, 118-122.
- Kobayashi, M., A. Ali (2010). Seed transmission of Cucumber mosaic virus in pepper. *Journal of Virological Methods*, 163, 234–237.
- Ling, K. S. (2008). *Pepino mosaic virus* on tomato seed: Virus location and mechanical transmission. *Plant Dis*, 92,1701-1705.
- Meyer.V.G. (1966). Flower abnormalities. *Bot. Rev*, 32,165-195

- Pérez-Brito, D., R. Tapia-Tussell, A. Cortés-Velázquez, A. Quijano-Ramayo, A. Nexticapan-Garcez, R. Martín-Mex (2012). First report of papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. *Afr. J. Biotechnol*, 11(71), 13564-13570.
- Restrepo-Díaz, H., J. Melgar y L. Lombardini (2010). Ecophysiology of horticultural crops: an overview. *Agronomía Colombiana*, 28(1), 71-79.
- Rodrigues, S.P., J. S. Andrade, J. A. Ventura, G. G. Lindsey, P.M.B. Fernandes (2009b). Papaya meleira virus is neither transmitted by infection at wound sites nor by the whitefly *Trialeurodes variabilis*. *Journal of Plant Pathology*, 91(1), 87-91.
- Rodrigues, S.P., M. da Cunha, J. A. Ventura, P.M.B. Fernandes (2009a). Effects of the papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. *Plant Cell Report*, 28, 861-871.
- Santos, M.P (2005). Indução de sistema de defesa do mamoeiro como resposta à elicitores químico (óxido nítrico) e biológico (*Saccharomyces cerevisiae*). Tesis Maestria. Federal University of Espírito Santo, Vitória. Pp 140.
- Tavares, E.T., J. S. Tatagiba, J.A. Ventura, M.T. Souza Jr (2004). Dois novos sistemas de diagnose precoce da meleira do mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 563-566.
- Tu J. C (1989). Effect of different strains of soybean mosaic virus on growth, maturity, yield, seed mottling and seed transmission in several soybean cultivars. *J. Phytopathol*, 126, 231-36.
- Ventura, J.A., H. Costa, J. Tatagiba (2004). Papaya diseases and integrated control. in: *Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management*, Naqvi, S.A.H. (ed). Kluwer, London. Pp 244-246.
- Vidal, C.A., A. S. Nascimento, T. C. Habibe (2005). Transmissao do virus da meleira do mamoeiro (papaya sticky disease virus) por insectos. *Magistra, Cruz das Almas-BA*, 17 (2), 101-106.
- Walkey, D. G. A., P. A. Brocklehurts, J. E. Parker (1985). Some physiological effects of two seed-transmitted viruses on flowering, seed production and seed vigour in nicotiana and chenopodium plants. *New Phytol*, 99,117-128.
- Wang, D., A. Maule (1994). A Model for Seed Transmission of a Plant Virus: Genetic and Structural Analyses of Pea Embryo Invasion by Pea Seed-Borne Mosaic Virus. *The Plant Cell*. 6, 777-787.

Zambolin, E.M., S. K. Alonso, K. Matsuoka, M.G. Cravalho, F. M. Zerbini. (2003). Purification and some properties of papaya meleira virus, a novel virus infecting papaya in Brazil. *Plant Pathology*, 52, 389-394.

Zamudio, E.; L. Lopez 2012. *En proceso de patente*. México.

CAPÍTULO 3. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DEL PMeV

3.1. Introducción

Para poder dilucidar los posibles mecanismos de transmisión de los virus, es necesario conocer el patrón de distribución de las plantas enfermas; ya que por ejemplo, la presencia de éstas en los bordes de las parcelas sugiere la posible transmisión por vectores, como es el caso de la distribución de plantas infectadas por geminivirus que son transmitidos por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) (Fargette *et al.*, 1993). También se ha observado que la distribución de plantas enfermas está en función de la migración de los vectores, los cuales generalmente se mueven de acuerdo a la dirección de los vientos predominantes en las plantaciones (Vidal *et al.*, 2004).

En cuanto a la transmisión mecánica de los virus, se ha observado que la distribución de las plantas infectadas, muchas veces ocurre en la dirección de líneas o entre líneas según el tipo de labores agrícolas realizadas (Talbot, 2004 y Carter y Saunders, 2007). Si el patrón de distribución de plantas enfermas no es uniforme podría considerarse que la transmisión del virus es por vectores o semillas (Fargette *et al.*, 1993).

Estudios realizados en Brasil sobre la distribución de PMeV indicaron que la infección en los huertos de papaya presentaba una distribución que implicaba la participación de un vector en la transmisión del virus. Sin embargo, también se concluyó que el patrón de distribución de las plantas enfermas al PMeV a lo largo de las filas puede deberse a una transmisión mecánica que ocurre durante las prácticas agrícolas (Ventura *et al.*, 2004). Además se observó que en los meses de Marzo a Julio existía una mayor incidencia del PMeV, esto lo asociaron con el aumento de densidad de población de la mosca blanca (*B. tabaci*) que tiene lugar entre Febrero y Abril (Ventura *et al.*, 2004). Sin embargo estos resultados no fueron concluyentes, ya que no se pudo detectar el PMeV en las moscas blancas. Posteriormente en 2009, Rodrigues *et al.*, al estudiar la posible transmisión por la especie de mosca blanca *Trialeurodes variabilis* encontraron que ésta fue incapaz de transmitir el virus de plantas enfermas a sanas aún cuando éste había sido detectado en

adultos y ninfas. Estos datos confirmaron las observaciones previas en el campo donde no se pudo probar la asociación de la meleira con las especies de mosca blanca.

En el 2009 fue encontrada por primera vez la meleira en México, específicamente en los estado de Campeche y Quintana Roo, por el Laboratorio GeMBio del CICY (Pérez-Brito *et al.*, 2012). Sin embargo, todavía no se cuenta con la información suficiente sobre la distribución espacial del PMeV en las plantaciones afectadas por el virus y en los estados productores de papaya en México. Por lo que uno de los objetivos de este trabajo fue conocer la dispersión del PMeV en plantaciones comerciales de papaya bajo diferentes condiciones de manejo fitosanitario y a nivel nacional. Esto permitirá generar datos útiles para los estudios de transmisión del virus, así como conocer la dinámica de distribución de la enfermedad en las huertas donde se presenta para proponer medidas fitosanitarias que controlen la presencia del virus.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Establecimiento de parcelas experimentales

Parcela comercial

Se establecieron 3 parcelas experimentales de 500 plantas cada una en la Sociedad de Producción Rural (SPR) Quizás, del Municipio José María Morelos, Q. Roo, en diferentes etapas del año: de abril-agosto del 2011, de septiembre-diciembre del 2011 y de enero-abril del 2012 (Figura 3-1). Las plantas seleccionadas se muestrearon cada 30 días.



Figura 3-1. Ubicación de las parcelas experimentales dentro de la SPR Quizás. a) primera parcela experimental (abril-agosto). b) segunda parcela experimental (enero-abril). c) tercera parcela experimental (septiembre-diciembre).

Parcela comercial bajo control fitosanitario

Se seleccionó como parcela experimental una SPR ubicada en Much Meyá, Municipio José María Morelos, Quintana Roo (Figura 3-2), donde fue detectado por primera vez el

virus de la meleira en 2009 y que en ese momento alcanzó el 100% de incidencia provocando la pérdida total de la plantación. Este terreno se dejó sin sembrar por dos años y en mayo de 2011 se volvió a sembrar con plántulas de papaya obtenidas de semillas comerciales (La Cubana).

Esta parcela siguió las recomendaciones de manejo fitosanitario dadas por el Laboratorio GeMBio que fueron las siguientes:

- Monitoreo semanal de la huerta y eliminar plantas con síntomas del virus
- No coleccionar ni utilizar semillas de plantas enfermas.
- Desinfectar el material utilizado en el proceso de cosecha.
- Eliminar y quemar las plantas diagnosticadas positiva al virus.
- No intercambiar la maquinaria agrícola con las de huertas diagnosticadas con el PMeV.
- Que el personal no trabaje en diferentes huertas el mismo día.
- Recoger y eliminar los desechos vegetales de la huerta.

Para monitorear el estado fitosanitario de esta huerta se tomaron muestras de látex de manera aleatoria (cubriendo toda el área) una vez al mes



Figura 3-2. Ubicación de la plantación en la SPR Much-Meyá (15 ha) bajo manejo fitosanitario durante el periodo de noviembre 2011 a abril 2012.

3.2.2. Monitoreo de condiciones ambientales

En cada parcela comercial se registraron las temperaturas y la humedad relativa cada dos horas, con un registrador de datos (*datalogger*, Spectrum Technologies, Inc. USA). La información meteorológica fue recabada y exportada a una hoja de cálculo (Excel® de Microsof®) para su análisis.

3.2.3. Toma de muestras

La colecta de látex se realizó en frutos verdes de tamaño mediano (longitud entre 14 y 26 cm). El látex se obtuvo mediante ralladuras en la superficie del fruto con palillos estériles. Por cada fruto se colectaron 500 μ l de látex en tubos eppendorf de 2 ml, que contenían 1000 μ l de citrato de amonio 0.1 M (pH 6.5) para su análisis. Todas las plantas

muestreadas fueron marcadas en el tallo para su identificación. En el caso de la SPR "Much Meyá" se realizó el muestreo de forma aleatoria, cubriendo toda la plantación.

3.2.4. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de los ácidos nucleicos se utilizó el protocolo 1 descrito por Tavares *et al.*, (2004). La metodología del mismo se detalla a continuación:

Se tomaron 350 μ l del látex, se adicionaron 350 μ l de amortiguador de extracción (Tris 0.2 M, NaCl 0.3 M, EDTA 25 mM y SDS 2%, pH 7.5) y 14 μ l de proteinasa K (20 mg/ml). Se mezcló suavemente y se incubó a 37°C durante 30 min. Se adicionó 1V de fenol saturado con Tris-HCl (pH 7.5), y después las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 4 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se le añadió 1V de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugaron bajo las mismas condiciones del paso anterior. Se transfirieron 400 μ l de la fase acuosa a un tubo estéril y se les añadió 0.1 V de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 2.5 V de etanol absoluto frío. Se mezclaron suavemente y se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se decantó. El precipitado se secó a temperatura ambiente durante 5 min y se resuspendió en 50 μ l de agua libre de endonucleasas (Tavares *et al.*, 2004). El análisis de las bandas de ácidos nucleicos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (p/v) previamente teñidos con Bromuro de Etidio, (10 μ g/ μ l), en amortiguador TBE 1X (Tris-borato-EDTA). Las condiciones de corrida de los geles fueron de 120 V durante 50 min. Se utilizó como marcador el 1 Kb ladder. Los geles fueron visualizados en un transiluminador UV y las imágenes fueron capturadas y analizadas con el programa UVP BioImaging Systems.

3.3. Resultados

3.3.1. Monitoreo condiciones ambientales

Los registros obtenidos de temperatura y humedad relativa en las parcelas comerciales se muestran en la Figura 3.3. Los valores promedio semanales de las temperaturas máximas registradas estuvieron en un intervalo de 29 a 37.8 °C, mientras que la temperatura

mínima estuvo entre 14 y 24.6 °C. En la segunda semana de marzo, se presentó la temperatura más baja de este periodo con 14°C, mientras que la temperatura más alta se registró en la primera semana de mayo con 37.8 °C. La humedad relativa (HR) osciló entre 57 y 97%, el valor más bajo correspondió a la primera semana de marzo y la HR más alta se registró en la cuarta semana del mes de julio.

Relacionando estos datos con la incidencia de la enfermedad en el área experimental de Quizás, se puede apreciar que después de las temperaturas altas de mayo, el porcentaje de plantas afectadas por PMeV se elevó considerablemente, y que con las humedades más altas de los meses de julio y agosto el virus acabó por diseminarse en toda la parcela, aunque es necesario continuar los estudios en este sentido. Los resultados aquí obtenidos parecen indicar que las altas temperaturas (superiores a 30°C) y las humedades relativas por encima del 80% favorecen el desarrollo del PMeV en México.

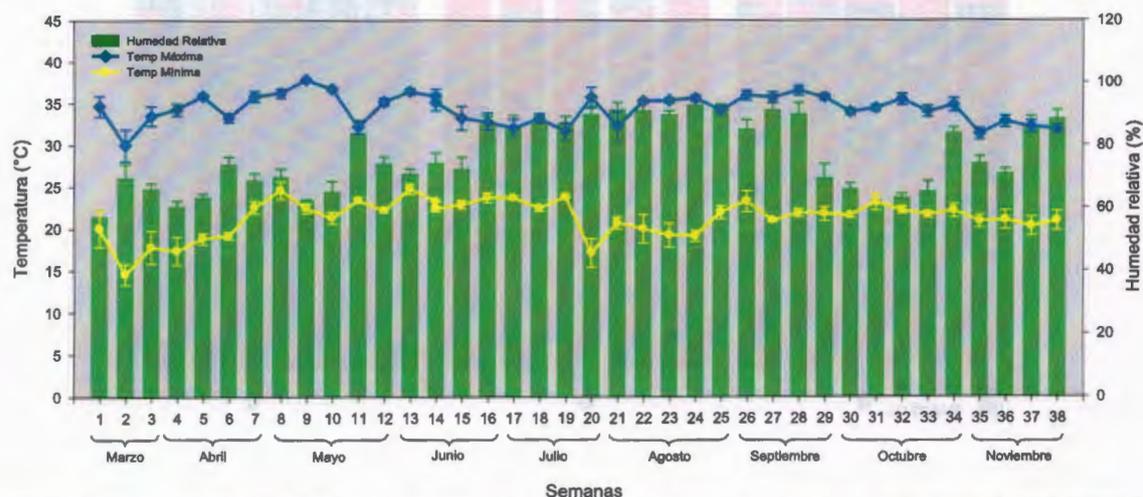


Figura 3-3. Comportamiento de las variables ambientales en la zona de estudio desde marzo a noviembre de 2010.

3.3.2. Análisis de la dispersión de PMeV en huerto comercial.

En la figura 3.4 se representa la distribución espacial del PMeV de cada parcela experimental, basada en el diagnóstico molecular que se muestra en el Cuadro 3-1. Como

se puede observar en el primer muestreo de la parcela experimental 1 (Figura 3-4a) se alcanzaron porcentajes de incidencia por líneas de plantas de 40-58%, mientras que en el primer muestreo de la parcela experimental 2 (Figura 3-4b) la incidencia fue mayor (69-78%). Este alto porcentaje de plantas infectadas por línea, puede ser una consecuencia de la posible transmisión mecánica del PMeV por el uso de herramientas de trabajo contaminadas utilizadas durante las cosechas, lo que coincide con lo reportado por Rodrigues *et al.*, (1989b) y Vidal *et al.*, (2004).

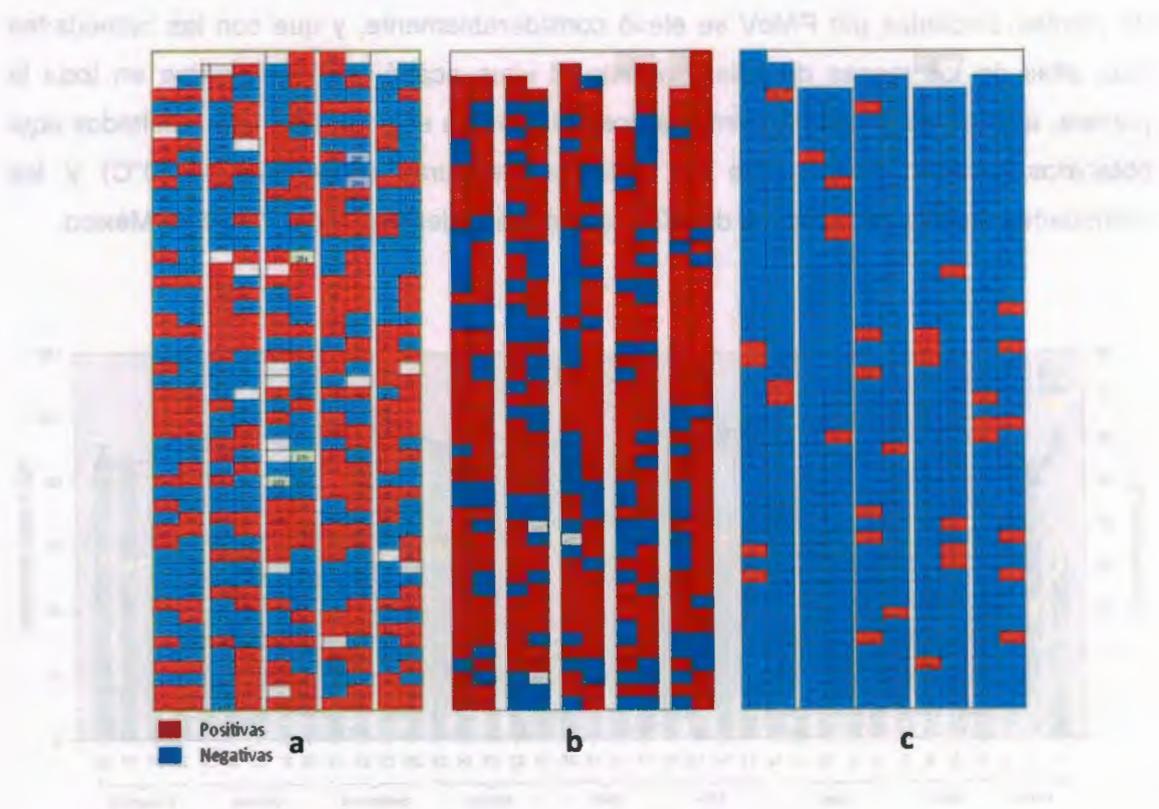


Figura 3-4. Distribución de PMeV en las parcelas experimentales en el primer muestreo. a) Parcela experimental 1, b) Parcela experimental 2 y c) Parcela experimental 3.

Cuadro 3-1. Porcentaje de incidencia por línea en las tres parcelas de papaya durante el primer muestreo.

Parcelas	Por Líneas	Entre Líneas	Fecha de Evaluación
Parcela Q1	48 – 58 %	47 – 56 %	Abril-Agosto 2011
Parcela Q2	69 – 78 %	68 – 74 %	Septiembre-Diciembre 2011
Parcela Q3	14 – 22 %	7.4 – 17 %	Enero-Abril 2012

Sin embargo, en la Figura 3-4c se puede apreciar un bajo porcentaje de incidencia del virus por línea y entre líneas (7.4-17%), esto se explica por el hecho de que en esta parcela no se había realizado la cosecha de frutos. La presencia del virus en dicha parcela puede estar asociada a la transmisión por semilla (datos del Laboratorio GeMBio) dado que el patrón de distribución de la enfermedad no fue uniforme, y la mayoría de las plantas diagnosticadas positivas, no estaban ubicadas en los bordes de la parcela, lo que minimiza la posibilidad de la influencia de un vector como transmisor del virus. Se ha reportado que en las áreas de mayor incidencia de meleira donde se considera que la transmisión se debe a vectores, la misma se ha presentado concentrada en los bordes de las parcelas (Vidal *et al.*, 2004). Este patrón de distribución coincide con lo reportado para geminivirus transmitidos por mosca blanca (Fargette *et al.*, 1993). Todo esto refuerza la hipótesis de que en esta parcela la presencia del PMeV se debió a la transmisión por semillas, mucho más si se considera que los productores de ésta SPR producen sus plántulas por selección de frutos de sus propias plantaciones, sin un diagnóstico previo de las frutas seleccionadas para obtener las semillas.

En la Figura 3-5 se puede apreciar la dinámica de la distribución de PMeV en las tres parcelas experimentales. La tendencia en los dos primeros muestreos para las tres parcelas, fue similar en cuanto a la pendiente de la línea. En la última parcela no se siguió el muestreo ya que la plantación fue abandonada. Respecto a las dos primeras parcelas,

se encontró una mayor incidencia de plantas enfermas en la segunda (Quizás 2), esto se debió a que los productores establecieron esta plantación con semilla proveniente de frutos enfermos lo que provocó hasta un 20% más de plantas enfermas para la misma etapa de plantación.

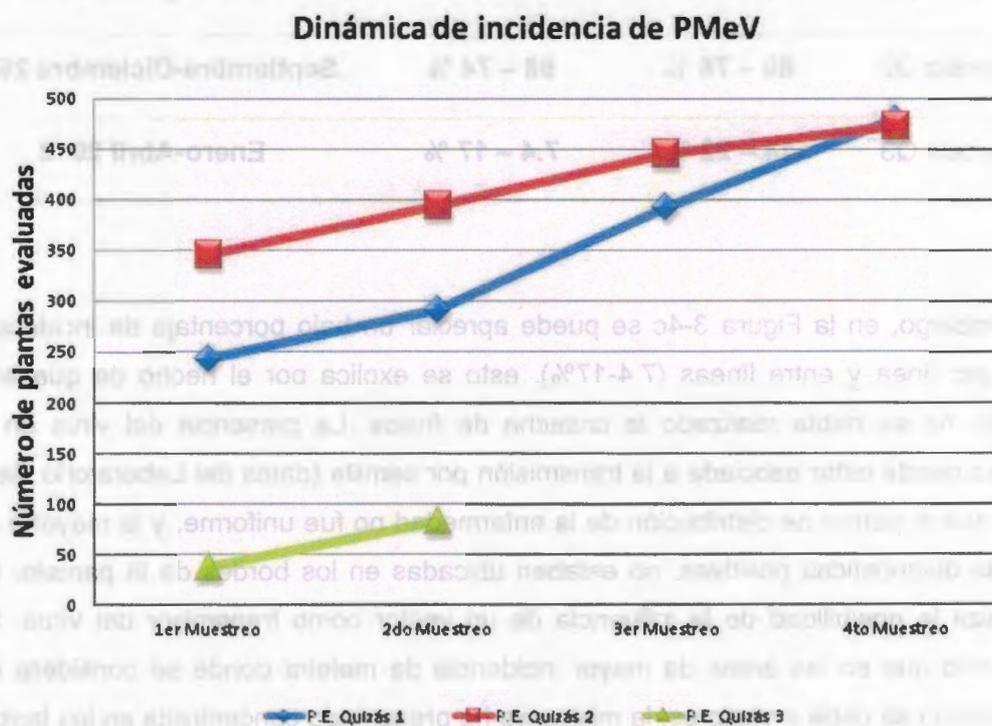


Figura 3-5. Incidencia de PMeV en las parcelas experimentales (2010-2011), P.E.: plantas enfermas con PMeV.

Es importante destacar que la incidencia del PMeV se vio favorecida por las precipitaciones, la humedad relativa alta (80%) y las temperaturas altas 30°C.

3.3.3. Incidencia del PMeV en una huerta comercial bajo control fitosanitario.

Durante todo el tiempo del experimento la huerta tuvo un buen desarrollo y alta producción. El diagnóstico molecular de la plantación comenzó a partir del séptimo mes posterior al trasplante (Cuadro 3-2; Figura 3-6) y la cosecha se inició al siguiente mes.. En el décimo mes se detectó una planta positiva a PMeV (Figura 3-7A) aunque estaba asintomática. Debido a que en esta ocasión el productor no siguió las indicaciones de GeMBio, respecto a cortar y quemar dicha planta, al mes siguiente se detectó en el muestreo, que las plantas aledañas estaban también infectadas aunque tampoco mostraban síntomas (Figura 3-7B). Esto indica la importancia del diagnóstico molecular para la detección temprana de la enfermedad, así como el manejo que se le dé a la huerta para controlar la diseminación del virus (Ventura *et al.*, 2004, Rodrigues *et al.*, 2009).

Tomando en cuenta lo anterior y de acuerdo a los cálculos de producción que se obtuvieron, el productor pudo recuperar e incluso superar lo invertido en la plantación, ya que el costo de la inversión por la plantación fue de 1'500, 000. 00 MN y el valor de la producción de la plantación, en un ciclo de un año, fue de 4' 950, 000. 00 MN. Estos datos corroboran que el PMeV puede ser controlado si se siguen las indicaciones hechas por el laboratorio GeMBio, y que estas recomendaciones le pueden generar al productor una mayor ganancia incluso en zonas donde el PMeV esté presente.

Cuadro 3-2. Evaluación de PMeV en la huerta comercial bajo control fitosanitario (SPR Much Meyá).

Mes de muestreo	Plantas Sanas	Plantas Enfermas
Octubre 2011	70	0
Noviembre 2011	70	0
Diciembre 2012	69	0
Enero 2012	65	1
Febrero 2012	55	4
Marzo 2012	50	6



Figura 3-6. Diagnóstico de PMeV en huerta de Much Meyá en el quinto muestreo. Línea M: Marcador molecular de 1Kb; Línea C-: Control negativo; Línea C+: Control positivo; Líneas 42, 44, 115, 182, 189: Plantas positivas a PMeV; Líneas 55, 58, 64, 61, 65, 66, 67, 69, 70, 71 y 72: Plantas negativas a PMeV.

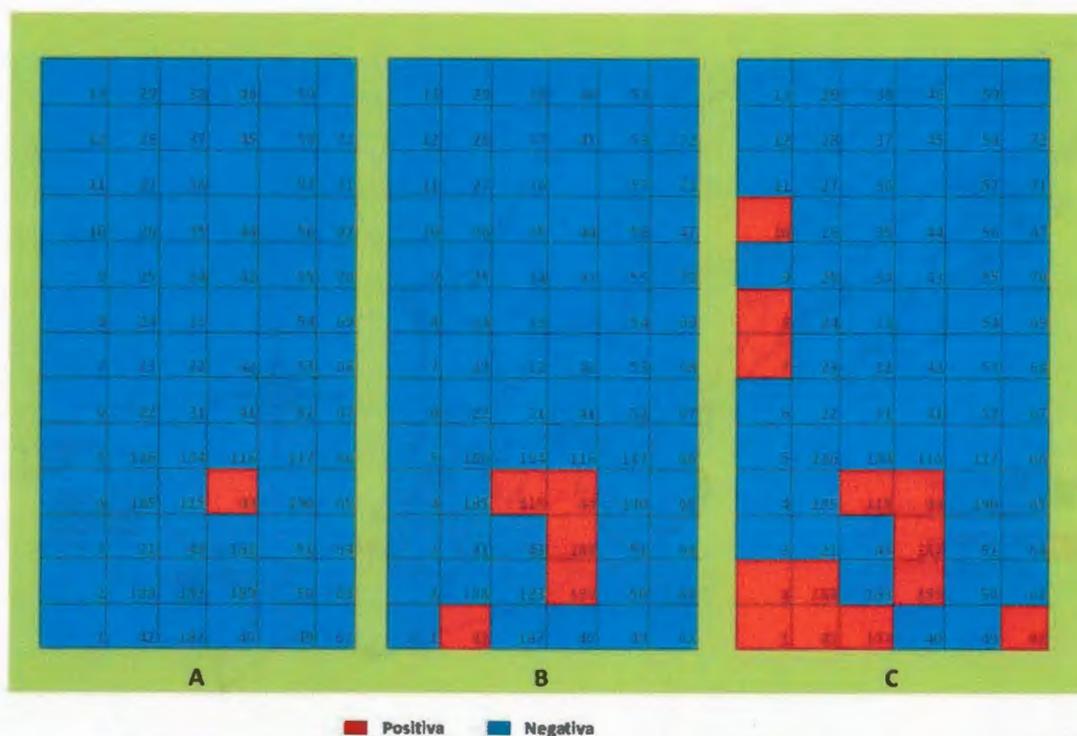


Figura 3-7. Distribución del PMeV en la huerta Much Meyá. A) Cuarto muestreo. B) Quinto muestreo y C) Sexto muestreo.

3.3.4. Distribución de PMeV en México.

Desde julio de 2009 hasta noviembre de 2012, se recibieron en el laboratorio GeMBio 1150 muestras de látex de papaya, procedentes de 29 municipios ubicados en 10 estados diferentes. Después de realizar el diagnóstico se encontró que 533 muestras (el 46.34%) resultaron positivas a PMeV (Figuras 3-8, 3-9, 3-10, 3-11 y 3-12). El hallazgo del PMeV en ocho estados, algunos de los cuales están entre los mayores productores de papaya a nivel nacional, es preocupante debido el impacto que pudiera tener la enfermedad sobre esta industria.

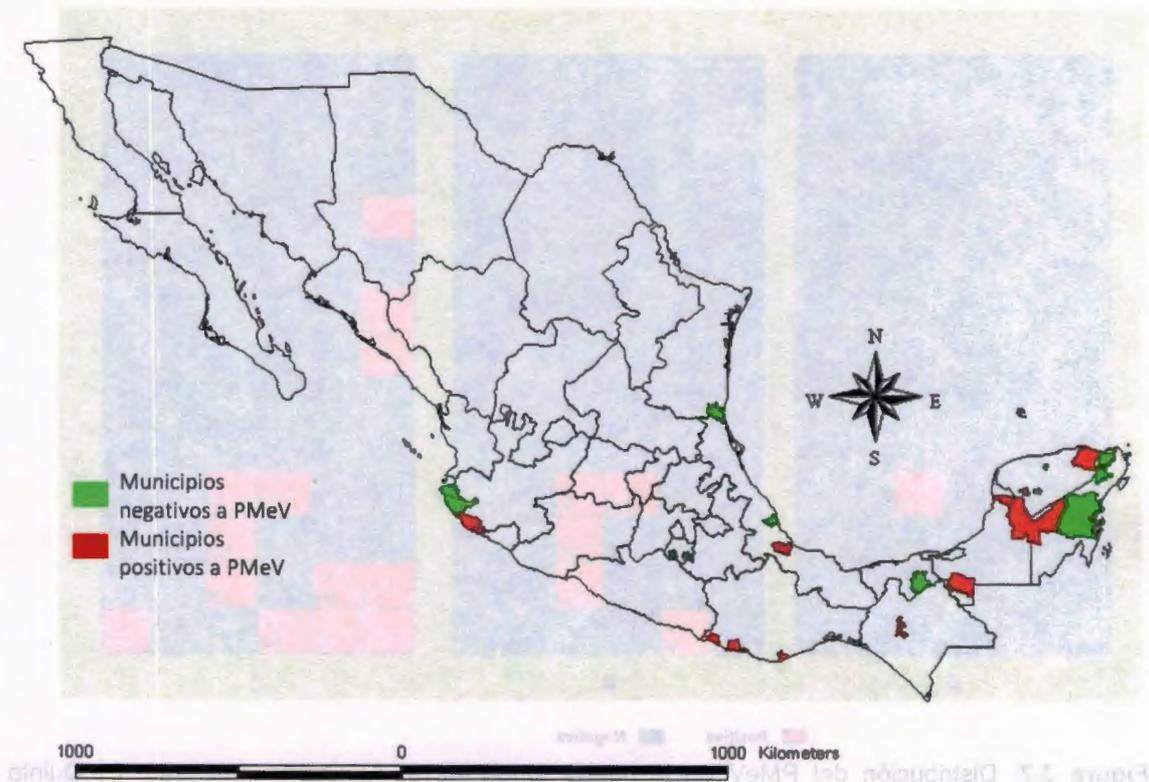


Figura 3-8. Municipios muestreados a nivel nacional con su resultado al Virus de la Meleira de la Papaya.

Desde julio de 2009 hasta noviembre de 2012, se recibieron en el laboratorio GemBio 1156 muestras de látex de papaya, procedentes de 59 municipios ubicados en 10 estados diferentes. Después de realizar el diagnóstico se encontró que 233 muestras (el 48.24%) resultaron positivas a PMeV (Figuras 3-8, 3-9, 3-10, 3-11 y 3-12). El hallazgo del PMeV en cinco estados, algunos de los cuales están entre los mayores productores de papaya a nivel nacional, es preocupante debido al impacto que podría tener la enfermedad sobre esta industria.

3.3.5. Mapa de la Zona Sur.

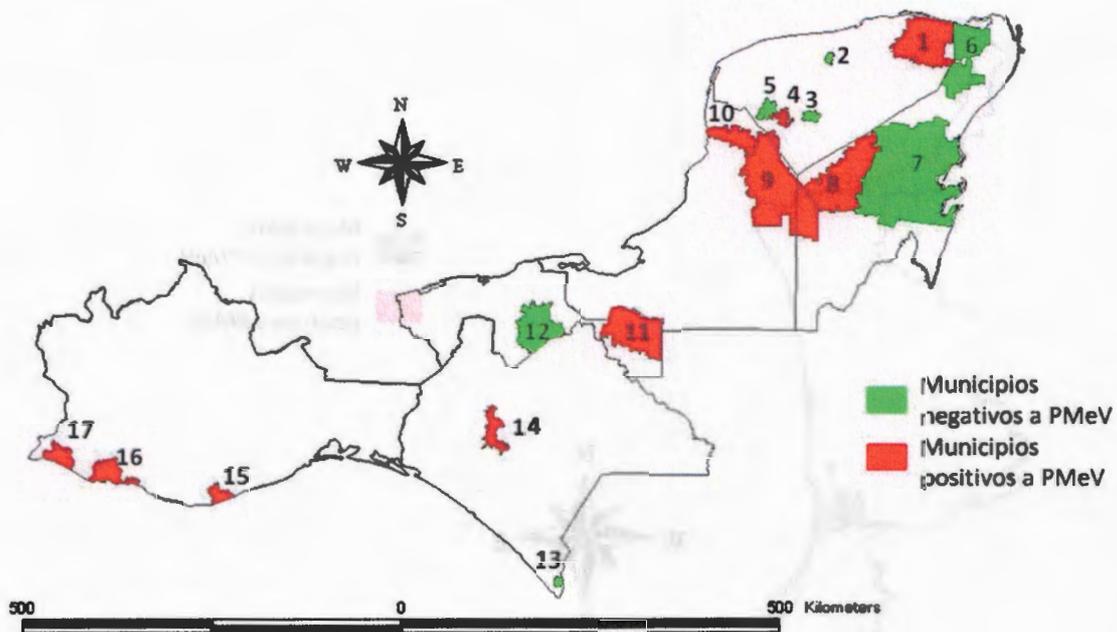


Figura 3-9. Municipios muestreados en la zona sur de México con su resultado al Virus de la Meleira de la Papaya: 1) Tizimín, Yucatán; 2) Tepakán, Yucatán, 3) Teabo, Yucatán; 4) Ticul, Yucatán, 5) Muna, Yucatán; 6) Lázaro Cárdenas, Q. Roo; 7) Felipe Carrillo Puerto, Q. Roo; 8) José María Morelos, Q. Roo; 9) Hopelchén, Campeche; 10) Hecelchakan, Campeche; 11) Balancán, Tabasco; 12) Macuspana, Tabasco; 13) Frontera, Hidalgo, Chiapas; 14) Chiapa de Corzo, Chiapas; 15) Santa María Huatulco, Oaxaca; 16) Tututepec, Oaxaca; 17) Pinotepa Nacional, Oaxaca.

3.3.6. Mapa de la Zona del Golfo.

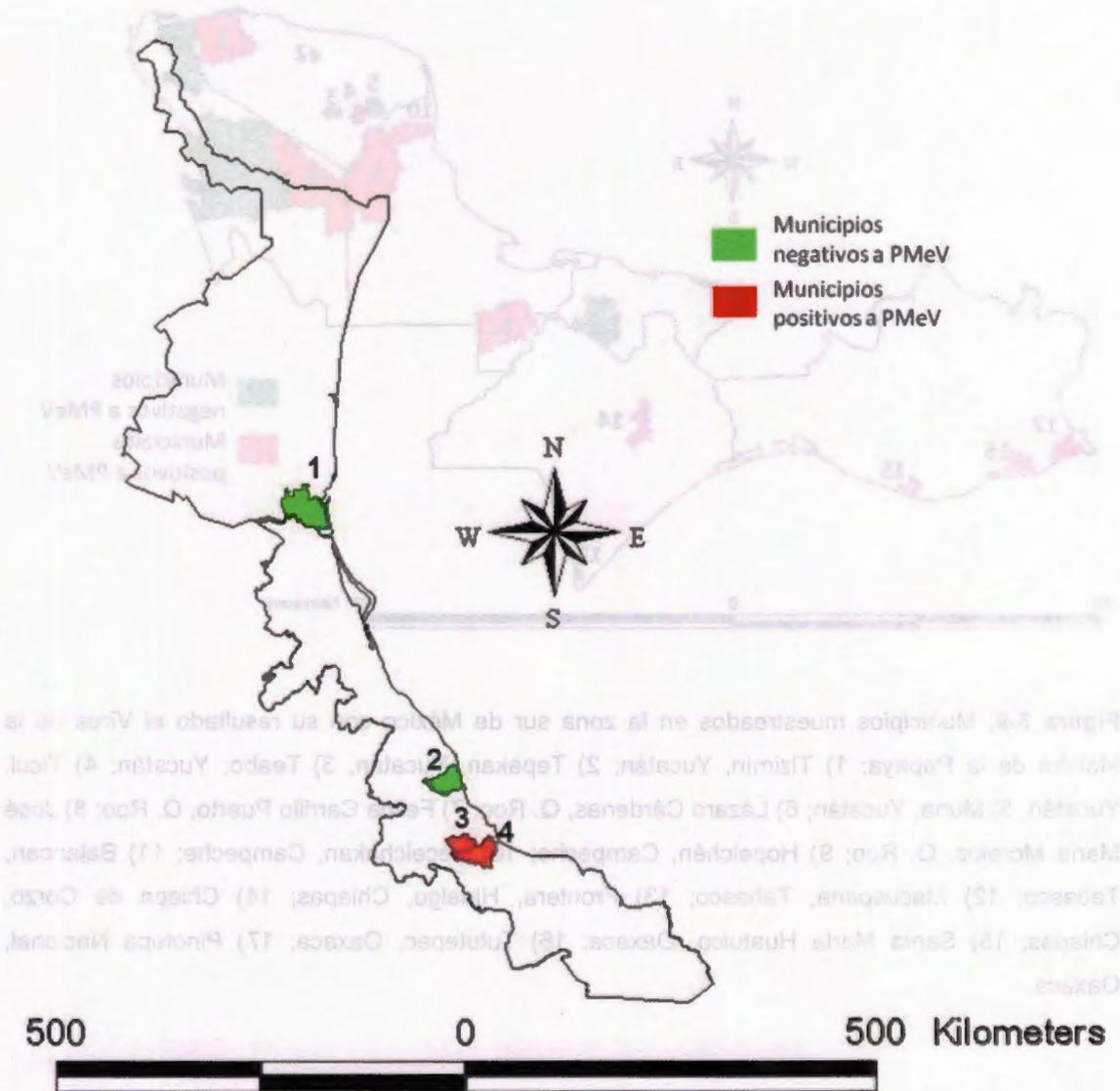


Figura 3-10. Municipios muestreados en la zona del Golfo de México con su resultado al Virus de la Meleira de la Papaya. 1) Altamira, Tamaulipas; 2) Actopan, Veracruz, 3) Cotaxtla, Veracruz; 4) Tlaxicoyan, Veracruz.

3.3.7. Mapa de la Zona del Centro.

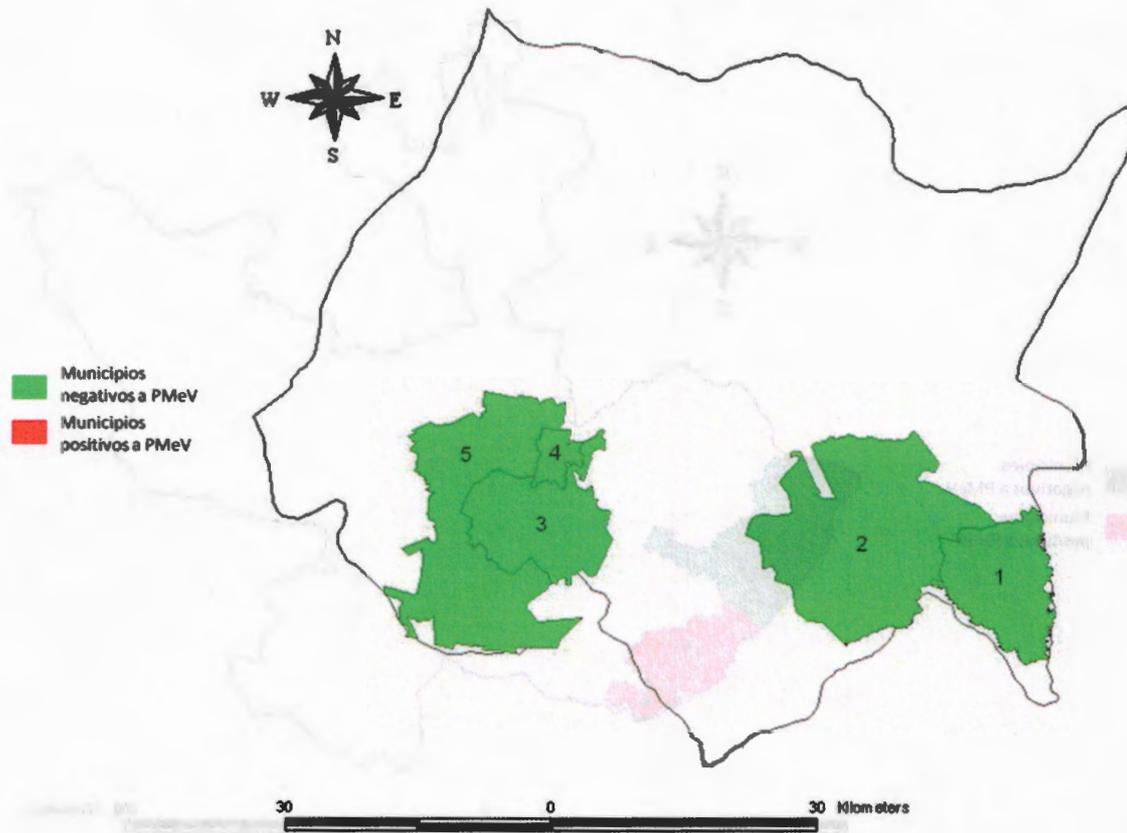


Figura 3-11. Municipios muestreados en la zona centro de México con su resultado al Virus de la Meleira de la Papaya. 1) Axochiapan, Morelos; 2) Tepalcingo, Morelos; 3) Jojutla, Morelos; 4) Zacatepec, Morelos; 5) Puente de Ixtla, Morelos.

3.3.8. Mapa de la Zona del pacífico.

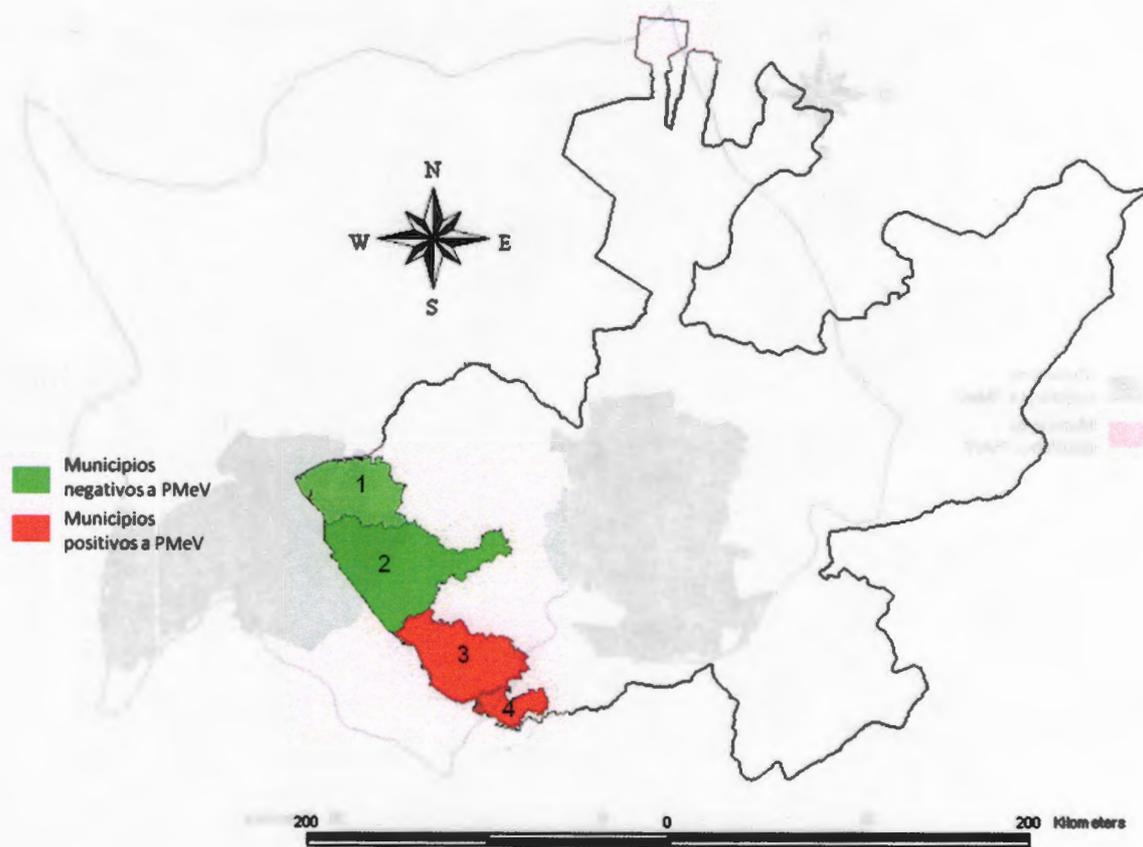


Figura 3-12. Municipios muestreados en la zona del Pacífico de México con su resultado al Virus de la Meleira de la Papaya. 1) Cabo Corrientes, Jalisco; 2) Tomatlán, Jalisco; 3) La Huerta, Jalisco; 4) Cihuatlan, Jalisco.

3.4. Discusión

La incidencia de la enfermedad en las parcelas estudiadas fue alta, alcanzó el 100% en tan solo cinco meses en la primera y en cuatro en la segunda. Estos niveles de infección coinciden con lo reportado en Brasil por Ventura y col. (2004).

En las parcelas comerciales bajo manejo fitosanitario del productor, la principal forma de transmisión fue por semilla, no mecánicamente, como se sugiere en el estudio de Vidal *et al.*, (2004). Esta hipótesis se refuerza por el hecho de que los productores en las tres parcelas evaluadas, plantaron papayas procedentes de semillas que ellos mismos tomaban de cultivos anteriores infectados con PMeV. Por ello, como se puede apreciar en la figura 3-5, el nivel de incidencia de la enfermedad se incrementó en el tiempo, ya que la parcela evaluada de abril a septiembre, tuvo inicialmente un 20% más de plantas enfermas, con respecto a la parcela muestreada previamente, de enero a abril del mismo año. Esta tendencia se mantuvo en la tercera parcela, que no tuvo ninguna labor agrícola que pudiera propiciar la dispersión del virus mecánicamente.

En cuanto a la distribución de PMeV en estas parcelas comerciales, no se observaron diferencias en los porcentajes de infección entre filas y líneas, este resultado difiere de lo reportado por Vidal *et al.*, (2004), que encontraron una mayor presencia de la meleira entre líneas. De acuerdo a la ubicación de las plantas positivas a PMeV en estas mismas parcelas, no se pudo encontrar un patrón de distribución de la enfermedad uniforme o definido, pero se pudo observar que las plantas positivas al virus no se ubicaron en los bordes de las parcelas. Esto contradice la teoría de que la transmisión del virus es a través de un vector (Vidal *et al.*, 2004), ya que si el patrón de distribución comenzara en los bordes, existiría la posibilidad de la transmisión de esta forma, como ha sido reportado para el virus del moteado del tomate que es transmitido por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) (Polston *et al.*, 1996).

Respecto a la sintomatología de la enfermedad del lloroso, se pudo observar que los síntomas son más perceptibles con temperaturas superiores a los 30°C y humedades relativas por encima del 80%. Esto coincide con lo reportado en Brasil, donde la incidencia

de la enfermedad se vio favorecida por las altas precipitaciones y la humedad relativa alta (Tagitaba *et al.*, 2002 y Vidal *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos sobre la incidencia del PMeV en la plantación comercial bajo control fitosanitario propuesto por el laboratorio GeMBio, en comparación con las parcelas bajo manejo fitosanitario del productor, demostraron que se puede controlar la presencia del virus en una plantación, siempre y cuando se sigan una serie de medidas fitosanitarias establecidas para minimizar la dispersión del virus, que se mencionan en el apartado (3.2.1). En este caso, esto le permitió al productor obtener un mayor rendimiento y ganancias superiores a lo que ya había invertido en la plantación.

Sin embargo, debido a que al final del ciclo de cosecha, el productor no siguió estrictamente las indicaciones de manejo, al no eliminar una planta asintomática diagnosticada positiva al PMeV, la enfermedad se diseminó rápidamente a las plantas aledañas. De aquí se desprenden dos aspectos fundamentales, el primero es que el diagnóstico molecular es de suma importancia para la detección temprana de la enfermedad, y el segundo que el manejo que se le dé a la huerta es vital para controlar la presencia y la diseminación del virus (Ventura *et al.*, 2004, Rodrigues *et al.*, 2009).

En lo que se refiere a la distribución del PMeV a nivel nacional, se ha detectado este virus en ocho de los veinte estados productores de papaya. Destaca por su impacto fitosanitario, la presencia de la meleira en Veracruz, que es el principal estado productor y exportador de papaya y más recientemente en Chiapas y Oaxaca, que se ubican como el segundo y tercer estados con mayor producción de este frutal en México.

De ahí se desprende la necesidad de recomendar la toma de acciones por parte de la SAGARPA y de los Comités Estatales de Sanidad Vegetal, para tratar de controlar la dispersión del PMeV en otras zonas productoras, y así evitar la diseminación de la enfermedad en el país, ya que este virus se ha visto que puede repercutir negativamente en la producción de papaya.

3.5. Referencias

- ArcView GIS 3.3. 2000. Environmental Systems Research Institute, Inc. ("ESRI"), a California corporation, with its principal place of business at 380 New York Street, Redlands, California, 92373-8100, USA.
- Carter, J. y V. Saunders (2007). *Virology: principles and applications*. Ed. John Wiley & Sons Ltd. USA. Pp 358.
- Fargette, D., V. Muniyappa, C. Fauquet, P. N'Guessan y J. C. Thouvenel (1993). Comparative epidemiology of three tropical whitefly-transmitted geminiviruses. *Biochimie*, 75, 547-554.
- Pérez-Brito, D., R. Tapia-Tussell, A. Cortés-Velázquez, A. Quijano-Ramayo, A. Nexticapan-Garcez, R. Martín-Mex (2012). First report of papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. *Afr. J. Biotechnol*, 11(71), 13564-13570.
- Polston, J.E. D. O. Chellemi, D.J. Schuster, R. J. MCGovern, P. A. Stansly (1996). Spatial and temporal dynamics of tomato mottle geminivirus and *Bemisia tabaci* (Genn.) in Florida tomato fields. *Plant Disease*, 80,1022-1028.
- Rodrigues, C.H., J. A. Ventura and L. A. Maffia (1989b). distribuição e transmissão da meleira em pomares de mamão no Estado do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, 14, (Supl.): 118.
- Rodrigues, S. P., G. G. Lindsay, P.M.B. Fernandes (2009). Biotechnological approaches for plant viruses resistance: From general to the modern RNA silencing Pathway. *Brazilian archives of biology and technology*, 52 (4), 795-808.
- Tagitaba, P.F., J. R. Liberato, L. Zambolim, J. A. Ventura, H. Costa (2002). Controle e condições climáticas favoráveis a amtracnose do mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 27(2), 186-192.

- Talbot, N (2004). *Plant-Pathogen Interactions*. Blackwell Publishing Ltd. USA. Pp 248.
- Tavares, E.T., J. S. Tatagiba, J.A. Ventura, M.T. Souza Jr (2004). Dois novos sistemas de diagnose precoce da meleira do mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 563-566.
- Ventura, J.A., H. Costa, J. Tatagiba (2004). Papaya diseases and integrated control. in: *Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management*, Naqvi, S.A.H. (ed). Kluwer, London. Pp 244-246.
- Vidal, C.A., F. F. A. Laranjeira, A. S. Nascimento, T. C. Habibe (2004). Distribuição espacial da meleira do mamoeiro em zonas detrópico úmido e trópico semi-árido. *Fitopatologia Brasileira* 29:276-281

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

4.1. Discusión general

El Papaya Meleira Virus ha causado pérdidas importantes en plantaciones de papaya en Brasil desde 1980. En el 2009 se detectó en México, en los estados de Campeche y Quintana Roo, y desde entonces se ha extendido a varios estados productores. Sin embargo a pesar del tiempo que ha transcurrido desde su aparición y de la importancia desde el punto de vista económico de la enfermedad para ambos países, no se conocen bien los mecanismos de transmisión de este virus y los pocos estudios que se han llevado a cabo no son concluyentes (Rodrigues *et al*; 2009b, Pérez-Brito *et al*; 2012).

En cuanto a estudios realizados sobre la transmisión por semilla del PMeV, sólo existe evidencia de un trabajo, donde se menciona que el PMeV no se transmite por semilla (Meisner Philo *et al.*, 2003). Sin embargo, estos resultados no fueron concluyentes, debido a que el diagnóstico molecular de las plantas procedentes de semillas enfermas se llevó a cabo a los 210 días de ser trasplantadas (cuando comenzó el proceso de fructificación) y el método de diagnóstico empleado, fue el de la extracción de ácidos nucleicos (Tavares *et al.*, 2004), que no tiene la sensibilidad necesaria para determinar los títulos virales bajos, en esa etapa fenológica de la planta, dado que la cantidad de látex no es suficiente en los conductos lactíferos donde se halla el virus.

En otro trabajo publicado por Abreu y colaboradores en el 2012, ellos plantearon que PMeV no se transmitía por semilla, sin embargo recomendaron que se hiciera un muestreo más amplio, ya que consideraron la probabilidad de que la infección del PMeV en semilla sea baja.

En el presente estudio se diagnosticó PMeV en semillas provenientes de frutos positivos al virus, mediante la técnica de RT-PCR con iniciadores específicos (Zamudio y López, 2012 en proceso de patente). El virus se encontró a los 160 días posteriores al trasplante y estuvo presente en un 70% de las plantas evaluadas. Esta detección temprana se debe

a que la RT-PCR es más sensible que la técnica de extracción de ácidos nucleicos reportada por Tavares y colaboradores en el 2004.

También se pudo diagnosticar PMeV directamente de semillas provenientes de frutos enfermos, observándose un porcentaje elevado de infección (superior al 50%). Estos resultados concuerdan con estudios de otros virus que son transmitidos por semilla, donde se han visto altos porcentajes de infección en plántulas procedentes de semillas con el virus, pero no un 100% (Hemmati y McLean, 1977; Johansen y Edwards; 1994).

Este trabajo es el primero en reportar que PMeV sí se transmite por semilla, y que el virus se encuentra en la testa, endospermo y embrión. La presencia del PMeV en las semillas quizás se deba a la evidente exudación de látex hacia el interior de la cavidad, donde se encuentran las mismas lo que propicia la transmisión. El hecho de encontrar el virus en el embrión-endospermo y el diagnóstico positivo en plantas provenientes de semillas de frutos enfermos da un mayor sustento a esta afirmación.

En lo que respecta a la presencia de PMeV en plantaciones infectadas, se observó que los síntomas de la enfermedad son más evidentes en temperaturas superiores a los 30°C y humedades relativas por encima del 80%, condiciones que para la Península de Yucatán se presentan que en los meses de julio y agosto. Esto coincide con las condiciones ambientales reportadas como favorables al virus en Brasil (Tagitaba *et al.*, 2002 y Vidal *et al.*, 2004).

En cuanto al control de la enfermedad, un factor muy importante es el de realizar el diagnóstico molecular, que permitirá la detección temprana del virus, evitando de esta forma su diseminación en las plantaciones. Otro factor determinante en el control de la enfermedad, es llevar a cabo un buen manejo fitosanitario de la huerta, lo que se comprobó en la parcela donde el productor siguió lo recomendado por GeMBio, esto se tradujo en un mayor rendimiento en la cosecha, y le generó ganancias que rebasaron la inversión que había hecho al establecer la plantación.

Un dato muy importante por sus implicaciones fitosanitarias y económicas, es que en este trabajo se detectó PMeV en ocho estados productores de papaya (Campeche, Q. Roo, Tabasco, Jalisco, Yucatán, Veracruz, Chiapas y Oaxaca) estos tres últimos se ubican como los principales estados productores de dicho fruto, con un considerable volumen de exportación.

Los resultados generados en este trabajo que mostraron la transmisión del PMeV por semilla, la distribución espacial del virus en las plantaciones afectadas, así como el estatus de la distribución del PMeV a nivel nacional, constituyen el primer acercamiento a la problemática de esta enfermedad en México y resaltan la importancia un diagnóstico certero temprano. Al mismo tiempo, se pudo demostrar que con una estrategia de manejo fitosanitario adecuada, se puede obtener una buena producción de papaya, aún en áreas de alta incidencia del virus. Todo esto constituye un punto de partida para productores, investigadores y especialistas de SAGARPA, para que puedan establecer políticas fitosanitarias y estrategias de control del PMeV en el país, con el fin de evitar una mayor diseminación de la enfermedad y disminuir las posibles repercusiones negativas en el aspecto económico.

4.2. Conclusiones

- El Papaya Meleira virus sí es transmitido por la semilla de la papaya.
- El virus se encuentra en el embrión-endospermo y en la testa
- El porcentaje de germinación disminuye hasta un 30% cuando las semillas provienen de frutos diagnosticados positivos a PMeV.
- Los síntomas de la enfermedad son más evidentes en temperaturas superiores a los 30°C y en humedades relativas por encima del 80%.
- El diagnóstico molecular del PMeV debe realizarse tanto en semillas como en plantaciones para detectar el virus oportunamente y poder tomar medidas de control de la enfermedad como las reportadas por el laboratorio GeMBio.
- El PMeV se ha diagnosticado hasta el momento en los ocho principales estados productores de papaya.
- Es posible obtener una buena producción de papaya en áreas con alta incidencia del PMeV si se sigue la estrategia de manejo fitosanitario indicada por GeMBio.

4.3. Perspectivas

Con el conocimiento generado en este estudio resalta la importancia de implementar un programa de certificación de semillas de papaya que garantice la utilización por parte de los productores de semillas y/o plántulas libres de PMeV, esto puede lograrse a través del diagnóstico molecular.

Es necesario continuar el estudio de la enfermedad y de otros mecanismos de transmisión del PMeV para optimizar la estrategia de manejo de la enfermedad propuesta por GeMBio.

4.4. Referencias

- Abreu P.M., J.G. Piccin, S.P. Rodrigues, D. S. Buss, J.A. Ventura, P.M. Fernandes (2012). Molecular diagnosis of Papaya meleira virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 180, 11-17.
- Rodrigues, S.P., M. da Cunha, J.A. Ventura, P. M. B. Fernandes (2009c). Effects of the papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. *Plant Cell Report*, 28, 861-871.
- Rodrigues, S.P., J. S. Andrade, J. A. Ventura, G. G. Lindsey, P.M.B. Fernandes (2009b). Papaya meleira virus is neither transmitted by infection at wound sites nor by the whitefly *Trialeurodes variabilis*. *Journal of Plant Pathology*, 91(1), 87-91.
- Tagitaba, P.F., J. R. Liberato, L. Zambolim, J. A. Ventura, H. Costa (2002). Controle e condições climáticas favoráveis a amtracnose do mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 27(2), 186-192.
- Pérez-Brito, D., R. Tapia-Tussell, A. Cortés-Velázquez, A. Quijano-Ramayo, A. Nexticapan-Garcez, R. Martín-Mex (2012). First report of papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. *Afr. J. Biotechnol*, 11(71), 13564-13570.
- Tavares, E.T., J. S. Tatagiba, J.A. Ventura, M.T. Souza Jr (2004). Dois novos sistemas de diagnose precoce da meleira do mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 563-566.
- Hemmati, K. and McLean D. L. (1977). Gamete-seed transmission of alfalfa mosaic virus and its effect on seed germination and yield in alfalfa plants. *Phytopathology*, 67,576-79.
- Johansen, E. y Edwards, M (1994). Seed transmission of viruses: Currents Perspectives. *Annu. Rev. Phytopathol*, 32,363-386.

- Meissner Filho, P. E., L.S. Santos, C.V. Moreira, A.I. Santos y T.C. Habibe (2003).
Avaliacao da transmissao da Meleira pelas sementes de mamoeiro. *Fitopatología Brasileira*, 28, S394. (Resumo).
- Ventura, J.A., H. Costa, J. Tatagiba (2004). Papaya diseases and integrated control. in:
Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management, Naqvi, S.A.H. (ed).
Kluwer, London. Pp 244-246.
- Vidal, C.A., F. F. A. Laranjeira, A. S. Nascimento, T. C. Habibe (2004). Distribuição
espacial da meleira do mamoeiro em zonas detrópico úmido e trópico semi-árido.
Fitopatologia Brasileira 29:276-281
- Zamudio, E.; L. Lopez 2012. *En proceso de patente*. México.

ANEXOS

1. EXTRACCIÓN DE ARN:

- ✓ Se colocaron en un tubo eppendorf limpio y estéril 30 mg del tejido macerado, y se añadieron 350 μ l de RA1 + 3.5 μ l de β - Mercapto.
- ✓ Homogenización por vortéx.
- ✓ Transferencia del homogenizado a una columna RNAspin mini filtro
- ✓ Se centrifugó a 11 000 xg (13 000rpm), durante 1 min.
- ✓ Transferencia del filtrado a un tubo nuevo de 1.5 ml.
- ✓ Se adicionaron 350 μ l de etanol al 70% y se homogenizó por vortex de 2 -5 seg.
- ✓ Se transfirió el lisado a una columna RNAspin Mini
- ✓ Se centrifugó a 8 000 g (10 000 rpm) por 30 seg. Y se colocó la columna en un nuevo tubo colector.
- ✓ Se adicionaron 350 μ l de MDB (Membrane Desalting Buffer) y se centrifugó a 11 000 xg (13 000rpm) durante un min.
- ✓ Se eliminó el contenido del tubo colector y se colocó en la columna.
- ✓ Se adicionaron 95 μ l de la mezcla de DNasa
- ✓ Se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente y se añadieron 200 μ l de Buffer RA2, se centrifugó a 11 000 g (13 000 rpm) por 1 min.
- ✓ Se colocó la columna a un nuevo tubo colector y se añadieron 600 μ l de buffer RA3, se centrifugó a 11 000 xg (13 000 rpm) durante 1 min.

- ✓ El filtrado se eliminó y la columna se colocó en un nuevo tubo colector, se añadieron 250 μl de RA3, se centrifugó a 11 000 g (13 000 rpm) durante 2 min.
- ✓ Se colocó la columna en un tubo de 1.5 ml libre de nucleasas y se añadieron 100 μl de agua libre de nucleasas;
- ✓ Por último se centrifugó a 11 000 g (13 000rpm) por 1 min.

2. Síntesis de ADNc:

- Tomar 1 μg de ARN (2 μl) y añadir 1 μl de dNTPs (10mM), 1 μl de hexámeros (100ng/ μl) y 8 μl de agua libre de endonucleasas.
- Se incubó esta mezcla a 65°C durante 5 min. Después de dicha incubación, las muestras se colocaron en hielo durante 4 min.
- Se adicionó 4 μl de Buffer first 5x, 2 μl de DTT, 1 μl de Rnasa out y 1 μl de MLV-Reversa transcriptasa.
- Esta reacción se incubó a 25°C durante 10 min., seguido de una incubación de 37°C durante 50 min y por último una incubación a 70°C por 15 min.

