

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE VIRUS ASOCIADOS AL CULTIVO DE PAPAYO (*Carica papaya* L.) 'MARADOL' EN EL ESTADO DE COLIMA.

Salvador Guzmán-González*
 Jesús Ricardo Rentería-Campos
 Pedro Valadez-Ramírez
 Marco Tulio Buenrostro-Nava
 Gilberto Manzo-Sánchez
 UNIVERSIDAD DE COLIMA, FACULTAD DE
 CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS,
 LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y
 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.
 Saúl Fraire Velázquez
 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

*Autor responsable:
sguzman@uacol.mx

MOLECULAR IDENTIFICATION OF VIRUS ASSOCIATED TO PLANTATIONS OF PAPAYA (*Carica papaya* L.) VAR. "MARADOL" IN THE STATE OF COLIMA

R E S U M E N

El papayo (*Carica papaya* L.) es un cultivo de gran importancia económica en los países tropicales y subtropicales del mundo, ya que su fruta posee gran valor nutritivo y se puede consumir en fresco o procesada industrialmente. Sin embargo, en este cultivo las enfermedades causadas por virus son las más devastadoras. En México, son pocos los estudios que se han realizado en *C. papaya* orientados a la caracterización genética de los virus. El objetivo del presente trabajo fue identificar los virus asociados al cultivo de papayo (*Carica papaya* L.) 'Maradol' en el estado de Colima con base en técnicas moleculares. Se empleó la técnica de RT-PCR para la identificación de virus con genomas de ARN, y de PCR para virus con genomas de ADN en muestras de plantas con síntomas característicos de enfermedades virales. Los análisis moleculares evidenciaron que en el 100% de las plantas estaba presente el PRSV-P mientras que los virus PapMV y *Geminivirus* estuvieron ausentes. También se encontró la presencia simultánea de PRSV-P y de *Rhabdovirus* en una muestra. En este estudio se determinó que el virus PRSV-P es el más abundante en las plantaciones comerciales del estado de Colima, por lo que es importante tomar las medidas de manejo pertinentes.

Palabras clave: *Papaya*
ringspotvirus-P, RT-PCR, *Rhabdovirus*

ABSTRACT: Papaya (*Carica papaya* L.) is a crop with great economic importance in the tropical and subtropical countries of the world, since the fruit has great nutritive value and can be consumed fresh or processed. However, diseases caused by viruses are the most devastating for this crop. In Mexico, few studies aimed on genetic characterization of in papaya's viruses have been conducted. The objective of this work was to identify viruses associated with papaya var. "Maradol" in the state of Colima based on molecular techniques. The RT-PCR technique was used to identify viruses with RNA genome and PCR for those with a DNA genome, and by analyzing plant samples with characteristic viral symptoms. Molecular analyses showed that PRSV-P was present in 100% of the plants, while confirming the absence of PapMV and *Geminivirus* viruses were absent. PRSV-P and *Rhabdovirus* were detected simultaneously in one sample. This study shows that PRSV-P virus is the most abundant in commercial papaya plantations of the state of Colima, and this knowledge is relevant to establish management measurements.

Keywords: *Papaya ringspotpotyvirus-P*, RT-PCR, *Rhabdovirus*

INTRODUCCIÓN:

El papayo (*Carica papaya* L.) es un cultivo de gran importancia económica en los países tropicales y subtropicales del mundo, ya que su fruta posee gran valor nutritivo y se puede consumir en fresco o procesada industrialmente (Peña, 2008).

Anualmente se pierde entre el 10% y 14.1% de la producción de los cultivos debido a enfermedades (Strange *et al.*, 2005). En el caso de papayo, las patologías causadas por virus son las de mayor importancia económica (Gonsalves, 1998). En México se reportan pérdidas de hasta el 85% para los estados de Colima, Veracruz y Guerrero (Silva-Rosales *et al.*, 2000) ocasionadas únicamente por el virus de la mancha anular del papayo (VMAP) [por sus siglas en inglés; PRSV-P (*Papaya ringspotpotyvirus-P*, *Potyvirus*, *Potyviridae*)].

A pesar que existen diversas técnicas para la detección de los virus como la observación directa de síntomas, la inoculación en plantas indicadoras, la microscopía óptica y electrónica, así como los procedimientos serológicos con ELISA, el uso de técnicas moleculares como la PCR y sus variantes (e.g. RT-PCR) (Ruiz-Castro y Silva-Rosales, 1997; Maoka *et al.*, 2005) ofrecen un alto grado de sensibilidad y confiabilidad en los resultados, lo que permite llevar a cabo detecciones tempranas del virus para idear un manejo integrado de la enfermedad de forma adecuada y oportuna. El objetivo del presente trabajo consistió en identificar los virus asociados al

cultivo de papayo (*Carica papaya* L.) 'Maradol' en el estado de Colima mediante técnicas moleculares.

M E T O D O L O G Í A :

Se tomaron muestras de un predio comercial de cada municipio de Armería, Colima, Ixtlahuacán y Tecomán en el cual se seleccionaron plantas de papayo 'Maradol' con síntomas característicos de presencia de virus (e.g. mosaicos, deformación de hojas, corrugado, necrosis), colectándose aproximadamente 50 g de tejido vegetal. Las muestras fueron etiquetadas y almacenadas a -80 °C hasta ser procesadas. El ARN total fue extraído de cada muestra empleando el protocolo y reactivo TRIzol® y 100 mg de tejido fino, obtenido por molienda en mortero en presencia de N₂ líquido. La pastilla resultante de ARN se disolvió con 20 µL de agua ultrapura tratada con dietilpirocarbonato, y se almacenó en ultracongelador a -20°C hasta su uso. ADN total se extrajo mediante el protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1987) con algunas modificaciones, el cual se basa en el uso del detergente CTAB y tratamiento con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. El ADN se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol enfriado a -20°C y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2. La pastilla resultante se disolvió en 20 µL de agua ultrapura.

Posteriormente se empleó la técnica de RT-PCR para la identificación de los virus con genomas de ARN usando los siguientes iniciadores (*Potyvirus*: CP: 5'GACCATGGTCCTAGAATGAAGCTGTGGATG3'T8: 5'TTTTTTCTCTCATTCTAAGAGGCTC3'; *Rhabdovirus*: RhabF: 5'GGATMTGGGBCATCC3', RhabR: 5'GTCCABCCYTTTTGYC3' y *Potexvirus*: PapMVf: 5'TTCCTCACACCACCTCCCGACCACAGTAAG3', PapMVr: 5'CAAATAGTGCTAAACAACGGGCTGGGTCAAG3'). Para lo cual se usó oligonucleótido especie o género-específico en antisentido a 2 µM, 2 µL (2 µg) del ARN total de cada muestra, 1 µL de dNTPs 10 mM y 8 µL de H₂O ultrapura tratada con dietilpirocarbonato.

Posteriormente, por tubo se agregaron 4 µL del amortiguador para la síntesis de la primera cadena (5X), 2 µL de DTT 0.1 M y 1 µL (40 U) de inhibidor recombinante de RNAasa y se mezcló, se centrifugó y se incubó a 37°C durante 2 min. Enseguida, se agregó 1 µL (200 U) de la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, EE.UU.) y se mezcló con una micropipeta, incubándose luego a 37°C durante 50 min. Finalmente la enzima se inactivó a 70°C durante 15 min.

La amplificación mediante PCR se realizó empleando los oligonucleótidos previamente descritos. Las condiciones de reactantes

fueron: 1X del amortiguador de PCR, 1.5-2.0 mM de $MgCl_2$, 100-150 μM de dNTPs, 0.5-1.0 μM de cada oligonucleótido, 1.0-1.5 U de Taq ADN polimerasa y 2 μL del producto de la RT o 100 ng de ADN total (para la detección de *Geminivirus*). El volumen final se ajustó a 25 μL con agua ultrapura. Los productos de las reacciones de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Los síntomas foliares registrados con mayor frecuencia fueron necrosis (Figura 1A), amarillamiento (Figura 1B), mosaicos y moteados (Figura 1C) y filiformidad (Figura 1D). Algunas muestras asintomáticas, presentes en los predios muestreados, donde existían plantas altamente afectadas con síntomas virales, también fueron incluidas en este estudio.

De acuerdo a los ensayos por RT-PCR, de las especies y géneros virales incluidos en esta investigación, sólo se detectó a PRSV-P en todas las muestras analizadas de los cuatro municipios del estado de Colima.

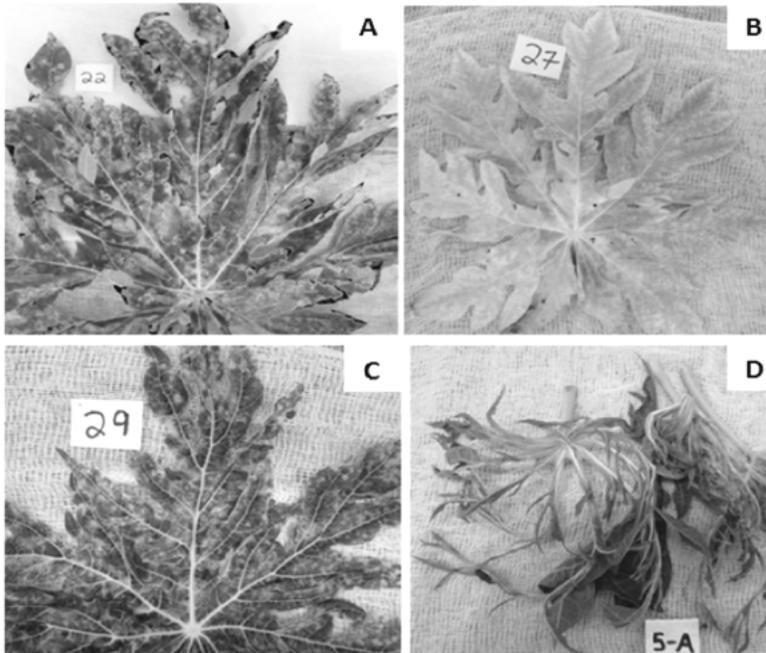


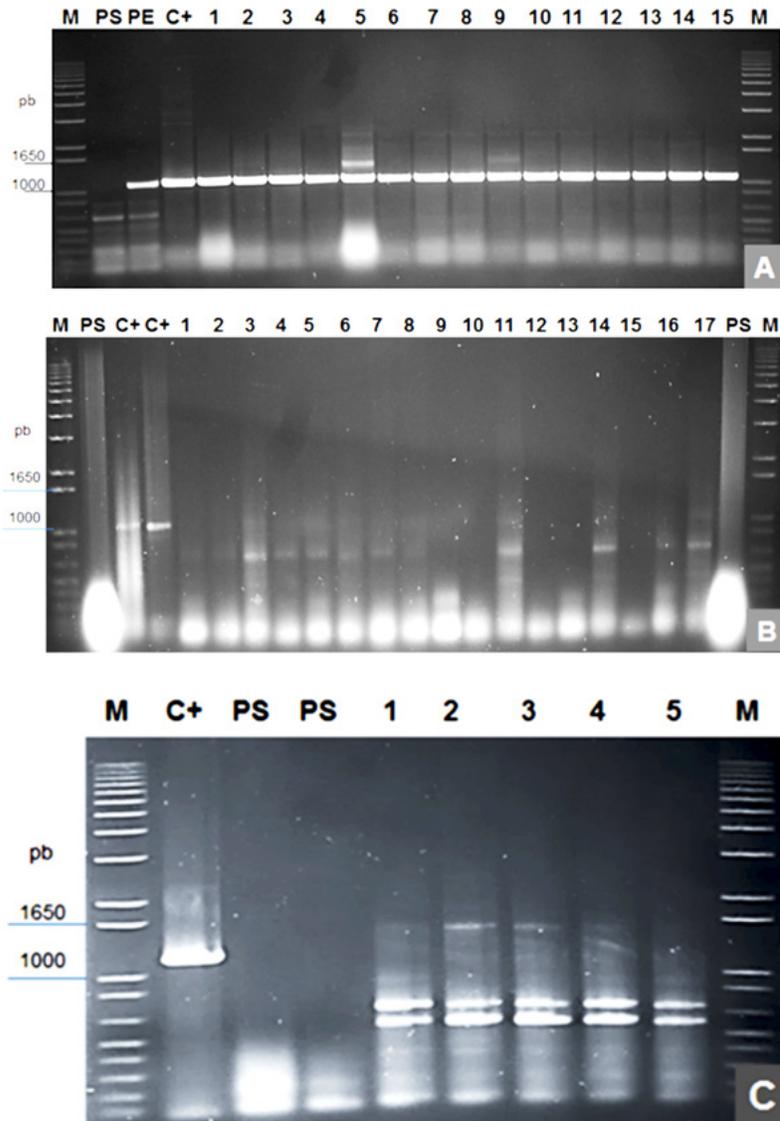
FIGURA 1.

Síntomas registrados en hojas de papayo 'Maradol' colectadas en el estado de Colima.

El diagnóstico se basó en la presencia del fragmento de aproximadamente 1000 pb correspondiente al gen codificante para la proteína de la cápside (Figura 2A). Los resultados negativos de los ensayos de detección para PapMV y *Geminivirus* se muestran en las Figuras 2B y 2C, respectivamente. El hecho de que la detección de PapMV haya sido negativo, coincide con lo reportado previamente (Noa-Carrazana *et al.*, 2006; Noa-Carrazana *et al.*, 2001), donde reportan que este *Potexvirus* no se encontró en el estado de Colima, pero sí en la región sureste comprendida por Campeche, Quintana Roo y Yucatán. Solo una muestra dio positivo para *Rhabdovirus* en papaya 'Maradol' colectada en el estado de Colima (dato no mostrado).

FIGURA 2.

Geles de agarosa con resultados de detección molecular de virus en hojas de papayo 'Maradol' en el estado de Colima. pb: par de bases, PS: planta sana, PE: planta enferma, C+: control positivo, M: marcador de peso molecular de 1 kpb plus (Invitrogen), carriles 1-17: muestras. En A. PRSV-P, B. *Geminivirus* y C. PapMV.



CONCLUSIONES

Papaya ringspotpotyvirus-P (PRSV-P) está asociado al cultivo de papayo (*Carica papaya* L.) 'Maradol' en el estado de Colima. Se detectó *Rhabdovirus* en una muestra de papaya 'Maradol' colectada en el estado de Colima, dato que demanda la realización de posteriores estudios.

REFERENCIAS

- DOYLE, J.J. y Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15.
- GONSALVES, D. (1998) Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annual Review of Phytopathology* 36: 415-437.
- MAOKA, T. y Hataya, T. (2005) The complete nucleotide sequence and biotype variability of Papaya leaf distortion mosaic virus. *Phytopathology* 95:128-135.
- NOA-CARRAZANA, J.C., González-de-León, D., Ruiz-Castro, B.S., Piñero, D., y Silva-Rosales, L. (2006) Distribution of Papaya ringspot virus and Papaya mosaic virus in papaya plants (*Carica papaya*) in Mexico. *Plant Disease* 90: 1004-1011.
- NOA-CARRAZANA, J.C. y Silva-Rosales, L. (2001) First Report of a Mexican isolate of Papaya mosaic virus in papaya (*Carica papaya*) and pumpkin (*Cucurbitapepo*). *PlantDisease* 85: 558.
- PEÑA, I. (2008) Enfermedades virales en el cultivo del papayo (*Carica papaya* L.). *Revista CitriFru* 25: 1.
- RUIZ-CASTRO, S. y Silva-Rosales, L. (1997) Use of RT-PCR for Papaya Ringspotvirus detection in papaya (*Carica papaya*) plants from Veracruz, Tabasco and Chiapas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 15: 86-90.
- SILVA-ROSALES, L., Becerra-Leor, N., Ruiz-Castro, S., Téliz-Ortiz, D. y Noa-Carrazana, J.C. (2000) Coat protein sequence comparisons of three Mexican isolates of papaya ringspot virus with other geographical isolates reveal a close relationship to American and Australian isolates. *Archives of Virology* 145: 835-843.
- STRANGE, R.N. y Scott, P.R. (2005) Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology* 43: 83-116.

AGRADECIMIENTOS:

Al Fondo Ramón Álavarez Buylla de Aldana 2011-C04 de la Universidad Colima, por el financiamiento del proyecto No. 865/13.