



00387

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DE RAZAS DEL
POTYVIRUS MANCHA ANULAR DEL
PAPAYO (VMAP) Y DETERMINACIÓN
DE LOS RESERVORIOS DEL VIRUS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

ENRIQUE NOÉ BECERRA LEOR

DIRECTOR DE TESIS: DR. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2006

M. 41868

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DE RAZAS DEL
POTYVIRUS MANCHA ANULAR DEL
PAPAYO (VMAP) Y DETERMINACIÓN
DE LOS RESERVORIOS DEL VIRUS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

ENRIQUE NOÉ BECERRA LEOR

DIRECTOR DE TESIS: DR. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

MÉXICO, D.F.

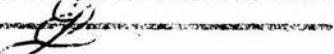
FEBRERO 2006

DEDICATORIA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo tradicional.

NOMBRE: Entrevue Acé Boletor

FECHA: 22-FEBRERO-2006

FIRMA: 

A Xóchitl e Iván, Norma, Ignacio,
Florina.

A la memoria de mi mamá Cesy Leor Ruiz y
el Dr. Raúl Mosqueda Vázquez.

AGRADECIMIENTOS

Al INIFAP por proporcionarme la Beca para continuar mis estudios y las facilidades que me otorgaron durante la realización de la misma.

Al CONACYT por proporcionarme parte de la beca para continuar mis estudios.

A la UNAM en especial a la Facultad de Ciencias por permitirme seguir estudiando un postgrado y superarme académicamente.

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña por su apoyo en la dirección del trabajo de tesis y su amistad brindada durante muchos años y a su familia (Tete y Adriana), por haberme apoyado en múltiples ocasiones que trabaje en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Chapingo.

A la Dra. Elizabeth Cárdenas Soriano por participar en el Comité Tutorial y su apoyo en las técnicas de microscopía y críticas en la realización del trabajo que redundaron en un mejor documento.

A la Dra. Laura Silva Rosales por su participación en el Comité Tutorial y apoyo constante, facilidades y dirección en el trabajo de laboratorio en el CINVESTAV, además de involucrarme en el fascinante mundo de la biotecnología. Por su amistad y aliento que fueron un apoyo para terminara el trabajo.

Al Dr. Téofilo Herrera Suárez por ser un ejemplo para los estudiantes con su actitud positiva y por la revisión del escrito.

A la Dra. Magda Carvajal Moreno por su ejemplo como investigadora e invaluable apoyo e ideas para mejorar el escrito, además de la amistad que nos une.

Al Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz por la revisión del escrito y su amistad.

Al Dr. Daniel Ochoa Martínez por sus atinadas sugerencias y aportaciones en al revisión del escrito.

Al Dr. Juan Carlos Noa-Carrazana por su apoyo, colaboración y amistad durante el desarrollo del trabajo.

A la Ing. Blanca Susana Ruiz Castro por su apoyo en las técnicas de laboratorio y su amistad.

A los trabajadores del Campo Experimental Cotaxtla por su apoyo en los trabajos de campo y a los trabajadores de la UACH y CP por su ayuda en el laboratorio.

Ala Dirección General de Sanidad Vegetal por la identificación de los insectos.

Al Tec. Claudio Flores-Espinosa por u apoyo en la tipografía del trabajo.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE APÉNDICES	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
 I. INTRODUCCIÓN	 1
1.1 Importancia del cultivo de papayo	1
1.2 Enfermedades virales afectando el cultivo.	1
 II.- ANTECEDENTES	 3
2.1 Identificación de virus en el cultivo de papayo.	3
2.1.1 Virus reportados a nivel mundial.	3
2.1.2 Virus reportados en México	6
3.1. Caracterización y separación de posibles razas de virus	7
3.1.1 Taxonomía y definiciones	7
3.1.2 Origen de las razas de virus	8
3.1.3 Importancia de las razas.	9
4.1 Métodos de identificación de razas	10
5.1 Razas del Virus de la Mancha Anular del Papayo (PRSV)	11
6.1 Detección de plantas reservorios de virus fitopatógenos.....	12
6.1.1 Importancia de los reservorios	12
6.1.2 Investigaciones en papayo	14
6.1.3 Determinación de plantas reservorias	15
 III. OBJETIVOS	 17
 IV. MATERIALES Y MÉTODOS	 18
4.1 Caracterización de posibles razas del PRSV en plantas de papayo tipo Maradol	18
4.1.1. Estudios en Campo	18
4.1.2. Estudios en Laboratorio	18
4.1.2.1 Observación al microscopio electrónico.	18
4.1.2.2 Preparación de membranas	18
4.1.2.3 Tinción negativa:	19
4.1.2.4 Determinación de posibles razas.....	19
4.1.2.5 Comparación de aislamientos	19

4.1.3 Trabajos en Invernadero.....	20
4.1.3.1 Rango de hospederos	20
4.1.3.2 Pruebas de transmisión.....	20
4.2 Detección de plantas reservorias del PRSV por medio de ELISA.....	21
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
5.1 Caracterización de posibles razas del PRSV en plantas de papayo tipo Maradol.....	22
5.1.1 Estudios de Campo.	22
5.1.2 Estudios en Laboratorio.....	27
5.1.2.1 Observación al microscopio electrónico	27
5.1.2.2 Determinación de posibles razas.....	27
Mex. VTB-6	29
5.1.2.3 Comparación de posibles razas	32
5.1.3 Trabajos en Invernadero.....	33
5.1.3.1 Rango de hospederos	33
5.1.3.2 Pruebas de transmisión.....	34
5.2 Detección de plantas reservorias del PRSV por medio de ELISA	35
VI. IDENTIFICACIÓN DE OTRO VIRUS AFECTANDO EL CULTIVO DE PAPAYO....	37
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	39
7.1 Sintomatología y distribución de plantas virosas por lote.....	39
7.1.1 Sintomatología.	39
7.1.2 Distribución e incidencia de plantas enfermas.....	39
7.2 Observación al microscopio electrónico.	39
7.3 Tinción de inclusiones.....	40
7.4 Preparación de material para cortes al ultramicrótomo.....	40
7.5 Pruebas de transmisión del agente causal.....	41
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
8.1 Sintomatología y distribución de plantas enfermas por lote.....	42
8.1.1 Sintomatología.....	42
8.1.2 Distribución e incidencia de plantas enfermas.....	44
8.2 Observación al microscopio electrónico.	46
8.3 Tinción de inclusiones.....	48
8.4 Cortes al ultramicrótomo.	48
8.5 Transmisión del agente causal.....	48
IX. CONCLUSIONES	50
X. BIBLIOGRAFIA	51

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Países que reportan virus o microorganismos similares afectando el cultivo de papayo	3
Tabla 2. Número de plantas enfermas con los diferentes síntomas observados en el Lote "A", de agosto a octubre de 1995. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.	25
Tabla 3. Diferentes síntomas observados y diferenciados en el lote de papayo "B", de octubre de 1995 a febrero 1996 ubicado en el Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.	27
Tabla 4. Porcentaje de identidad de nucleótidos (mitad superior) y secuencia de aminoácidos (mitad inferior) entre aislamientos del PRSV Mexicanos y otros.	29
Tabla 5. Desarrollo de síntomas en plantas de papayo cv. Maradol, inoculadas y mantenidas en invernadero.	35
Tabla 6. Resultados de la prueba de ELISA en maleza, cultivo o planta diferencial.	36
Tabla 7. Número de plantas enfermas con síntomas de necrosis apical observados en el Lote "A", de agosto a diciembre de 1995 de un total de 400 plantas. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.	44
Tabla 8. Número de plantas enfermas con síntomas de necrosis apical observados en el Lote "B", de agosto a diciembre de 1995 de un total de 696 plantas. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.	44

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Número de nuevas plantas enfermas por quincena en el lote "A". Abril a octubre de 1995. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.	23
Figura 2. Número de plantas enfermas acumuladas por quincena en el lote "A". Abril a octubre de 1995. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.	23
Figura 3. Hoja con síntomas de MAN CLO	24
Figura 4. Planta con síntomas de AMA PRO	24
Figura 5. Planta con síntoma de HBA	24
Figura 6. Planta con síntomas MM	24
Figura 7. Planta con síntoma MCh	24
Figura 8. Hoja con síntomas de ATI	24
Figura 9. Número de nuevas plantas enfermas por quincena en el lote "B". Agosto 1995 a febrero de 1996. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.	26
Figura 10. Número de plantas enfermas acumuladas por quincena en el lote "B". Agosto 1995 a febrero de 1996. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.	26
Figura 11. Patrones repetidos de ácido glutámico y lisina (EK), en secuencias alineadas siguiendo el triplete DAG de la terminación amino, de la cubierta de proteína del PRSV, de tres aislamientos mexicanos y otros aislamientos de diferentes partes del mundo.	30
Figura 12. Dendrogramas mostrando relación filogenético de diferentes aislados del VMAP. (a) secuencias nucleotídicas completas y (b) secuencias parciales.	31
Figura 13. Planta de <i>Cucurbita foetidissima</i> con síntomas de virus.	36
Figura 14. Planta de <i>Gomphrena nitida</i> asintomática.	36
Figura 15. Planta con síntomas de enanismo.	43
Figura 16. Necrosis apical de hojas.	43
Figura 17. Planta con arrepollamiento del cogollo.	43
Figura 18. Planta con arrepollamiento del cogollo.	43
Figura 19. Pecíolos arqueados y con listados (costillas).	43
Figura 20. Planta sin presencia de manchas aceitosas	43
Figura 21. Virus de forma de bala característicos de Rhabdovirus procesados por tinción negativa.	48
Figura 22. Virus observados en cortes de tejido con el ultramicrotomo de plantas con síntomas de Rhabdovirus.	48

LISTA DE APÉNDICES

	Página
A. PROCEDIMIENTO DE ELISA	63
B. DESCRIPCIÓN DE RHABDOVIRUS.....	64
Virus de la Redecilla amarilla del Sonchus	64
Virus de la Vena Amarilla del Cardo	64
Virus del Amarillamiento necrótico del brócoli.....	64
Virus del Mosaico estriado del trigo americano.....	65
El Virus del Enanismo moteado de la berenjena.....	65

RESUMEN

El Virus de la mancha anular del papayo (PRSV) es el principal factor limitante en la producción del cultivo de papayo. Esta enfermedad presenta en las plantas afectadas a nivel de campo, diferentes síntomas, por lo que es posible que existan razas severas y benignas. Esta investigación se enfocó en la caracterización molecular del gen de la cubierta de proteína de la cápside de aislamientos mexicanos del PRSV. Se describieron los síntomas que se fueron presentando en dos plantaciones establecidas de papayo cv. "Maradol" en el Campo Experimental Cotaxtla durante 1995 (riego y temporal); el síntoma que sobresalió fue el de Mano de chango (Mch), seguido por el de Hoja Bandera Amarilla (HBA) y el de Mosaico (MOS) y Moteado (MOT). Se lograron caracterizar tres aislamientos del PRSV, estos fueron la VPO-28, VTB-6 de Veracruz y la ChT-11 de Chiapas; al compararse la secuencia de 858 nucleótidos del gene de la cápside de proteína de estos aislamientos y compararlos con secuencias publicadas de once aislamientos realizados en Australia, Estados Unidos y Asia, se encontró que existe un alto porcentaje de identidad entre los dos aislamientos de Veracruz (98.4%), pero cuando se compararon éstos con el de Chiapas el porcentaje fue menor (93.4% y 93.6%), para cada aislamiento de Veracruz. En general los aislamientos de México correspondieron mejor en las secuencias con los aislamientos de Estados Unidos y Australia que con los aislamientos de Asia.

En plantaciones de papayo o en siembras de cultivos cercanos a estos en Veracruz, se colectaron malezas o plantas de cultivo y por medio de la prueba de ELISA se lograron identificar malezas (*Amaranthus hybridus*, *A. espinosus*, *Gomphrena nitida*, *Cucurbita foetidissima*, y cultivos *Cucurbita pepo*, *Cucumis melo* y *Citrullus vulgaris*, además de papayo *Carica papaya*, como reservorios del PRSV. Se caracterizó y reportó para México una nueva enfermedad en el cultivo de papayo causada por un virus, perteneciente al grupo de los Rhabdovirus (Virus de la Marchitez y necrosis apical del papayo, PDNV), que afecta al cultivo aunque en baja proporción (0.1% a 10%) en los principales estados productores (Veracruz, Michoacán, Campeche, Tabasco, Oaxaca, Colima y Chiapas), excepto en la Costa de Oaxaca, donde se ha presentado con una incidencia de 20-25% sobre plantas de papayo cv. Maradol, afectando de esta manera la producción. Aunque no se determinó el vector, se probó que no se transmite por semilla ni por injerto.

ABSTRACT

The papaya ringspot virus (PRSV) is considered the limiting factor for the production of crop papaya cultivated. These plants diseases show symptoms different in the field with the possibility of the presence of putative severe and mild strains. This investigation focuses on the initial molecular characterization of the coat protein gene of three Mexican PRSV isolates, determined as plant reservoirs of the PRSV and characterization one new virus affecting the papaya crop in Mexico. The coat protein gene of the papaya ringspot virus (PRSV) was cloned and sequenced in three Mexican isolates (two from Veracruz, and one from Chiapas). The sequence of these viral isolates were compared to those of eleven isolates from other parts of the world. They had higher similarity to isolates from Australia and the United States than to Asian isolates. A region of about one hundred nucleotides neighbouring the putative aphid transmission triplet of the coat protein, contained repeats of an EK (glutamic acid-lysine) motif in all the sequence. The purpose of ELISA test was to detect the reservoirs of PRSV in the following plants *Amaranthus hybridus*, *A. espinosus*, *Gomphrena nitida*, *Cucurbita foetidissima* weeds and *Cucurbita pepo*, *Cucumis melo* y *Citrullus vulgaris* crops.

In commercial papaya plantations of the southeastern Mexican States of Chiapas, Tabasco, Oaxaca and Veracruz, 0.1% to 10% incidence of plants with peculiar symptoms were observed, they were sampled and studied for viral infections. Stem internodes were shorter than normal, the leaves were smaller and thicker. There was necrosis in younger leaves, the petioles were shorter and curved with reddish-gray stripes, and flowers and small fruits were standing upright. In negative staining, bullet-shaped particles were observed, as well as rod shaped particles, as well as rod shaped and isometric ones. Bacilliform particles with a perinuclear membrane were also observed within the nucleus in ultra thin preparations, and stained inclusions were present in the nucleus of the phloem. The disease could not be mechanically nor seed transmitted. The incidence was higher in the summer than in the winter. All the description agreed with an infection by the papaya droopy necrosis (PDNV) Rhabdovirus, although mixed with the papaya ringspot (PRSV) Potyvirus and with an isometric particle not identified.

I. INTRODUCCIÓN.

1.1 Importancia del cultivo de papayo

El papayo *Carica papaya* L., es originario de la América tropical; aunque hay controversia en cuanto a su origen, ya que algunos lo sitúan en el área del Caribe Sur de México y Nicaragua y otros en el noreste de América del Sur. Originalmente estaba distribuido en el Caribe, de ahí los exploradores españoles posiblemente lo llevaron a Filipinas y posteriormente a la India. Este frutal se cultiva en los trópicos y subtrópicos más cálidos. La fruta se comercializa principalmente para consumo en fresco en forma local o de exportación, y en menor proporción, para obtener papaina, la cual se usa en diferentes industrias alimenticias y del calzado (Morton, 1987).

La planta de papayo (*Carica papaya* L.) pertenece a la familia Caricaceae, es de rápido crecimiento y se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales. Con base en la producción en toneladas métricas, los principales países productores a nivel mundial son: Brasil (1,500,000), Nigeria (748,000), India (644,000), México (633,512) e Indonesia (470,000) [FAO, 2005]. México ocupó el cuarto lugar como productor, pero es el primer lugar como exportador de esta fruta, le siguen Malasia, Estados Unidos, Brasil, Jamaica y Belice. Los principales importadores de fruta son: Estados Unidos, Singapur, China, Japón y Canadá. En nuestro país los principales estados productores con base en la producción de toneladas por superficie (ha) son: Veracruz (101,698/8494 ha), Tabasco (82,303/2334 ha) Michoacán (39,168/1672 ha), Chiapas (180,856/2,285 ha), Oaxaca (78,605/1114 ha) y Jalisco (26,204/1102 ha) [SIAP, 2003]. Las variedades más sembradas en nuestro país son Maradol, Mamey, Cera, Red Lady y Solo (de los Santos et al, 2000).

1.2 Enfermedades virales afectando el cultivo.

El Virus de la Mancha anular del papayo (PRSV por sus siglas en inglés), está considerado como el principal problema del cultivo de papayo a nivel mundial (Garza, 1976; Purcifull et al, 1984; Ishii, 1972; López, 1972; Ivancheva et al, 1967; Yeh y Gonsalves, 1984; Téliz et al., 1987; 1991; Vegas, et al, 1998; Yeh et al., 1988; Ortiz-García y Saldaña-Hernández, 2001). Los daños que puede causar este virus son cuantiosos (desde un 5 hasta un 100%), si la infección ocurre en las etapas tempranas del cultivo, el productor generalmente realiza el rastreo del mismo, pues por experiencia sabe que no llegará a producir nada, otros abandonan el cultivo sin rastrearlo, aumentando con esto los focos de infección para plantaciones nuevas. Cuando la infección ocurre en etapas posteriores se retrasa el desarrollo normal de la planta, disminuye el rendimiento, se afecta la calidad de la fruta, y se produce defoliación provocando que los frutos sufran quemaduras de sol (Becerra, 1994).

A nivel mundial se mencionan 16 enfermedades virales causadas por virus o fitoplasmas en el cultivo de papayo; sin embargo en los trabajos existe mucha

sinonimia, ya que a un mismo virus se le denomina de diferente manera, según el país o el autor del trabajo.

Las condiciones climáticas pueden hacer que los síntomas ocasionados por un virus cambien, además la presencia de variantes putativas de un mismo virus pueden provocar diferentes síntomas en un mismo cultivo, lo que ocasiona mucha confusión. Otra posible causa de esta variación podría ser la presencia de varios virus en una misma planta causando un aumento o disminución de los síntomas debido al sinergismo o antagonismo entre ellos (Vance *et al*, 1995; Ramos *et al*, 2003). Por esta razón el Comité Internacional de taxonomía de virus recomienda el uso de abreviaturas (antes referidos como acrónimos), en inglés. A nivel de campo sin embargo se presentan sintomatologías que no corresponden a ninguno de estos virus. Esto podría deberse ya sea a que participan otros virus, o bien, a que pueda haber diferentes variantes putativas del PRSV.

En nuestro país se reportan los siguientes virus afectando el cultivo de papaya: Virus de la Mancha Anular del Papayo (Papaya Ringspot Virus o PRSV), el Virus del Mosaico del Papayo (Papaya Mosaic Virus o PapMV), el Virus de la Mancha Anular del Tabaco (Tobacco Ringspot Virus o TRSV), además se menciona la presencia de un nuevo virus semejante a uno reportado en Venezuela (Ochoa y Galindo, 1976; Rodríguez, 1994; Noa-Carrazana *et al*, 2001).

A nivel de campo se presentan síntomas que no corresponden a ninguno de los virus antes citados, por lo que se supone que puede tratarse de diferentes variantes putativas del PRSV, reacción de la variedad a los virus, o bien, que las condiciones climáticas están influyendo en la manifestación de estos.

Aunque se han identificado los insectos vectores de esta enfermedad, es importante además determinar los reservorios donde persiste el virus y las épocas en que sus vectores (áfidos) son virulíferos, con el fin de poder implementar medidas para su eficiente manejo (García, 1987; De León, y Becerra, 1990; Téliz *et al*, 1991; Becerra, 1994). Esta información es importante para trabajos de mejoramiento genético, en los cuales es necesario conocer los diferentes virus o variantes putativas, para que la selección de material tolerante o resistente se lleve a cabo sobre los o las variantes putativas más prevalecientes de virus.

Otra opción en cuanto al manejo de la enfermedad, sería la determinación de una variante benigna del Virus de la Mancha Anular del Papayo mexicana, con el fin de implementar programas de protección cruzada.

Adicionalmente, el conocimiento de las variantes putativas virales existentes, ayudaría a determinar el uso de la mejor construcción genética viral para obtener germoplasma resistente, por técnicas de ingeniería genética.

Antes de este trabajo no se sabía la existencia de variantes putativas del PRSV en México. En un esfuerzo conjunto el Laboratorio de Interacciones Planta-Virus del CINVESTÁV y el INIFAP, están discerniendo la presencia y número de variantes putativas del PRSV con evidencias biológicas y moleculares.

II.- ANTECEDENTES

2.1 Identificación de virus en el cultivo de papayo.

2.1.1 Virus reportados a nivel mundial.

A nivel mundial se han reportado 13 enfermedades virales causadas por virus o fitoplasmas en el cultivo de papayo; sin embargo en los trabajos existe mucha sinonimia, a continuación se hace una recapitulación de los virus presentes en diferentes países (Tabla 1).

Tabla 1. Países que reportan virus o microorganismos similares afectando el cultivo de papayo.

Países	PaMV	PRSV	TSWV	BT	PANV o PDNV	TRSV	PLYV	PMYLV	PYCV	MV	TLCV	PaLcuV
Estados Unidos	X	X	X		X	X						
México	X	X				X	X					
Cuba	X	X		X	X							
Jamaica					X							
Haití					X							
República Dominicana			X									
Brasil			X				X				X	
Venezuela	X	X			X				X			
Trinidad				X								
India											X	X
Taiwan			X									
Sri Lanka	X											
Tailandia			X									
Filipinas			X								X	
Nigeria	X	X				X						
Australia		X								X		

PaMV = Virus del Mosaico del Papayo; PRSV = Virus de la Mancha Anular del Papayo; TSWV = Virus de la Marchitez Manchada del Tomate; BT = Bunchy Top o Arrepollamiento (Fitoplasma); PANV = Virus de la Necrosis Apical del Papayo o Virus de la Marchitez Apical del Papayo PDNV; TRSV = Virus de la Mancha Anular del Tabaco; PLYV = Virus del Amarillamiento Letal del Papayo; PMYLV = Virus de la Hoja Amarilla Suave del Papayo; PYCV = Virus del Rizado Amarillo del Papayo (Virus de la Yema Grande del Tomate); MV = Virus de la "Meleira" o Papaya Sticky Disease; TLCV = Virus del Rizado de la Hoja del Tabaco; PaLcuV= Virus del enrollamiento de la hoja del papayo.

En Puerto Rico Jensen en (1931) reportó la enfermedad del Bunchy Top o cogollo arrepollado [Papaya Bunchy Top, PBT] (Adsuar, 1946; Story y Halliwell, 1969), además también están presentes, el Virus del Mosaico de la papaya (PapMV), indicando que es semejante o está relacionado con el Mosaico tipo B de Cuba (Adsuar, 1946); posteriormente se mencionó la presencia de una nueva enfermedad denominada Mosaico Isabela que es diferente al PBT o cogollo arracimado. Se sugiere que la enfermedad es transmitida por el nematodo *Trichodorus* sp, aunque hace falta mayor investigación (Adsuar, 1972). En un estudio reciente se mencionó que esta enfermedad es causada por una bacteria, que mide 0.8 a 1.6 micras de ancho y 0.8 a 1.6 micras de largo, que vive en los vasos laticíferos y está aún sin identificar. Se probó además la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR, para detectar fitoplasmas con resultados negativos en 95 muestras de papayo de diferentes países de América (Davis, et al, 1996).

En Florida, Estados Unidos se reportaron las siguientes enfermedades causadas por virus: Distorsión y mancha de anillos (Distortion ringspot papaya virus, DRPV), Mosaico del papayo (Papaya Mosaic Virus, PapMV), Moteado tenue con manchas anulares (Papaya faint mottle ringspot virus, PFMRV), Mosaico suave del papayo (PMMV) y Necrosis apical (Papaya droopy necrosis virus, PDNV) [De Bokx, 1965; Conover, 1962; Conover 1964; Wan y Conover, 1981]. En el Valle de Río Grande, Estados Unidos se citó la presencia del Virus de la Mancha anular del tabaco (TRSV) en papayo (Cook, 1972; Fariñas, 1983 a). En Hawaí las enfermedades virales que inciden sobre el cultivo del papayo pueden ocasionar pérdidas cuantiosas que van desde un 5 a 20% pudiendo incluso ocurrir hasta 75%; también se reportó que los daños son más fuertes durante los primeros tres a seis meses de iniciada la plantación (Ishii y Holtzman, 1963; Hine et al, 1965). También se citó que TSWV puede presentarse en las plantaciones de Hawaí hasta en un 90% y es la causa del abandono del cultivo en muchas áreas de las islas (Cook, 1972; Gonsalves y Trujillo, 1986). Los virus identificados en el cultivo de papayo para Hawaí, Estados Unidos son: el Virus del Mosaico del papayo (PapMV), mencionándose que es idéntico al Virus del Mosaico de Bombay, pero diferente al PRSV de Hawaí (Holmes et al., 1948; Ishii y Holtzman, 1963; Cook y Milbrath, 1971); posteriormente se citó la presencia del Virus de la Marchitez Manchada del Tomate (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV) [Trujillo y Gonsalves, 1967].

En Australia se reportó la enfermedad del Virus del follaje amarillo y rizado en 1931 afectando el cultivo de papayo, causando pérdidas que fueron de un 10 a 30% (Jensen, 1949; Cook, 1972; Fariñas, 1983), posteriormente mediante pruebas de transmisión de plantas enfermas de papayo a plantas de *Lycopersicon esculentum* y *Datura stramonium*, utilizando a la planta *Cuscuta australis* se concluyó que esta enfermedad es causada por el Virus de la Yema Grande del Tomate (Tomato Big Bud Virus TBBV), que también puede infectar al trébol blanco *Trifolium repens*, siendo transmitido por *Orosius argentatus* (Greber, 1966; Fariñas, 1983 a); además se mencionó la presencia del PRSV (Simmonds, 1965).

En Cuba el cultivo es incosteable en muchas localidades de la isla, debido a la presencia de altas incidencias (50 a 100%) de éstos patógenos (Gabrovska et al, 1967). En este país se mencionaron las enfermedades cogollo arrepollado o Bunchy

Top (BT), PapMV, además de una nueva alteración denominada variegación amarilla en semilleros, con síntomas parecidos a los del cogollo arrepollado; también se reportó a PANV y PRSV (Gabrovska *et al.*, 1967; Story y Halliwell, 1969; Fariñas, 1983 a, Mejías *et al.*, 1987; González *et al.*, 1988).

En Jamaica se citó el primer virus afectando papayo por Smith en 1928; posteriormente se identificó como la enfermedad del BT causada por un Organismo Tipo Micoplasma (OTM), citando que es la enfermedad más seria del cultivo (Naylor, 1965). De las islas del Caribe (Haití, Jamaica y Trinidad) se reportó a el BT como la enfermedad de mayor problema en el cultivo de papayo (Cook, 1972, Fariñas, 1983 a). Se mencionó a dos chicharritas como vectoras del patógeno *Empoasca papayae* (Oman) y *E. stevensi* Young, (Haque y Parasram, 1973).

En República Dominicana el DRPV es la principal causa de los bajos rendimientos obtenidos en el cultivo de papayo; después de llevar a cabo estudios de sintomatología, rango de hospederos, propiedades físicas, serología y microscopía electrónica se determinó que este virus era el PRSV (López, 1972; Story y Halliwell, 1969; Vegas, *et al.*, 1998).

Para Brasil se mencionó que después de realizar estudios de transmisión y serología se identifica al PRSV en Brasilia (Kitajima *et al.*, 1987). Posteriormente se cita la presencia del Virus del amarillamiento letal de la papaya (PLYV) en varios estados de Brasil, donde puede alcanzar hasta 40% de plantas infectadas. Otro virus reportado es el de la "Meleira" (Papaya sticky disease, PSD) del papayo el cual está siendo caracterizado [Lima *et al.*, 2001].

Para Venezuela se mencionó que el PRSV es la principal causa de los bajos rendimientos. Se estimaron pérdidas en este país, que van de un 20 a 100%, mencionándose que el Virus de la mancha anillada de la lechosa (actualmente PRSV) es la principal causa de los bajos rendimientos en ese país (López, 1972; Story y Halliwell, 1969; Vegas, *et al.*, 1998). También se citó la presencia del PaMV y PRSV en varias regiones del país (Pontis-Videla, 1953; Cook y Zettler, 1970; Vegas *et al.*, 1985); posteriormente se reportó la enfermedad de la Necrosis apical (PANV) causada por un Rhabdovirus (partículas baciliformes), en varias provincias, la cual se extendió rápidamente y mató un alto porcentaje de plantas (Lastra y Quintero, 1981); recientemente se mencionó la presencia de un nuevo virus que asemeja en algunas características, pero no en otras, al género de los Tenuivirus, y al que se le denominó Virus del Amarillamiento Tenue de la Hoja (Papaya Mild Yellow Leaf Virus, PMYLV), tiene un rango estrecho de hospederos ya que sólo infecta a papaya y varias especies de Cucurbitaceas [Marys, *et al.*, 1995].

En Sri Lanka se citó la presencia del Virus del mosaico del papayo (PaMV) desde 1952, posteriormente en estudios de inoculación mecánica sobre 73 especies de plantas que correspondieron a 11 familias botánicas, solamente cuatro familias (Solanaceae, Cucurbitaceae, Chenopodiaceae y Amaranthaceae) con seis especies (*Cucurbita pepo*, *Cucumis sativus*, *Nicotiana tabacum*, *Chenopodium amaranticolor*, *Gomphrena globosa*

y *Lycopersicon esculentum*) mostraron diferentes clases de síntomas (Rajapakse y Herath, 1981).

En la región de Madras en la India se reportó desde 1939 la enfermedad denominada enrollamiento de la hoja del papayo, causado por el Virus del Enrollamiento de la Hoja del Tabaco (TCLV), es una enfermedad importante del cultivo ya que puede provocar la perdida total (Singh *et al.*, 1978); siendo su vector *Bemisia tabaci*, el cual ha sido transmitido por injerto a tomate y tabaco, (Cook, 1972; Fariñas, 1983 a). Posteriormente se citó la presencia del PapMV alrededor de Ludhiana en Punjab, con incidencias de hasta 90.2% (Reddy *et al.*, 1987). También en la India se citan pérdidas de 85% a 90% causadas por el PRSV en el cultivo de papaya, en muchas regiones, independientemente de las condiciones agroclimáticas (Hema y Prasad, 2004). De Madrás en la India se mencionó desde 1939 la enfermedad Rizado de la hoja del papayo, causado por el Virus del Rizado de la Hoja del Tabaco (TLCV).

En Filipinas se reportó la presencia del Virus del Rizado de la hoja del tabaco (TLCV) [Cook, 1972] y PRSV (Opina, 1986); y en Tailandia se reportó el PRSV (Chandrasrikul y Patrakosol, 1986). De Tailandia se reportó al PRSV (Chandrasrikul y Patrakosol, 1986). El PRSV se presentó en forma epidémica en Taiwán causando una caída de la producción de 41 595 toneladas (ton) en 1974 a 18 950 en 1977 e incrementando el precio de \$ 0.04 a \$ 0.24 por libra (Yeh *et al.*, 1988).

En el este de África (Tanzania y Kenia) se citó que al menos tres virus pueden estar asociados en la debilidad de papayas, aunque el reporte no menciona cuales son (Kulkarni y Sheffield, 1968). De Nigeria se reportaron a PaMV, PRSV y una raza de la Mancha anular del tabaco (TRSV), las infecciones mezcladas fueron raras y el último fue más prevalente entre plántulas en los almácigos (Femi, 1980; Fariñas, 1983 a).

2.1.2 Virus reportados en México

El primer reporte de enfermedades virales en México fue realizado por Fraire en Veracruz en 1964; estas enfermedades comenzaron a ocasionar fuertes pérdidas provocando la desaparición de un gran número de plantaciones en Veracruz y Morelos; preliminarmente se identificó el agente causal como el Virus de la Mancha anular del papayo, además se sugirió la presencia del Virus del Mosaico del papayo; (Ochoa y Galindo, 1975; 1976; 1977). Posteriormente la presencia del PRSV se confirmó por medio de microscopía electrónica y serología (Téliz *et al.*, 1987).

Para México se reportaron las siguientes incidencias de virus en el cultivo de papayo: PRSV en los estados de Veracruz (47%), Guerrero (68%), Oaxaca (93%) y Yucatán (1%); TRSV en Veracruz (0.17%) y un Potexvirus en Yucatán (45%) [Rodríguez, 1994]. En Tabasco en los municipios de Cunduacán, Cárdenas, Huimanguillo y Centro el PRSV afectó las variedades Maradol y Zapota, reportándose pérdidas mínimas del 26% en plantas sembradas, además la papaya silvestre denominada "hoja de mico" también fue afectada, no obstante que las infecciones siguen en aumento, la región de los Ríos permanece libre del virus (Ortiz-García, 1999; Ortiz-García y Saldaña-Hernández,

2001). En otro estudio se anotó que además de los estados mencionados anteriormente, el PRSV se encuentra distribuido en: Tamaulipas, San Luis Potosí, Chiapas, Jalisco, Michoacán, Colima y Nayarit; el PaMV, en cambio, se diagnosticó en Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Chiapas y norte de los estados de Veracruz, San Luis Potosí y Tamaulipas. En este mismo estudio se citó la presencia de una partícula viral de 400 a 700 nm de largo y morfología helicoidal que podría corresponder a un nuevo virus no caracterizado en México (Noa-Carrazana, *et al.*, 2001).

Posteriormente en la región del Valle de Tecomán, Colima se estimaron pérdidas hasta de un 80%, debido al ataque de virus en el cultivo (Garza, 1976).

En otro estudio se reportó una disminución del 80% en la superficie cultivada en el ciclo 79-80 para el estado de Veracruz (Treviño, 1980); posteriormente al efectuar un estudio de incidencia y cuantificación de daños por el PRSV, se encontró que en un primer muestreo en la región central del estado, la enfermedad estaba presente en un 36.86%, a los seis meses la incidencia subió a 100% destruyendo completamente el cultivo (Díaz *et al.*, 1982). Por lo anterior se ha llegado a considerar al PRSV como el principal problema fitopatológico del cultivo en México (Téliz *et al.*, 1987; 1991).

3.1. Caracterización y separación de posibles razas de virus

3.1.1 Taxonomía y definiciones

Desde que fue acuñada la palabra “virus”, por Beijerinck a finales de 1800, se han intentado muchas clasificaciones de virus de plantas, tomando en cuenta al principio los síntomas que causaban en sus hospederos originales, propiedades físicas de la savia infectiva, tipo de vector que los transmite (áfidos, chicharritas, mosquita blanca, ácaros, coleópteros, hongos, nematodos), su transmisión por semilla, injerto o polen, reacciones en una serie de plantas diferenciales, y posteriormente tipo, forma y tamaño de ácido nucleico (Ácido Ribonucleico o ARN y Ácido Desoxirribonucleico o ADN), y características químicas de las partículas y relaciones serológicas, entre otras (Lozoya, 1987).

En Virología un género representa un grupo de especies de virus que comparten características comunes y que son distintas de otros miembros de géneros distintos. Los géneros son designados por la palabra y el sufijo virus; una especie es definida como una clase de virus en que todos los miembros del grupo, mantienen un gran número de propiedades en común, pero no todas son compartidas por todos los individuos no necesitan poseer una propiedad específica que constituye una replicación de su linaje y ocupa un nicho ecológico particular, comparten muchas propiedades biológicas y físico-químicas en común, pero pueden presentarse aislamientos individuales que se refieren a un sencillo aislamiento de una planta infectada, que pueden diferir en una o más propiedades, sin que por ello sea otra especie

(Regenmortel, 1992; Barnett, 1992). Una raza se define como una colección de aislamientos de un virus que ocurren naturalmente y que comparten las mismas propiedades reconocibles que definen la raza, pero que no están presentes en otros aislamientos. Un patotipo es una colección de aislamientos los cuales causan una reconocible respuesta en un hospedero tal como rango de hospederos o reacción a genes de resistencia al hospedero. Un serotipo es una colección de aislamientos los cuales difieren en propiedades antigenicas de otros aislamientos del mismo virus. Una variante se define como aislamientos que ocurren naturalmente o son creados por el hombre, que presentan pequeños cambios que pueden ser constantes, reversibles o inestables y son aislamientos obtenidos individualmente; variantes putativas y mutantes pueden ser considerados sinónimos, pero los mutantes son generalmente considerados como productos de tratamientos bajo condiciones de laboratorio (Barnett, 1992).

Un grupo de virus es una colección de virus que es especialmente útil para definir sus propiedades compartidas. El grupo de virus denominados Potyvirus derivan su nombre del Virus Y de la papa (PVY) el miembro tipo. Los potyvirus son caracterizados por tener partículas de forma de varilla flexible de entre 680 a 900 nanómetros de largo y cerca de 12 nanómetros en diámetro, sedimentan a 159 S, con una densidad buoyante en cloruro de cesio de 1.31 g/cm^3 , las partículas consisten de más de 2000 subunidades de una sencilla especie de proteína (peso molecular 32 a 34×10^3) arregladas como una hélice encerrando el genoma, en una molécula de cadena sencilla de ARN (Ácido Ribonucleico) de peso molecular 3.0 a 3.5×10^6 y constituye el 5% del peso de la partícula. Forman inclusiones en el citoplasma de las células infectadas usualmente del tipo cilíndrico o de rehiletes; el punto de inactivación térmico es de 50° a 75° C (usualmente de 55° a 60°) por 10 minutos, la longevidad de la savia es de uno a 50 días (usualmente de dos a cuatro días), y el punto final de dilución es de 10^{-3} a 10^{-6} (usualmente 10^{-3} a 10^{-4}) [Gibbs, y Harrison, 1976; Hollings y Brunt, 1981; Francki *et al.*, 1987].

La familia Potyviridae, a la cual pertenece el PRSV tiene seis géneros de virus:

Potyvirus son transmitidos por áfidos en forma no persistente

Ipomovirus son transmitidos por mosquita blanca

Macluravirus son transmitidos por áfidos en forma no persistente

Rymovirus son transmitidos por ácaros

Tritimovirus son transmitidos por ácaros

Bymovirus son transmitidos por hongos

(<http://www.virustaxonomyonline.com/virtax/1pext.dll/vtax/in10?fn=document-frame.htm>)

3.1.2 Origen de las razas de virus

Los virus con frecuencia son genéticamente inestables y evolucionan hacia nuevas formas agresivas. Algunas poblaciones de virus cambian cíclica o gradualmente, como es el caso del TSWV, el cual está presente en todo el mundo en una amplia gama de hospedantes y puede causar en algunos años pérdidas considerables mientras que en otros los daños son mínimos (Jones y Dawson, 1987).

Los virus generalmente permanecen iguales a sus padres durante la reproducción, pero ocasionalmente cambian a nuevos tipos o razas por el proceso de mutación. Es improbable que un virus consista de una sola raza (Matthews, 1970).

Razas de un mismo virus son semejantes unas a otras en su rango de hospederos, sintomatología, propiedades físicas, composición química, relaciones serológicas y morfología de la partícula, pero ellas también pueden diferir en una o varias de estas características. Por otro lado las diferencias entre ellas son más pequeñas que entre distintos virus (Corbett y Sisler, 1964).

Dos factores que contribuyen a los cambios en los genomios de los virus son la falta de fidelidad durante la replicación de su material genético, y la carencia de funciones para corregir errores durante la misma (Jones y Dawson, 1987).

La raza VRU del Virus del Mosaico de la alfalfa (AMV) se asemeja a muchas de las otras razas del virus en sus propiedades biológicas, pero preparaciones purificadas, contienen una considerable proporción de partículas más grandes que lo normal. Al estudiar las causas se encontró que las fracciones más grandes no fueron infectivas, los resultados sugieren que el mayor tamaño está asociado a un incremento en la cubierta de proteína (Hull, 1970).

Otro factor que puede dar origen a razas de virus artificialmente es la continua propagación de cierta raza en alguna planta hospedera por varios meses como sucedió con la raza (T) del Virus del moteado clorótico del caupí al pasarlo a *Vigna unguiculata* (L) Walp. Subespecie unguiculata "California Blackeye", disminuyó la intensidad del síntoma de clorosis, denominándose a la nueva variante "M" (Kuhn y Wyatt, 1979).

3.1.3 Importancia de las razas.

La identificación de razas de un virus ayuda a que pueden evitarse la entrada de razas severas a países que no las tienen. Por ejemplo, la raza necrótica del Virus Y de la papa de Canadá y Estados Unidos a nuestro país (McDonald y Kristjansson, 1993).

Otro aspecto importante es que la protección cruzada, antagonismo o interferencia puede ocurrir frecuentemente entre razas de virus relacionadas, por lo cual algunos cultivos pueden ser protegidos de razas severas mediante la inoculación de razas benignas o débiles como es el caso del Virus de la tristeza de los cítricos en Brasil donde se ha reportado que cerca de 8 millones de árboles de naranja dulce están protegidos de razas severas de este virus (Costa y Muller, 1980).

Un programa de protección cruzada consiste de los siguientes pasos: 1) selección de material; 2) evaluación preliminar del mismo; 3) pruebas pilotos; 4) evaluación en campo de razas benignas e 5) integración de protección cruzada dentro del sistema de manejo del cultivo. Las razas benignas pueden ser obtenidas mediante los siguientes procedimientos: a) selección de poblaciones naturales de virus o análisis de

poblaciones sobre un hospedero que de lesiones locales; b) inducir mutación en poblaciones naturales, seguido de una selección; c) paso a través de hospedantes selectivos o vectores (Gonsalves y Garnsey, 1989).

Se ha tenido éxito en el caso del PRSV en Taiwán en donde los lotes protegidos mostraron un porcentaje de incidencia de la enfermedad de 31.1% en tanto que lotes no protegidos la incidencia era de 82%, el promedio de fruta por árbol en los primeros era de 17.9 kg en tanto que los segundos contaban con solamente 7.3 kg (Yeh et al, 1988).

4.1 Métodos de identificación de razas

Los criterios para el reconocimiento de razas de virus son:

a) Criterios estructurales: 1) cambios en el peso de las nucleoproteínas o proteínas de la cubierta en geles de poliacrilamida; 2) cambios en la estructura de la cubierta de proteína; 3) cambios en la arquitectura de la partícula del virus; 4) movilidad electroforética del genoma (ARN o ADN); 5) relaciones serológicas; y 6) diferencia en las propiedades físicas y químicas.

El peso molecular de la proteína de la cubierta del virus ha servido para separar diferentes aislamientos de Potyvirus y otros virus que afectan Cucurbitaceas, además de los determinantes antigenicos de la misma cubierta de proteína y un grupo de plantas diferenciales de melón y *Cucumis metuliferus* PI 292190 (Quiot-Douine, et al, 1990).

En un estudio para determinar el porqué *Aphis gossypii* transmitía en forma diferente dos razas CMV-T (90%) y CMV-6 (10%) del Virus del Mosaico del Pepino (CMV), ambas aisladas de calabaza, se encontró que aparentemente la cubierta de proteína determina la transmisibilidad (Gera et al, 1979).

b) Criterios biológicos: 1) diferencia en síntomas en uno o varios hospederos; 2) rango de hospederos y genotipo de la planta hospedera; 3) métodos de transmisión; 4) interferencia entre razas; 5) tasa de reproducción; 6) infectividad específica por unidad de peso del virus purificado; 6) sensibilidad a varios agentes y 7) uso de diferentes especies de insectos vectores (Corbett y Sisler, 1964; Matthews, 1970).

Dos razas del Virus del Mosaico de la Sandia 2 (WMV-2), la "M" obtenida de *Melothria pendula* y "S" de *Cucurbita pepo*, fueron separadas mediante la sintomatología que indujeron en varias plantas diferenciales, además de serología y características biofísicas (Chala, et al, 1987).

Se ha observado que la transmisión del Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) varía de acuerdo a la especie de áfido utilizado en los diferentes países en Brasil *Aphis gossypii* y *Toxoptera aurantii* no lo transmiten en cambio éstos dos áfidos si lo hacen en Florida Estados Unidos, del mismo modo en Israel no se logró la transmisión con *Myzus persicae* y *Aphis craccivora*, pero en la India si se logró (Raccah et al, 1978).

Otro ejemplo es el Virus del Mosaico de la Sandia (WMV), el cual fue separado en dos aislamientos el WMV-1 que infecta solamente plantas en la familia Cucurbitaceae y el WMV-2 que puede hacerlo en otras familias, al reaccionarlos serológicamente con un antisero de WMV-1, los aislamientos de este reaccionan fuertemente con él, pero los aislamientos de WMV-2 lo hacen débilmente o no reaccionan (Purcifull y Hiebert, 1979).

La región 3' del genoma de todos los miembros de los potyvirus que han sido secuenciados, contiene un módulo no traducible. La región 5' del genoma difiere entre géneros, pero es similar, para especies dentro de un género. Existe además una fuerte correlación entre la secuencia de Aminoácidos de la cubierta de proteína también localizada en la region 3' y la transmisión por áfidos. La secuencia DAG que aparece cerca del término amino de la cubierta de proteína es frecuente en virus que son transmitidos por áfidos, en tanto que los aislamientos de virus que carecen de este triplete no poseen la capacidad de ser transmitidos (Berger, 1992). La morfología de las inclusiones virales producidas por virus en sus hospederos también pueden ser usadas para la identificación de razas, cuando se compararon los tipos de inclusiones formadas por tres aislamientos del PRSV de papayo, se observó que unos produjeron inclusiones citoplasmáticas fibrosas o inclusiones irregulares y otros sólo fibrosas (Cárdenas, 1992). También puede variar el número de inclusiones, los aislamientos severos del Virus de la Tristeza de los cítricos (CTV) indujeron mayor cantidad de inclusiones, que los aislamientos benignos, al compararlos en varias especies de cítricos (Brlansky y Lee, 1990). Además el tipo y la localización intracelular de las inclusiones, están entre los 49 criterios que se usaban para clasificar virus de plantas (Edwardson, y Christie, 1978; Christie *et al*, 1987).

c) Técnicas moleculares: 1) análisis y homología de secuenciación de nucleótidos y aminoácidos. Se ha utilizado la secuencia de nucleótidos de la región 3' del ARN de la CP del PRSV-YK (un aislado severo de Taiwán) y se le ha comparado con otros aislamientos de diferentes partes del mundo (Wang *et al*, 1994).

Otro trabajo utiliza la comparación de secuencias del gene de la CP de un aislado severo del PRSV-W que afecta Cucurbitáceas en Brasil contra aislamientos benignos, determinando que en los aislamientos benignos se presentaba una inserción de seis nucleótidos en la región central del gene de la cubierta de proteína, el cual refleja la adición de dos aminoácidos {Asn y Asp} (Della *et al*, 2003).

5.1 Razas del Virus de la Mancha Anular del Papayo (PRSV)

Este virus presenta la raza tipo P aislada de papayo de Hawaí, puede infectar 15 especies de dicotiledóneas pertenecientes a las familias Caricaceae, Cucurbitaceae y Chenopodiaceae (Jensen, 1949; Purcifull, *et al.*, 1984). La raza tipo W aislada de sandia, infecta 38 especies pertenecientes a 11 géneros de la familia Cucurbitaceae y dos especies de la familia Chenopodiaceae (*Chenopodium quinoa* y *C. amaranthicolor*) [Purcifull *et al*, 1984]. Una tercera raza (la T) se asemeja a la raza W, pero serológicamente es diferente, se aisló de calabaza e infectó a plantas de la familia

Cucurbitaceae y las especies de *Chenopodium* ya mencionadas anteriormente (Quiot-Duoine, et al, 1986).

Posteriormente son reportadas de Taiwán tres razas del PRSV, denominándoseles Moteado débil (M), Mosaico severo (MS) y Mosaico severo con necrosis (MSN). Las dos últimas razas presentan dos rangos de temperatura de estabilidad similares (50-55° C y 55-60° C) en tanto que la raza M sólo presenta uno (55-60° C), en la longevidad *in vitro* también muestran diferencias (Lin et al, 1989). Se menciona que entre los aislamientos del tipo P se pueden encontrar diferencias en cuanto a la manifestación de síntomas que ellos producen (Gonsalves e Ishii, 1980); al compararse seis aislamientos del PRSV de varias partes del mundo se encontró que fueron serológicamente indistinguibles de tres aislamientos de Estados Unidos (Yeh et al, 1984).

Al compararse tres aislamientos mexicanos (Mex-37, Mex-3 y Mex-17) del PRSV provenientes de Veracruz contra uno de Hawái, se encontró que infectan los mismos hospederos, pero con diferencias en el período de incubación y severidad. En la formación de inclusiones, uno de ellos presentó diferencias marcadas en cuanto a propiedades físicas (punto de inactivación térmica, punto de dilución y longevidad *in vitro*) y dos aislamientos fueron transmitidos más eficientemente por *Myzus persicae* (Cárdenas, 1992).

El mismo autor posteriormente publica que el aislamiento Mex-3 y el de Hawái tuvieron igual comportamiento en las pruebas biológicas que se realizaron. Los aislamientos Mex-37 y Mex-17 fueron iguales entre sí sólo que este último se comportó como un aislamiento atenuado (Cárdenas y Téliz, 1994).

6.1 Detección de plantas reservorios de virus fitopatógenos

6.1.1 Importancia de los reservorios

Las malezas en muchas áreas agrícolas sirven como reservorio principal de muchos vectores de enfermedades de plantas. La más importante fuente de virus de plantas son las mismas plantas infectadas, las plantas voluntarias y las malezas (Duffus, 1971).

Se ha mencionado que si existen insectos en la maleza alrededor de un cultivo y si ésta es eliminada, se obliga a los insectos a buscar otro hospedero que en este caso puede ser un cultivo, para completar su ciclo y de esta manera pueden incrementar la transmisión de alguna enfermedad viral (Wolcott, 1928).

En otro trabajo con el Virus del Mosaico Sureño del Apio (GMSV), el cual es diseminado por *Aphis gossypii*, se determinó que las siguientes medidas pueden disminuir el daño de la enfermedad: a) eliminación de maleza alrededor de los semilleros a una distancia de 340 metros; b) remoción de maleza alrededor de los campos donde se va a sembrar cuando menos unos 340 metros, especialmente la maleza *Commelina nudiflora*; c)

completar la remoción antes del trasplante de las plántulas de apio y d) eliminación de maleza al menos cinco veces durante el crecimiento del cultivo (Wellman, 1937). El mismo autor menciona que en campos con incidencias promedio de 48 a 81% durante cinco años y donde posteriormente se realizó la remoción de la maleza durante tres años, las incidencias bajaron a 3 y 7%, en tanto que campos donde no lo hicieron tuvieron entre 65 a 96%.

Otro autor en el Valle Salinas, en California Estados Unidos, menciona que 27 especies de plantas en 13 familias sirven como importantes hospederos de *Myzus persicae* y que una sucesión de hospedantes favorables permite a éste reproducirse continuamente a través del año. Las malezas pueden también ser abundantes a lo largo de los caminos, en los canales de irrigación, en plantas perennes, vías del ferrocarril y en cultivos abandonados (Duffus, 1971).

El Virus del Mosaico del Pepino (CMV) está diseminado y es abundante en especies anuales y perennes en Wisconsin, Estados Unidos especialmente cerca de jardines y pueblos (Faan y Johnson, 1951). El mismo virus fue consistentemente recobrado de malezas asintomáticas presentes dentro o en los alrededores de campos de lechuga en Gran Bretaña (Tomlinson *et al.*, 1970).

Las malezas presentes en invierno-verano sobre los bancos de los diques y sistemas del drenaje y bordos de los campos, son reservorios de los virus Mosaico del Pepino (CMV) y Marchitamiento Ancho del Frijol (BBMV) y afectan los campos de lechuga en Nueva York, en invierno y verano (Rist y Lorbeer, 1989). En otro trabajo encontraron que la incidencia de estos dos virus presentes en malezas dentro de un rango de diez metros en campos comerciales de lechuga al inicio de la estación en Nueva York se correlacionó fuertemente con la incidencia de virus en plantas de lechuga en los mismos campos posteriormente. Se comentó que la remoción de malezas hospederas de los virus puede ser una práctica prudente en un intento de manejar la enfermedad en éste cultivo (Rist y Lorbeer 1991).

Al muestrear 540 plantas pertenecientes a casi 150 especies como posibles fuentes en campo de cinco virus de chile, 79 de las muestras dieron positivo para cualquiera de los siguientes virus: Mosaico del tabaco (TMV), Jaspeado del tabaco (TEV), "Y" de la papa (PVY), Mancha de anillo del aster (ARSV) y Mosaico del pepino (CMV) (Anderson, 1959).

Se ha mencionado que las malezas pueden servir tanto como reservorios de virus e insectos vectores, y que bajo estas condiciones la diseminación de virus puede ser muy severa (Duffus, 1971).

Se ha citado que el Virus del Amarillamiento del betabel (BYNV) del norte sobrevive el invierno, sobre un número de malezas hospedantes que incluyen especies de las familias Cruciferae y Compositae en el oeste de los Estados Unidos, y en primavera estas malezas son las hospedantes de *Myzus persicae* en California (Duffus, 1964).

Se mencionó que cambios en la predominancia de un aislamiento de un virus en un área, puede ser debido en parte a la preferencia de los vectores o aislamientos a las nuevas poblaciones de plantas silvestres (Rochow, 1967).

Otro autor citó la importancia de las malezas en el ciclo de muchas enfermedades virales de plantas transmitidas por insectos, e indicó que el control de ellas puede probablemente ser al menos tan efectivo como el control químico en contra de los vectores. El efectivo control de estas enfermedades por la eliminación de la maleza puede ser tan sencillo como una simple técnica local, o tan complejo como un método que implique la ecología de toda la región (Duffus, 1971).

Al llevar a cabo selecciones de campo de *Hydrangea macrophylla*, *Senecio jacobaea*, *Tribulus terrestris*, *Portulaca oleracea* y *Solanum trifolium* e infectarlas con el Virus de la Marchitez manchada del tomate (TSWV) con hojas obtenidas en campo, las plantas pueden permanecer asintomáticas y servir como reservorios, ya que todas ellas están asociadas a cultivos de interés comercial en Oregón, Estados Unidos (Allen, *et al.*, 1983).

En otro trabajo menciona que tanto *Melothria pendula* como *Momordica charantia*, especies silvestres de la familia de Cucurbitaceae, pueden servir como hospederos naturales de la raza W del PRSV; causando en las hojas síntomas de mosaico, moteado y deformación (Adlerez, 1972; Brunt *et al.*, 1996).

Investigaciones llevadas a cabo en Hawaí, para la detección de reservorios del virus de la Marchitez manchada del tomate (TSWV), por medio de la técnica ELISA en áreas de producción de hortalizas, encontró que está presente en 44 especies de plantas de 16 familias, de las cuales 25 especies son consideradas como importantes reservorios del virus (Cho, *et al.*, 1986).

Al realizar un muestreo al azar en el estado de Luisiana en Estados Unidos, sobre tres malezas comunes de invierno usando la técnica de ELISA se demostró que el Virus de la Marchitez manchada del tomate (TSWV) está presente en forma natural en *Ranunculus sardous*, *Lactuca floridana* y *Sonchus asper*, también se observó al insecto *Frankliniella fusca* vector del virus, alimentándose de estas malezas (Johnson *et al.*, 1995).

6.1.2 Investigaciones en papayo

En la India la maleza *Zinnia elegans* y *Nicotiana tabacum* además de otras plantas son reservorios del Virus del enrollamiento de la hoja, de donde *Bemisia tabaci* lo obtiene para transmitirlo a papayo (Singh *et al.*, 1978).

En Hawaí la maleza *Emilia fosbergii* es el mayor reservorio del Virus marchitez manchada del tomate en el cultivo de papayo (Gonsalves y Trujillo, 1986).

Las razas del PRSV afectan en su mayor parte a especies de la familia Cucurbitaceae, pero en algunos países los aislamientos pueden variar en su infección, por ejemplo en Florida, Estados Unidos se reporta a especies de las familias Caricaceae y Cucurbitaceae como susceptibles al Virus de la Distorsión y mancha de anillos (sinónimo del PRSV), además de *Cyclanthera pedata* y *Melothria pendula* (Conover, 1964); otro autor cita que la maleza *Melothria pendula* es susceptible al PRSV, pero no manifiesta síntomas (Adsuar, 1950).

En Cuba al probarse 28 especies diferentes de plantas pertenecientes a diversas familias (Cucurbitaceae, Amaranthaceae, Solanaceae, Chenopodiaceae, Euphorbiaceae, Malvaceae, Labiateae, Leguminosae y Caricaceae), para probar el rango de hospederos del PRSV, solamente lograron infectar a plantas de papayo (González, et al, 1988).

En República Dominicana este virus no da síntomas en *Citrullus vulgaris*, *Cucumis sativus*, *C. melo*, *Cucurbita pepo* var. zucchini darkgreen (Story y Halliwell, 1969). En Filipinas un aislamiento sólo infectó papayo pero ninguna Cucurbitacea (Opina, 1986)

En México al probarse el rango de hospederos del PRSV se encontró que sólo infectó a papayo y *Cucumis sativus* (Ochoa y Galindo, 1975); En otro estudio de 21 especies evaluadas se determinó que sólo *Carica papaya* y las Cucurbitaceas *Cucurbita pepo* var. zucchini, *C. pepo* cv. castilla, *Cucumis melo*, *C. sativus*, *C metuliferus*, *C. anguria* var. longipes y *C. anguria* var. anguria además de *Citrullus vulgaris*, mostraron diferentes síntomas al ser inoculadas (Cárdenas y Téliz, 1994).

Mediante pruebas de transmisión con el áfido *Aphis gossypii* se logró transmitir al PRSV a plantas de *Thunbergia fragans* en Cuba, no lográndose transmisión a plantas de las familias Chenopodiacea ni Cucurbitacea (Hernández, 1994).

Otros autores mencionan que la maleza conocida como chaya (*Cnidoscolus chayamansa*), puede ser el reservorio de los virus Mosaico y Mancha anular del papayo (Noa-Carrazana et al, 2001).

6.1.3 Determinación de plantas reservorias

Se ha llevado a cabo por medio de transmisión a través de insectos de plantas enfermas con el Virus del Curveamiento de las Hojas de Papayo (PaLcuV) a plantas sanas de papayo o tabaco (Singh et al., 1978).

Por métodos serológicos como ELISA, para la detección del Virus del Marchitamiento Ancho del frijol (BBVV) y Virus del Mosaico del Pepino (CMV) sobre malezas cercanas a campos de lechuga. (Rist y Lorbeer, 1989; 1991); y para la detección del Virus del Amarillamiento Necrótico de la Lechuga (LNYV) en la maleza *Sonchus oleraceos* (Chu y Francki, 1982).

La técnica DAS-ELISA se ha usado para la detección de Organismos Tipo Micoplasmas (OTM) en plantas Solanáceas silvestres (*Solanum dulcamara* y *Lycopersicon hirsutum* (Fos *et al.*, 1992).

La misma técnica ha servido para identificar los hospederos naturales de cuatro virus que afectan el cultivo de melón (*Cucumis melo* L), en Costa Rica (PRSV Virus de la Mancha Anular del Papayo; WMV-2 Virus del Mosaico de la Sandia 2; CMV Virus del Mosaico del Pepino y ZYMV Virus del Mosaico Amarillo del Zucchini). En dicho estudio se determinaron cinco especies representadas en tres familias (Asteraceae, Capparidaeae y Malvaceae) no reportadas como hospederas del PRSV (Sánchez, *et al.*, 1998).

III. OBJETIVOS

- 1.- Caracterización de las variantes putativas del PRSV presentes en México.
- 2.- Detección de plantas reservorias del PRSV en Veracruz.
3. - Identificación de otro virus en el cultivo de papayo.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Caracterización de posibles razas del PRSV en plantas de papayo tipo Maradol.

4.1.1. Estudios en Campo.

Con el fin de caracterizar los diversos síntomas presentes en plantas de papayo tipo Maradol y asociarlos a diferentes razas del PRSV se establecieron dos ensayos, una en la época de bajas temperaturas (enero de 1995) y otro en el temporal (junio de 1995) en el Campo Cotaxtla ubicado en el kilómetro 34 de la carretera Veracruz-Córdoba, dependiente del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP).

La primera plantación (A), se sembró el 18 de enero, la distancia entre hileras fue de tres metros entre calles y un metro y medio entre plantas, con 20 hileras y 20 plantas por hilera (400 plantas en total). La segunda plantación (B) se sembró en 12 de junio durante el temporal, se utilizaron las mismas distancias de plantación pero el número de hileras fue de 29 y 24 plantas por hilera (696 plantas en total). El manejo que se les dio a ambas plantaciones fue el descrito en el manual de producción, para este cultivo por el Campo Cotaxtla (De los Santos *et al.*, 2000).

Cada tercer día se tomó la incidencia de virosis en cada planta de los ensayos y se anotaron los síntomas progresivos que se fueron presentando en ellas.

4.1.2. Estudios en Laboratorio.

4.1.2.1 Observación al microscopio electrónico.

Una vez caracterizados los diferentes síntomas que presentaban las plantas de papayo, se prepararon rejillas de cobre para su observación al microscopio electrónico para, la determinación del agente causal, de la siguiente manera:

4.1.2.2 Preparación de membranas.

Se colocó 50 ml de Formvar 0.25% en un vaso de precipitado, se introdujo en el vaso un portaobjetos limpio; pasado un tiempo, se extrajo cuidadosamente y se efectuó un raspado fino de los bordes del mismo. Posteriormente el portaobjetos se sumergió en posición inclinada, en un recipiente con agua destilada y fondo negro, para poder observar la membrana en la superficie; en seguida con la ayuda de unas pinzas se

colocaron sobre la membrana las rejillas metálicas de cobre (350 mallas) y por último con una de las orillas dobladas de un papel filtro, se sacaron las rejillas y se colocaron en una caja Petri para su secado.

4.1.2.3 Tinción negativa:

En un portaobjetos se colocó una gota por separado de los contrastantes ácido fosfotungstico (2% pH 6.9) o acetato de uranilo (1%); posteriormente se colocó una gota de un macerado de hoja de papayo con síntomas de virus y con una pinza de punta fina se tomó una rejilla con la membrana hacia abajo y se posó primero, sobre los contrastantes y luego sobre el macerado, eliminando el líquido sobrante con papel filtro y observándose en el microscopio electrónico Zeiss modelo EM9 del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

4.1.2.4 Determinación de posibles razas

En plantaciones comerciales o Campos Experimentales del INIFAP, se colectó material de hojas de papayo de los estados de Chiapas y Veracruz, con síntomas del Virus de la Mancha Anular del Papayo (PRSV), para la caracterización de posibles razas. Para confirmar la presencia del PRSV en las hojas colectadas, se empleó la técnica serológica de ELISA, por medio de un antisuero comercial para el mismo virus de la compañía AGDIA. Posteriormente el material fue guardado a -70° C, hasta su uso para extracción de ARN total, síntesis de oligonucleótidos, transcripción en reversa y productos de Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR). El iniciador de oligonucleótidos designado para llevar a cabo PCR fue basado sobre la secuencia de nucleótidos del gene de la cubierta de proteína, de secuencias publicadas de un aislado del PRSV de Hawaí. Los productos de PCR fueron clonados usando un kit de clonación TOPO TA de la compañía Invitrogen. Dos clones independientes de cada aislamiento fueron secuenciados, en ambas direcciones por el método de terminación de cadena dideoxy usando un secuenciador de ADN ABI Prism 377. La alineación de nucleótidos y la deducción de secuencias de aminoácidos, así como el cálculo de matrices de distancia de pares, se llevó a cabo por los paquetes del programa DNASTAR (Martinez/Needleman-Wunsch y agrupamiento de Algoritmos de MegAlign versión 3).

Después de la amplificación y clonación, las secuencias de 858 nucleótidos que contenían principalmente el gene putativo de la cubierta de proteína, fueron comparadas con otras secuencias publicadas, para confirmar su identidad.

4.1.2.5 Comparación de aislamientos

Para la comparación se utilizaron solamente tres secuencias de los aislamientos mexicanos; dos de Veracruz y una de Chiapas, y once aislamientos de diferentes partes del mundo obtenidos del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Éstos

correspondieron a un aislado de China (China SS)(accesión X96538), otro de Taiwán (TAIW)(NC_001785), uno de Sri Lanka (SRI)(U14741), uno de Tailandia (THAI)(U14743), uno de Vietnam (VIET)(U14742), dos de Estados Unidos (USA-HA)(Hawai X97251) y (USA-P)(AF196839), dos de Australia (AUS-GAT)(U14739) y (AUS-W)(S89893), dos de la India (India-20) (AF063220) e (India-21)(AF063221). Las relaciones entre los aislamientos en términos de nucleótidos y variabilidad en la secuencia de aminoácidos se realizaron mediante un dendrograma.

4.1.3 Trabajos en Invernadero

4.1.3.1 Rango de hospederos

Una vez determinados los diferentes síntomas en las plantas, se tomó follaje de cada planta seleccionada y se inoculó por transmisión mecánica a plántulas de papayo tipo Maradol, además de una serie de plantas diferenciales mencionadas en el Cuadro 2, con el fin de separar en diferentes hospederos a las variantes putativas del PRSV.

La metodología consistió en colocar en un mortero 10 gramos de tejido de los diversos síntomas, agregarle amortiguador de fosfato de sodio dibásico 0.01 M pH 7.0 o de fosfato de potasio 0.1 M pH 7.0 y macerarlo, a continuación se coló el macerado con la ayuda de manta de cielo y el líquido se frotó con la ayuda de un algodón sobre las hojas de las plantas a probar, a las que previamente se les había agregado carborundum de 600 mallas con el fin de provocar heridas y posteriormente las hojas fueron lavadas con agua para evitar la presencia de inhibidores. Este mismo procedimiento se llevó a cabo también en otras plantas con el fin de definir los hospederos de este virus, usándose 15 especies diferentes pertenecientes a la familia Cucurbitaceae (*Cucumis metuliferus*, *C. sativus*, *C. melo*, *Cucurbita pepo* var. Zucchini), Quenopodiaceae (*Chenopodium quinoa* y *C. amaranticolor*), Solanaceae (*Nicotiana samsun*, *N. physaloides*, *N. tabacum* var. *xanthi*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum nigrum*, *Capsicum annum* y *Datura stramonium*), Amaranthaceae (*Gomphrena globosa*) y Caricaceae (*Carica papaya*). Cada ensayo se repitió seis veces y las observaciones para manifestación de síntomas, se realizaron diariamente hasta los 40 días. Otras especies probadas en varias ocasiones usándose diferente número de plantas desde tres hasta seis fueron: *Jacaratia mexicana* (Caricaceae), *Hyptis suaveolans*, *Boheravia erecta*, *Cardiospermum grandiflorum* (Compuestás) y *Cucurbita foetidissima*, *Cucumis sp*, (Cucurbitaceae) y *Gomphrena nitida* (Amaranthaceae).

4.1.3.2 Pruebas de transmisión

La metodología que se empleó para separar las posibles razas del PRSV, consistió en probar dos especies de áfidos comprobadas como vectores del virus, para lo cual se estableció previamente una colonia del áfido *Aphis nerii* (Boyer de Fonscolombe), sobre la planta llamada rompe-muelas o moco de pavo (*Asclepias curassavica*). La prueba

correspondieron a un aislado de China (China SS)(accesión X96538), otro de Taiwán (TAIW)(NC_001785), uno de Sri Lanka (SRI)(U14741), uno de Tailandia (THAI)(U14743), uno de Vietnam (VIET)(U14742), dos de Estados Unidos (USA-HA)(Hawai X97251) y (USA-P)(AF196839), dos de Australia (AUS-GAT)(U14739) y (AUS-W)(S89893), dos de la India (India-20) (AF063220) e (India-21)(AF063221). Las relaciones entre los aislamientos en términos de nucleótidos y variabilidad en la secuencia de aminoácidos se realizaron mediante un dendrograma.

4.1.3 Trabajos en Invernadero

4.1.3.1 Rango de hospederos

Una vez determinados los diferentes síntomas en las plantas, se tomó follaje de cada planta seleccionada y se inoculó por transmisión mecánica a plántulas de papayo tipo Maradol, además de una serie de plantas diferenciales mencionadas en el Cuadro 2, con el fin de separar en diferentes hospederos a las variantes putativas del PRSV.

La metodología consistió en colocar en un mortero 10 gramos de tejido de los diversos síntomas, agregarle amortiguador de fosfato de sodio dibásico 0.01 M pH 7.0 o de fosfato de potasio 0.1 M pH 7.0 y macerarlo, a continuación se coló el macerado con la ayuda de manta de cielo y el líquido se frotó con la ayuda de un algodón sobre las hojas de las plantas a probar, a las que previamente se les había agregado carborundum de 600 mallas con el fin de provocar heridas y posteriormente las hojas fueron lavadas con agua para evitar la presencia de inhibidores. Este mismo procedimiento se llevó a cabo también en otras plantas con el fin de definir los hospederos de este virus, usándose 15 especies diferentes pertenecientes a la familia Cucurbitaceae (*Cucumis metuliferus*, *C. sativus*, *C. melo*, *Cucurbita pepo* var. Zucchini), Quenopodiaceae (*Chenopodium quinoa* y *C. amaranticolor*), Solanaceae (*Nicotiana samsun*, *N. physaloides*, *N. tabacum* var. *xanthi*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum nigrum*, *Capsicum annuum* y *Datura stramonium*), Amaranthaceae (*Gomphrena globosa*) y Caricaceae (*Carica papaya*). Cada ensayo se repitió seis veces y las observaciones para manifestación de síntomas, se realizaron diariamente hasta los 40 días. Otras especies probadas en varias ocasiones usándose diferente número de plantas desde tres hasta seis fueron: *Jacaratia mexicana* (Caricaceae), *Hyptis suaveolans*, *Boheravia erecta*, *Cardiospermum grandiflorum* (Compuestás) y *Cucurbita foetidissima*, *Cucumis* sp , (Cucurbitaceae) y *Gomphrena nitida* (Amaranthaceae).

4.1.3.2 Pruebas de transmisión

La metodología que se empleó para separar las posibles razas del PRSV, consistió en probar dos especies de áfidos comprobadas como vectores del virus, para lo cual se estableció previamente una colonia del áfido *Aphis nerii* (Boyer de Fonscolombe), sobre la planta llamada rompe-muelas o moco de pavo (*Asclepias curassavica*). La prueba

Falta página

N° 21

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización de posibles razas del PRSV en plantas de papayo tipo Maradol.

5.1.1 Estudios de Campo.

En la siembra de enero (Lote "A") las primeras plantas enfermas se observaron hasta el mes de abril, sin embargo la incidencia, o número de infecciones más altas correspondieron a los meses de agosto y septiembre. En esta etapa es cuando se comienzan a diferenciar los síntomas, los cuales se registraron hasta el mes de octubre. La mayor presencia de plantas enfermas en los meses de agosto y septiembre concuerda con los resultados de otros autores, donde mencionan que en estos meses se incrementan las poblaciones de áfidos y de esta manera también lo hacen las plantas virosas (Becerra y Sánchez, 1985; Becerra, 1987; Mora *et al*, 1987), para el mes de octubre se alcanzó un porcentaje de 81.81% de plantas enfermas en el lote (Figura 1y 2).

La razón para el bajo número de plantas infectadas inicialmente, radicó en que en estos meses (enero a mayo) no existen precipitaciones, por lo que tampoco se presenta maleza, donde los vectores en este caso los áfidos puedan incrementar sus poblaciones, ya que este tipo de insectos no colonizan papayo, sino que sólo se acerca para alimentarse y así infectar las plantas. A partir del mes de junio en que se iniciaron las lluvias (temporal), las malezas resurgieron y las poblaciones de áfidos tienden a aumentar y el incremento de plantas de papayo enfermas también se incrementa (Becerra, 1994).

El inicio de la infección en las plantas de papayo regularmente comenzó con el aclaramiento de zonas en la parte central de las hojas medias de las plantas a lo que se le denominó Manchas Cloróticas o MAN CLO (Figura, 3). En agosto se presentó en baja proporción el síntoma denominado Amarillamiento Profuso o AMA PRO (Figura, 4), este consiste en un moteado amarillamiento del tercio medio de la planta, cambiando a un amarillamiento profuso y siguiendo hacia la parte superior (follaje más nuevo). No se observó deformación o curvamiento de las hojas hacia adentro (acopamiento) y hay presencia de manchas aceitosas bien marcadas en pecíolos, tallo y frutos, en estos últimos las manchas correspondían a puntos, medias lunas y anillos. Otro síntoma diferente observado al mismo tiempo fue el de Hoja Bandera Amarilla o HBA (Figura, 5), el cual consistió en la presencia en el tercio medio de la planta de una hoja amarilla como si fuera una senescente (sin que sea así dada su posición), la cual estuvo rodeada de hojas verdes normales. También se presentaron manchas aceitosas bien marcadas en pecíolo, tallo y frutos; además se observó un amarillamiento acelerado del follaje superior a partir de esta hoja amarilla, se detiene el crecimiento de la planta, se necrosa el follaje, hasta que sólo queda un penacho pequeño de hojas en la parte superior e incluso puede matar la planta. No se presentó deformación o ahilamiento de

las hojas. Otro síntoma observado fue el de Mosaico y Moteado o MM (Figura, 6), caracterizado como manchas amarillas poco visibles (moteado) o bien marcadas (mosaico), rodeadas por zonas verdes en las hojas. Algunas veces se observaron ampollamientos de un color verde oscuro sobre el follaje y también se presentaron manchas aceitosas sobre pecíolos, tallo, frutos y en este caso además sobre el envés de las hojas. Otro síntoma diferenciado fue el de Mano de Chango o MCh (Figura, 7), que se caracterizó por iniciar como manchas cloróticas sobre el follaje del tercio medio, después continuó con un moteado o mosaico generalizado y por último una deformación del follaje más joven, presentando las hojas ahoramiento y curvamiento hacia adentro (acopamiento), de aquí en adelante todo el follaje nuevo tendrá esta característica, se disminuyó el número de hojas y su tamaño, siendo más pequeñas, hay presencia de manchas aceitosas sobre pecíolos, tallo, flores y frutos, siendo en este caso en forma de manchas de anillos, de media luna o solamente como un punto.

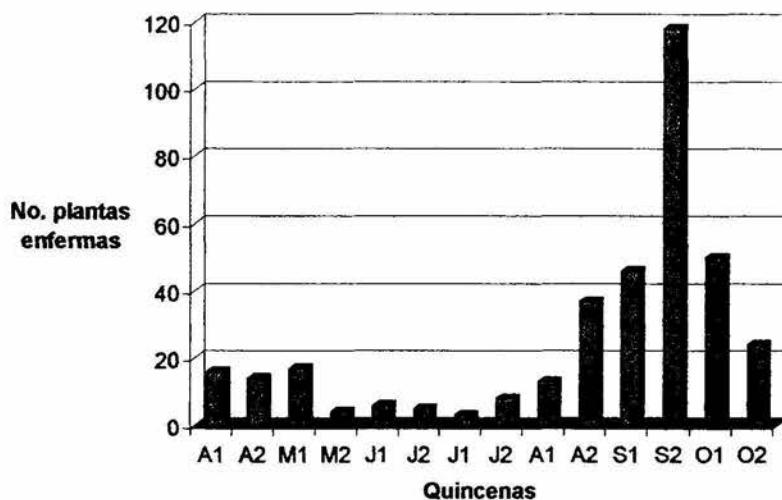


Figura 1. Número de nuevas plantas enfermas por quincena en el lote "A". Abril a octubre de 1995. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.

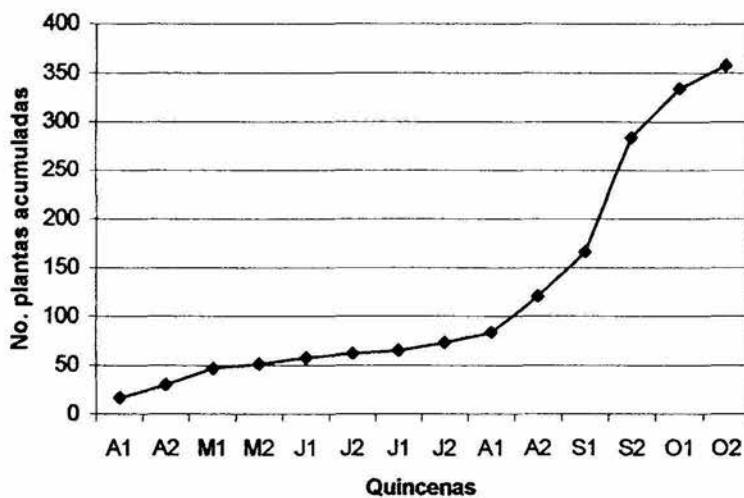


Figura 2. Número de plantas enfermas acumuladas por quincena en el lote "A". Abril a octubre de 1995. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.

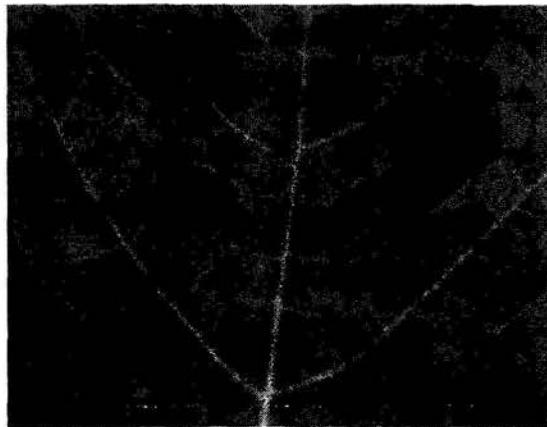


Figura 3. Hoja con síntomas de MAN CLO

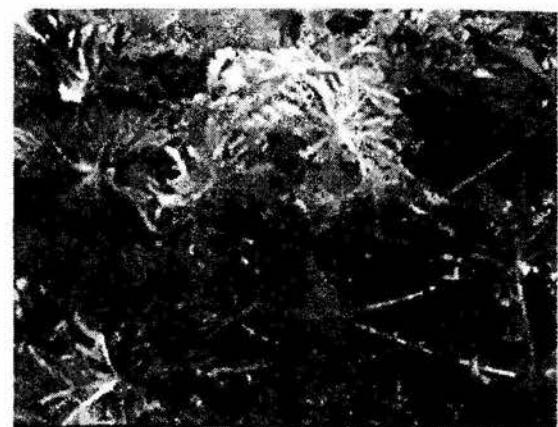


Figura 4. Planta con síntomas de AMA PRO

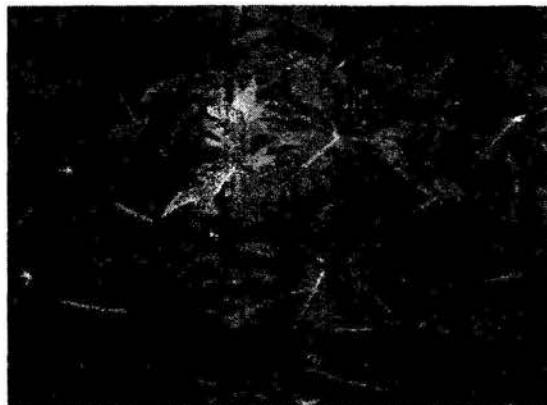


Figura 5. Planta con síntoma de HBA

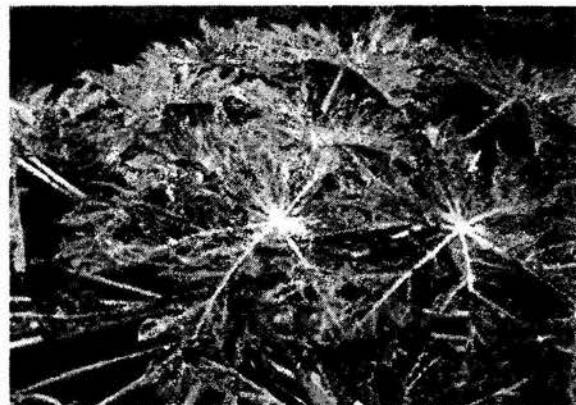


Figura 6. Planta con síntoma MM



Figura 7. Planta con síntoma MCh

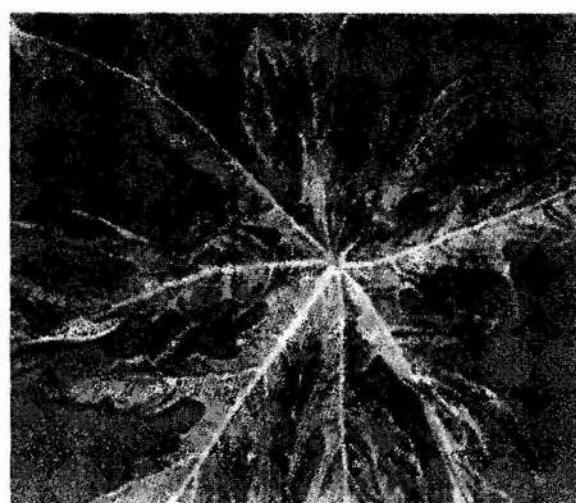


Figura 8. Hoja con síntoma de ATI

Éstos síntomas son parecidos a los que reporta Conover, (1964), para el virus de la distorsión y mancha anular del papayo en Florida. Muchas plantas mostraron una combinación de éstos síntomas. Otro síntoma observado pero que no fue tan constante durante el estudio fue el denominado Atigrado o ATI (Figura, 8), caracterizado por la presencia de aclaramiento de la hoja, con presencia de zonas más verde oscuro cerca de las nervaduras. Este síntoma fue muy inconsistente y no se tomó en cuenta para mostrarse en las gráficas, dado su poca incidencia dentro de los lotes observados. En la Tabla 2 se muestra la proporción de los síntomas descritos para los meses de agosto a octubre. La de síntomas combinados se refiere a que no se pudo separarlos, sino que había una superposición de ellos en las plantas observadas.

Tabla 2. Número de plantas enfermas con los diferentes síntomas observados en el Lote "A", de agosto a octubre de 1995. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.

Meses	Diversos síntomas observados						Plantas enfermas totales
	AMA PRO	HBA	MM	MCH	COMBINADOS	Inicio de síntomas MAN CLO	
Agosto	9	4	30	12	36	26	117
Septiembre	22	7	84	18	40	87	258
Octubre	41	15	115	54	80	13	318

En el segundo lote "B" las plantas se comenzaron a enfermar desde el mes de agosto, pero las diferencias entre síntomas se iniciaron hasta el mes de octubre, a partir de diciembre sobreviene un incremento importante de plantas enfermas en la parcela (Figura, 9), lo que está de acuerdo con otros trabajos donde se indicó que al presentarse temperaturas por debajo de los 25° C, sobreviene un incremento de las poblaciones de áfidos y esto trae como consecuencia un incremento en plantas virosas (Becerra, 1987). Por lo regular este incremento se presenta en los meses de enero o febrero, pero se ha observado que si las condiciones se presentan antes, el pico de población de insectos se puede adelantar, como sucedió en este año.

En la Figura 10 se presenta el número de plantas enfermas acumuladas por quincena, en este caso la infección fue más rápida que en el lote anterior. La presencia de los diferentes síntomas en este período se muestra en la Tabla 3. No se observaron mucha diferenciación de síntomas, en este caso los que presentaron las mayores cantidades fueron MM, MCh y la combinación de síntomas.

La mayor diferenciación de síntomas se da en el verano quizás por estar influenciados por las condiciones climáticas, principalmente temperatura y la presencia de altas poblaciones de vectores del virus. La mayoría de las plantas manifestaron los síntomas de MM y MCh, además de las combinaciones de síntomas. La presencia del síntoma HBA es parecido al que menciona Conover (1964) para el Virus de la distorsión foliar del papayo en Florida, en los meses de verano; se observa una hoja brillante amarilla en el tercio superior, en cambio en los meses con temperaturas bajas es más prevalente el síntoma parecido a MCh. La sintomatología de AMA PRO y ATI no concuerdan con ninguna descripción de virus publicada.

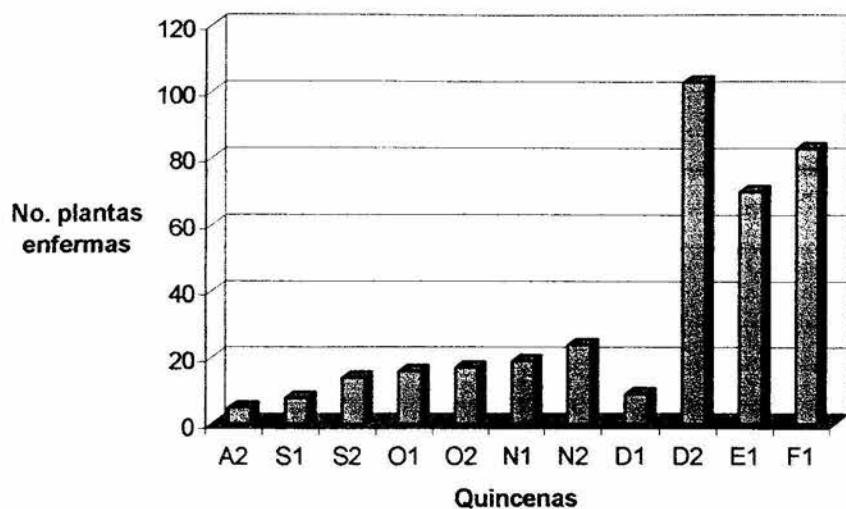


Figura 9. Número de nuevas plantas enfermas por quincena en el lote "B". Agosto 1995 a febrero de 1996. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo, Veracruz.

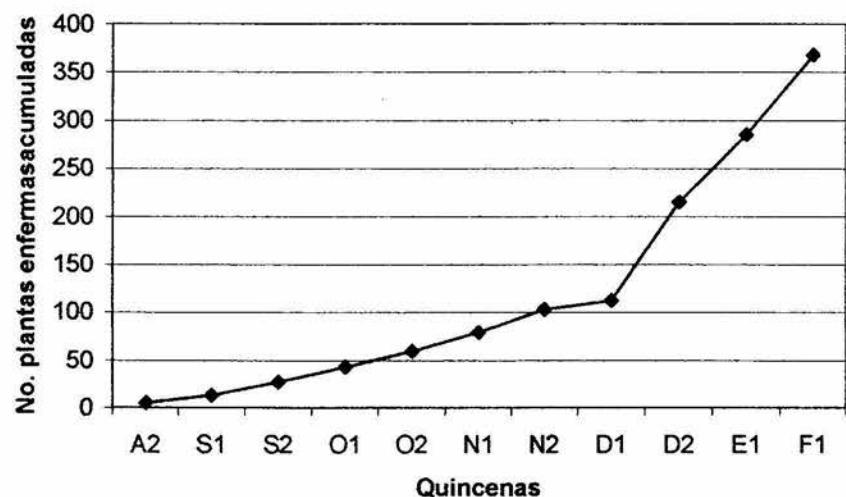


Figura 10. Número de plantas enfermas acumuladas por quincena en el lote "B". Agosto 1995 a febrero de 1996. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo, Veracruz.

Tabla 3. Diferentes síntomas observados y diferenciados en el lote de papayo "B", de octubre de 1995 a febrero 1996 ubicado en el Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.

Meses	Diversos síntomas observados					Inicio de síntomas MAN CLO	Plantas enfermas totales
	AMA PRO	HBA	MM	MCH	COMBINADOS		
Octubre	3	1	10	21	10	15	60
Noviembre	9	3	19	34	17	21	103
Diciembre	-	6	9	77	58	65	215
Enero	-	6	96	80	164	22	368
Febrero	-	1	24	78	315	33	451

Las variantes putativas del PRSV de Taiwán reaccionan al efecto de la temperatura ya que se ha observado que la raza M no presenta síntomas cuando existen bajas temperaturas, pero al aumentar se producen manchas cloróticas o moteado tenue sobre las hojas (Lin *et al.* 1989).

5.1.2 Estudios en Laboratorio

5.1.2.1 Observación al microscopio electrónico

En todas las muestras obtenidas con los diferentes síntomas presentes en el cultivo de papayo, y a las que se les procesó para tinción negativa, al observarse al microscopio electrónico solamente se observaron partículas elongadas, características del Virus de la mancha anular del papayo (PRSV), además se presentaron partículas más pequeñas, pero de la misma forma de varilla flexible, quizás se trataba de partículas partidas del mismo virus. Esto concuerda con los resultados de Ochoa y Galindo (1975) quienes mencionan haber observado en el microscopio electrónico partículas del PRSV en muestras de Morelos y Veracruz, con las mismas características. También se está de acuerdo con Téliz y colaboradores (1987), quienes citan la presencia del PRSV en México. En ninguna preparación se observaron partículas helicoidales como mencionó Noa-Carrazana y colaboradores (2001). Tampoco se observaron partículas filamentosas superenrolladas como menciona Marys y colaboradores (1995) para Venezuela, ni partículas isométricas como mencionan para Brasil, Lima y colaboradores (2001); lo cual no implica que otros virus no estén presentes en México, ya que se requiere continuar con los trabajos de detección en este cultivo.

5.1.2.2 Determinación de posibles razas

Para la determinación de posibles razas solamente se tomaron en cuenta tres muestras de follaje con los síntomas características del virus colectadas en Veracruz, una en el municipio de Tierra Blanca (Mex. VTB-6), otra en Paso de Ovejas (Mex. VPO-28), y,

otra muestra se obtuvo de Puerto Madero en Chiapas (Mex. ChT-11). Se confirmó la presencia del PRSV, por medio de la prueba serológica de ELISA, usando el antisuero comercial de la compañía Agdia, el aislado de Chiapas tuvo una reacción más fuerte que los de Veracruz, no obstante se confirmó que la sintomatología observada era causada por el mismo virus.

Al compararse los porcentajes de secuencia de nucleótidos idénticos entre los dos aislamientos de Veracruz (Mex. VTB-6 y Mex. VPO-28), éstos fueron altos 98.4%, en tanto que con el aislado de Chiapas (Mex. ChT-11) fue menor, 93.4% para el Mex. VPO-28 y 93.6%, para el Mex. VTB-6 (parte superior izquierda de Tabla 4), si se comparan las secuencias de nucleótidos de los tres aislamientos mexicanos con los aislamientos de Australia y Estados Unidos, existe un rango de 93.1% a 95.0%, que es alto si se les compara con los aislamientos de Asia en donde el rango es bajo de 82.3% y 89.0% (parte superior, células sombreadas en la Tabla, 4). Éstos patrones idénticos de nucleótidos no se reflejaron en la secuencia de aminoácidos (Tabla 4), cuando se comparan los aislamientos veracruzanos contra el de Chiapas existe un porcentaje alto de identidad entre los veracruzanos 98.9%, en tanto que con el de Chiapas es de 94.0% para el aislado Mex. VTB-6 y 94.4% para el Mex. VPO-28. Cuando se comparan los tres aislamientos mexicanos con los aislamientos asiáticos el rango está arriba del 90%, siendo el valor más bajo fue entre los aislamientos Mex. ChT-11 y VIET con 89.7% (parte media de la tabla, lado izquierdo. Tabla 4). Con respecto a la comparación de los aislamientos mexicanos con los aislamientos de Australia y Estados Unidos la identidad es más alta que con los asiáticos superior a 93% (parte baja, lado izquierdo. Tabla 4).

Como se reporta para otros Potyvirus, la región amino de la CP fue más variable que el centro de la región carboxy y esto fue más evidente en los primeros 106 aminoácidos. Dentro de esta región todas las secuencias del PRSV analizadas hasta ahora, tienen un alargamiento de la repetición EK (ácido glutámico y lisina) que se repite (región "EK"), comenzando en el tercer aminoácido después del motivo de la transmisión de áfidos DAG (Figura, 11). El triplete DAG está presente en casi todos los aislamientos, excepto en uno de Taiwán que presenta un triplete DTG. Para esta comparación se incluyeron otros dos aislamientos de Veracruz el denominado Atigrado y el Ama-Pro. La primera caja tiene un repetido EK que fue idéntica con otros cuatro con el consenso KEKEK. El Ama-Pro se diferencia en la segunda caja donde se presenta una secuencia de KEKKK, que es diferente a los otros cuatro aislamientos mexicanos donde la secuencia es KEKEK. La tercera y cuarta caja fueron más variables; en los cuatro aislamientos mexicanos, la tercera caja carece del repetido EK si se le compara con los aislamientos de América o Australianos, pero nuevamente el aislamiento Ama-Pro se asemeja mas a los aislamiento de Estados Unidos y australianos en esta caja; en los aislamientos de Asia el arreglo y número de "E" y "K" fue semejante a la cuarta caja pero más variable.

Tabla 4. Porcentaje de identidad de nucleótidos (mitad superior) y secuencia de aminoácidos (mitad inferior) entre aislamientos del PRSV Mexicanos y otros.

Porcentaje de identidad de nucleótidos														
	Mex ChT-11	Mex. VPO-28	Mex. VTB-6	India 20	India 21	SRL	VIET	THAI	TAIW	China -SS	Aus-W	Aus GAT	USA-P	USA-HA
Mex. ChT-11		93.4	93.6	82.5	82.5	84.5	87.2	86.8	86.4	83.3	93.4	93.7	93.1	94.0
Mex. VPO-28	94.4		98.4	82.3	82.3	85.5	89.0	88.0	88.5	85.0	94.2	94.5	93.8	94.8
Mex. VTB-6	94.0	98.9		85.9	85.3	84.7	87.8	88.0	88.5	85.0	94.8	95.0	93.8	94.8
India-20	93.7	95.8	95.4		83.1	83.3	83.8	85.4	83.1	81.1	84.5	85.6	84.1	84.2
India-21	90.9	93.3	93.7	93.3		83.3	83.8	85.4	83.1	81.5	84.5	85.6	84.1	84.2
SRL	92.1	92.8	92.8	93.2	90.3		85.5	87.5	86.6	81.9	87.6	86.3	86.2	86.4
VIET	89.7	93.2	93.2	92.2	90.4	92.9		91.6	92.9	87.1	88.9	89.0	88.9	89.1
THAI	91.8	94.3	93.9	93.9	91.4	90.4	94.0		92.9	92.4	90.0	90.0	87.6	90.6
TAIW	92.0	93.8	93.4	94.1	91.0	93.2	95.7	94.3		92.4	89.6	89.9	90.7	89.9
China-SS	92.0	94.1	93.7	94.1	91.6	92.2	94.0	94.2	94.4		85.0	83.1	84.7	84.8
Aus-W	94.1	96.9	96.5	95.8	92.7	92.9	95.4	94.6	94.8	94.4		98.3	96.3	96.5
Aus-GAT	93.2	95.7	95.4	95.0	92.1	92.1	94.3	93.9	94.3	93.6	97.5		96.5	96.7
USA-P	93.1	96.2	95.8	94.8	92.7	92.5	95.0	93.9	95.1	94.1	97.6	96.4		99.8
USA-HA	93.8	96.9	96.5	95.5	92.7	93.2	95.7	94.6	95.1	94.8	98.3	97.1	99.3	

Secuencia de aminoácidos

Atigrado	D	A	G	L	N	E	K	L	K	E	K	E	K	L	K	E	R	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	D	N	A	S	D	G	N	D	V	S	T	S	T		
Mex. VPO-28	D	A	G	L	N	E	K	L	K	E	K	E	K	L	K	E	R	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	D	N	A	S	D	G	N	D	V	S	T	S	T	K	R
Mex. VTB-6	D	A	G	L	D	E	K	L	K	E	K	E	K	Q	K	E	R	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	D	N	A	S	D	G	N	D	V	S	T	S	T	R	
Mex. ChT-11	D	A	G	L	N	E	K	L	K	E	K	E	K	Q	K	E	R	G	D	A	S	D	G	N	D	V	S	T	S	T	K	R									
Ama- Pro	D	A	G	L	N	E	K	L	K	E	K	K	K	Q	K	E	K	E	K	P	K	E	K	E	K	D	D	A	S	D	G	N	D	V	S	T	S	T			
USA-P	D	A	G	L	N	E	K	L	K	E	K	E	N	Q	K	E	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	D	G	A	S	D	G	N	D	V	S	T	S	R			
USA- HA	D	A	G	L	N	E	K	L	K	E	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	D	G	A	S	D	G	N	D	V	S	T	S	R			
Aus. W	D	A	G	L	N	E	K	L	K	E	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	D	D	A	S	D	G	N	D	V	S	T	S	R			
Aus. GAT				M	N	E	K	L	K	E	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	D	D	A	S	D	G	N	N	V	S	T	S	N			
India-20	D	A	D	L	N	E	K	L	K	E	K	E	K	Q	K	E	R	K	E	K	G	K	E	K	D	D	A	S	D	G	N	D	V	S	T	S	T	K	R		
India-21	D	A	G	L	D	G	K	L	K	E	K	E	N	E	K	E	R	K	E	K	I	K	E	K	E	N	A	D	D	G	N	D	V	S	S	S	T	K	G		
SRL				L	N	D	K	L	K	D	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	Q	K	E	R	D	D	G	S	S	D	G	K	D	A	S	T	S	T	T			
THAI				F	N	E	K	L	K	E	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	D	Q	R	N	K	E	N	N	E	A	S	D	G	N	D	V	S	T	S	T	I	
VIET				L	N	E	K	L	K	E	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	D	K	Q	K	D	K	D	N	D	G	A	S	D	E	N	D	V	S	T			
Chin. SS	D	A	G	L	N	E	K	L	K	E	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	D	Q	K	V	K	N	D	D	G	T	N	D	G	N	D	V	S	T	S	R		
TAIW	D	T	G	L	N	E	K	L	K	E	K	E	K	Q	K	E	K	E	K	D	K	Q	Q	D	K	D	N	D	G	A	S	D	G	N	D	V	S	T	S	R	

I-C

II-C

III-C

IV-C

Figura 11. Patrones repetidos de ácido glutámico y lisina (EK), en secuencias alineadas siguiendo el triplete DAG de la terminación amino, de la cubierta de proteína del PRSV, de tres aislamientos mexicanos y otros aislamientos de diferentes partes del mundo.

I-C = Primera Caja

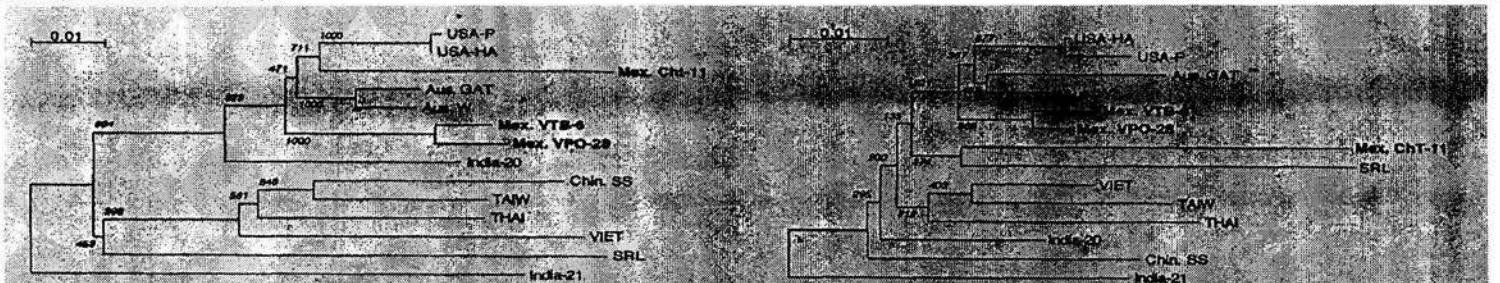
II-C = Segunda Caja

III-C = Tercera Caja

IV-C = Cuarta Caja

A. Secuencias Completas

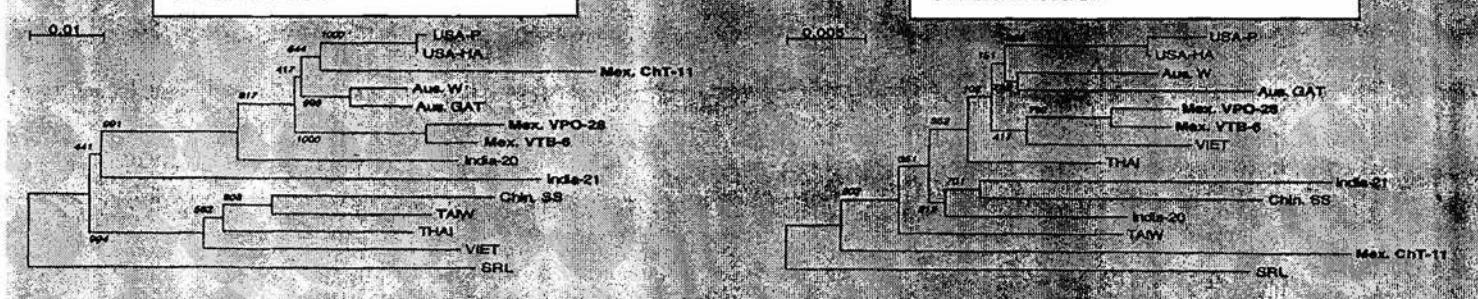
a. Secuencia de nucleótidos



b. Secuencia de aminoácidos

B. Secuencias parciales
(menos la región correspondiente al "EK....")

a. Secuencia de nucleótidos



b. Secuencia de aminoácidos

Figura 12. Dendrogramas mostrando relación filogenético de diferentes aislados del VMAP. (a) secuencias nucleotídicas completas y (b) secuencias parciales.

Clave para los diferentes aislados. (Mex. Cht-11) aislado Chiapas, México; (Mex. VPO-28) aislado P. de Ovejas Veracruz, México; (Mex. VTB-6) aislado T. Blanca, Veracruz, México; (India-29) aislado de la India; (India-21) aislado de la India; (SRL) aislado de Sri Lanka; (VIET) aislado de Vietnam; (THAI) aislado de Tailandia; (TAIW) aislado de Taiwan; (Chin-SS) aislado de China; (Aus-W) aislado de Australia; (Aus-GAT) aislado de Australia; USA-P aislado de Estados Unidos y (USA-HA) aislado de Estados Unidos.

5.1.2.3 Comparación de posibles razas

Las relaciones entre los aislamientos en términos de variabilidad de nucleótidos y aminoácidos se muestran en el dendrograma (Figura, 12). Primero fue usada la secuencia completa de la proteína de la cubierta (CP) (Figura 12 A, a y b). Los aislamientos mexicanos se agruparon con los aislamientos de Australia y Estados Unidos. Las diferencias entre las secuencias de nucleótidos y aminoácidos fueron introducidas principalmente por el aislamiento Mex. ChT-11. Este tiene una alta similitud en la secuencia de nucleótidos con los aislamientos de Estados Unidos, pero se separa fuera del grupo mexicano-australiano-norteamericano en términos de variación en la secuencia de aminoácidos sugiriendo una importancia en la secuencia de aminoácidos. El aislado India-21 fue el más distante sin importar el tipo de secuencia usada. Excepto el aislado India-20 los demás aislamientos asiáticos se agruparon en las secuencias de nucleótidos, pero muestran una alta diversidad y menor agrupamiento en la comparación de la secuencia de aminoácidos.

El segundo análisis de datos de diversidad de secuencias, se hizo usando secuencias truncadas, después de la remoción de la región que contiene el motivo repetido EK (ácido glutámico, lisina) en cada secuencia de aminoácidos (Figura, 12 B, a y b). Esto reveló nuevas ideas: primero, que la secuencia de nucleótidos del grupo de los aislamientos americanos (incluyendo Hawái) y australianos permanecen esencialmente iguales que antes de la eliminación de la región del motivo repetido EK. El aislamiento India-21 se agrupo más cercano al grupo australiano-americano, indicando que sobre toda la secuencia, la alta variación reside en la región EK (Figura, 12, B a y b). El aislado SRL se mueve fuera del árbol como el más diverso en la secuencia parcial. Por otro lado en la comparación de secuencias de aminoácidos se observaron muchos rearreglos. Notablemente Mex. ChT-11 fue excluido de cualquier grupo discreto, indicando que está altamente emparentado a los aislamientos australianos y americanos; se resalta nuevamente la importancia de la región. Toda la secuencia CP es en su mayor parte un resultado de sus similitudes en la región EK. Esto se refleja también en la cercanía de los aislamientos de China y la India al grupo australiano-americano que estaban separados antes de la remoción de los motivos EK.

Aunque es tentador especular sobre las implicaciones de la variación en la región EK considerando el origen geográfico, más datos sobre la variación local en México y otros lugares son necesarios, antes de que una firme conclusión pueda ser deducida. Éstos descubrimientos están de acuerdo con previos reportes, sobre la presencia de segmentos de 28 a 51 residuos ricos en lisina, en la misma región de la menos otros ocho potyvirus, lo cual sugiere un origen común dentro de éstos grupos y una significancia funcional para esta secuencia del motivo EK (Hammond, 1992).

Si se considera que la porción de esta proteína está expuesta en la superficie externa de la cubierta de proteína (Shukla y Ward, 1989), y está cercana al elemento de transmisión de áfidos (Atreya *et al*, 1990), este patrón de variación puede ser correlacionado a la distribución geográfica del virus y su significado biológico puede ser relevante en términos de la estructura de la cubierta cercana al sitio de transmisión

putativo de áfidos y por extensión, la evolución del patógeno en la presencia de sus hospedantes en diferentes localidades geográficas.

Finalmente la sugerencia de una relación entre la expresión de síntomas (resistencia, atenuación o susceptibilidad) y el origen geográfico del aislamiento viral retador, encuentra un atractivo paralelismo en inoculaciones experimentales del PRSV usando plantas transgénicas o plantas de papayo con protección cruzada (Tennant *et al*, 1994). La resistencia o atenuación de síntomas fueron observados en plantas de papayo con protección cruzada, con un aislado atenuado de Hawái (HA 5-1), solamente cuando el aislado retador fue de origen Norteamérica (Estados Unidos y México) Hawái o de Australia. Se ha demostrado que la cubierta de proteína interviene en la resistencia de plantas transgénicas, y es más efectiva con razas de virus específicos que con virus relacionados distamente (Lindbo *et al*, 1993). En el presente estudio los aislamientos de Norteamérica y Australianos se conjuntaron en un grupo diferente que los aislamientos asiáticos. En la ausencia de la región EK está correlación claramente se derrumba (Figura, 12 B b), esto refuerza la sugerencia de una funcional y/o estructural relevancia para esta región (Tennan *et al*, 1994; Yeh y Gonsalves, 1984).

Estas son especulaciones preliminares ya que hace falta mas trabajo con diferentes aislamientos de México y de otros lugares para conocer la variación de la región EK, y estar en posibilidad de concluir y conocer las relaciones y orígenes de las diferentes razas del PRSV que afectan al cultivo de papayo.

5.1.3 Trabajos en Invernadero

5.1.3.1 Rango de hospederos

Con la prueba de transmisión mecánica sólo se infectaron plantas de *C. papaya* y *C. metuliferus* observándose síntomas de mosaico y deformación y mosaico respectivamente a estas plantas se les realizó la prueba de ELISA, para confirmar la presencia del PRSV siendo el resultado positivo. Lo anterior está de acuerdo con varios estudios en donde se menciona que el PRSV infecta a plantas de las familias Caricaceae, Cucurbitaceae y Chenopodiaceae (Purcifull *et al*, 1984). Por otro lado, en cambio otros autores reportan a *C. pepo* var zucchini y la variedad pumpkin, además de *Cucumis melo*, *C. sativus* y *Citrullus vulgaris* como hospederos (Story y Halliwell, 1969; Yeh *et al*, 1984); posteriormente estudios llevados en México mencionan a *C. sativus* como hospedante del PRSV (Ochoa y Galindo, 1975). Además en otra investigación se menciona que de 21 especies probadas sólo *C. papaya*, *Cucurbita pepo* var. zucchini y *C. pepo* cv. Castilla mostraron síntomas (Cárdenes, 1992). En Cuba se probó la inoculación a *Jacaratia mexicana* con dos aislamientos del PRSV, uno de síntomas leves y otro severo, el primero no mostró síntomas, en tanto que el segundo, al igual que las plantas testigo de *Carica papaya* desarrollaron síntomas, en un lapso de 10 a 25 días (Fariñas, 1983 b); en nuestro caso diferimos de los resultados de Cuba ya que en la inoculación a *J. mexicana* con aislamientos del PRSV no se desarrollaron síntomas.

Lo anterior pudo deberse a que son diferentes aislamientos o a las diferentes condiciones de temperatura en donde se desarrollaron las plantas. Por otro lado nuestros resultados están de acuerdo con Cook y Zettler (1970), quienes al probar ésta planta en Florida, no lograron infectarla con un aislado de PRSV de Florida y otro de Venezuela, pero si lo lograron con un aislado del PaMV donde desarrolla una reacción de hipersensibilidad con necrosis sistémica y a las tres semanas las plantas murieron.

Al inocularse a plantas de papayo con aislamientos virales que produjeron los diferentes síntomas observados en campo ya descritos (MAN CLO; AMA PRO; MM; HBA; MCh; ATI). En la inoculación mecánica en el mes de noviembre, los síntomas se iniciaron a los 16 días de inoculadas las plantas, con manchas cloróticas en las hojas. Hubo algunas diferencias en el desarrollo de los síntomas conforme transcurría el tiempo, pero invariablemente todos llegaron a un ahilamiento del follaje o deformación de las hojas con el síntoma denominado MCh. Esto podría deberse a que este síntoma es el más común dentro de las plantaciones y posiblemente está "variante putativa" es la que presenta el mayor título de virus dentro de la planta, otra posible explicación es que aunque se trató de tomar síntomas individuales en campo, es posible que en las plantas ya existiera una combinación de las variantes putativas, lo que trajo como consecuencia que no hubiera mucha diferencia entre síntomas.

En la Tabla 5 se muestran el desarrollo de síntomas desde su aparición hasta los 44 días después de la inoculación.

Estás pruebas confirman como se reporta en la literatura (Gonsalves e Ishii, 1980; Purcifull *et al.*, 1984; Quiot-Douine *et al.*, 1990; Yeh y Gonsalves, 1984) que los aislamientos mexicanos del PRSV tiene un rango estrecho de hospederos y por lo anterior se sugiere que son variantes putativas del PRSV tipo P.

5.1.3.2 Pruebas de transmisión

Se llevaron a cabo la prueba de vectores con el áfido *Aphis nerii* inoculándose seis plantas de papayo Maradol con los siguientes síntomas HBA (planta 27-5 del lote C), MCH (planta 1-10 del lote C) y MM (planta 18-10 del lote C), la metodología que se siguió es la mencionada en materiales y métodos. Después de 23 días se empezaron a manifestar síntomas, de manchas cloróticas en cuatro de seis plantas probadas con el síntoma de HBA; a los 68 días las plantas mostraron síntomas de MCH. Los demás síntomas (MCH y MM) no mostraron manifestaciones en las plantas probadas. Otro áfido probado con los diferentes síntomas fue *Macrosiphum euphorbiae*, no hubo manifestación de mosaicos o deformación de hojas, pese a que trabajos anteriores, mostraron que este áfido es el más eficiente transmisor del PRSV (García, 1987). Lo anterior pudo haberse debido a las condiciones imperantes dentro del invernadero donde se colocaron las plantas ya que se alcanzaban temperaturas de 35° a 40° C.

5.2 Detección de plantas reservorias del PRSV por medio de ELISA

En las pruebas de Elisa las malezas que dieron positivo para el PRSV fueron: la calabaza amargosa *Cucurbita foetidissima* (Figura, 12), con síntomas de mosaico, el quelite *Amaranthus spinosus*, *A. hybridus*, el estropajo *Luffa cylindrica* también con síntomas de mosaico y *Gomphrena nitida* que fue asintomática (Figura, 13). En la Tabla 7 se dan los resultados.

Tabla 5. Desarrollo de síntomas en plantas de papayo cv. Maradol, inoculadas y mantenidas en invernadero.

Síntoma original	Síntomas			
	16 días	27 días	35 días	44 días
MAN CLO	Hojas curvadas hacia arriba y abolsamientos	Abolsamientos, hojas curvadas hacia arriba y deformación	Mosaico y ahilamiento	Ahilamientos
AMA PRO	Manchas cloróticas, hojas curvadas hacia arriba	Amarillamiento del follaje tierno	Inicia deformación con ahilamiento	Moteados y Ahilamientos
MM	Manchas cloróticas, hojas curvadas hacia arriba	Abolsamientos, hojas curvadas hacia arriba y ahilamiento, Mosaico	Algunas hojas con ahilamientos y otras con hojas curvadas hacia arriba	Manchas verde oscuras y ahilamiento, hojas curvadas hacia arriba
HBA	Manchas cloróticas, comienza deformación	Mosaico con ahilamientos	Ahilamientos	Ahilamientos
MCH	Manchas cloróticas abundantes, hojas curvadas, comienza deformación	Abolsamientos, hojas curvadas hacia arriba, Mosaicos, se inicia deformación	Moteados y ahilamiento en casi todas las hojas	Ahilamientos en toda las hojas, disminución tamaño de las mismas
ATI	Coloración verde intenso borde de nervaduras y abolsamientos	Coloración verde intenso borde de nervaduras, abolsamientos	Coloración verde intenso borde de nervaduras, inicia deformación	Ahilamientos con deformación en casi todas las hojas

MANCLO = Manchas cloróticas en hojas, inicio de la infección del PRSV; AMAPRO = moteado amarillo profuso, sin deformación; MM = manchas amarillas poco visibles o bien marcadas rodeadas por zonas verdes; HBA = presencia en el tercio medio de la planta de una hoja amarilla, Rodeada de hojas verdes; MCH = deformación del follaje hasta provocarle ahilamiento; ATI = aclaración de las hojas con presencia de zonas verde oscuro cerca de las nervaduras.

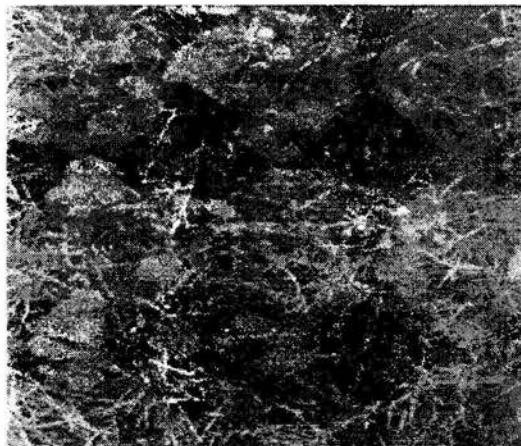


Figura 13. Planta de *Cucurbita foetidissima* con síntomas de virus.



Figura 14. Planta de *Gomphrena nitida* asintomática.

Tabla 6. Resultados de la prueba de ELISA en maleza, cultivo o planta diferencial.

Familia	Género y especie	Nombre común	Resultado
Cucurbitaceae	<i>Cucumis metuliferus</i>	Diferencial	+
	<i>C. sativus</i>	Pepino	-
	<i>C. melo</i>	Melón	-
	<i>Cucurbita pepo</i> var., <i>zucchini</i>	Calabaza	-
	<i>Cucurbita foetidissima</i>	Calabaza amargosa	+
	<i>Cucumis</i> sp	Meloncillo	-
	<i>Luffa cylindrica</i>	Estropajo	+
	<i>Chenopodium quinoa</i>	Diferencial	-
Quenopodiaceae	<i>C. amaranticolor</i>	Diferencial	-
	<i>Nicotiana samsun</i>	Tabaco	-
Solanaceae	<i>N. physaloides</i>	Tabaco	-
	<i>N. tabacum</i> var. <i>xanthi</i>	Tabaco	-
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomate	-
	<i>Solanum nigrum</i>	Hierba mora	-
	<i>Capsicum annuum</i>	Chile	-
	<i>Datura stramonium</i>	Diferencial	-
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	Diferencial	-
	<i>Gomphrena nitida</i>	Quelite	+
	<i>Amaranthus hybridus</i>	Quelite	+
Caricaceae	<i>Amaranthus spinosus</i>	Quelite espinoso	+
	<i>Carica papaya</i>	Papaya	+
Compuestás	<i>Jacaratia mexicana</i>		-
	<i>Hyptis suaveolans</i>	Hierba del burro	-
	<i>Boheravia erecta</i>	Hierba del fraile	-
	<i>Cardiospermum grandiflorum</i>	Tronadora	-

VI. IDENTIFICACIÓN DE OTRO VIRUS AFECTANDO EL CULTIVO DE PAPAYO

Introducción

En el transcurso de la investigación a nivel de campo en los lotes sembrados y en parcelas de agricultores, se observaron plantas de papayo con síntomas diferentes a los que ocasiona el Virus de la Mancha anular del papayo, aunque originalmente se evaluaron en la variedad cubana Maradol, después de efectuar los recorridos, se pudo constatar que también se presentaban en los tipos criollos como Cera y Mamey además de otras introducidas como Cariflora. Una sintomatología semejante se reportó de Venezuela y Florida en 1981, causado por un virus del grupo de los Rhabdovirus, por lo que se consideró conveniente realizar un trabajo adicional, para determinar el agente causal de dicho trastorno.

1). Características generales del grupo Rhabdovirus

La familia Rhabdoviridae tiene los siguientes géneros definidos:

Vesiculovirus son transmitidos por moscas sangradoras en animales.

Lyssavirus son transmitidos por murciélagos, zorrillos, mapache, zorros, lobos, perros etc.

Ephemerovirus son transmitidos por mosquitos que se alimentan de sangre.

Novirhabdovirus son transmitidos de pez a pez o por virus habitantes del agua.

Cytorhabdovirus son transmitidos por chicharritas, saltahojas, áfidos ácaros y chinches.

Nucleorhabdovirus son transmitidos por chicharritas y áfidos (ICTV, 2005).

Son partículas baciliformes o de forma de bala, normalmente de 200 a 350 nm de largo y 70 a 95 nm de diámetro. Las partículas poseen una membrana que las envuelve, la que rodea la nucleocapside y de esta salen unas espigas de 5 a 12 nm de largo. Las partículas contienen un cordón sencillo de ARN de polaridad negativa. La infectividad permanece en la savia 10 minutos a 50-51° C; menos de un día a 4-25°; la concentración en la savia es de 1-10 mg/l. La transmisión ocurre por artrópodos chupadores de plantas en una manera circulatoria (propagativa), principalmente por Hemípteros. El vector puede permanecer virulífero toda su vida, pero transmite menos eficientemente con el incremento de la edad, algunos Rhabdovirus pueden ser transmitidos mecánicamente. La transmisión por semilla no ha sido reportada. Las partículas de muchos Rhabdovirus de plantas se desarrollan en la membrana interior nuclear y se acumulan en el espacio perinuclear (Peters, 1981).

2). Reportes en el cultivo de papayo

El primer reporte de la presencia de un Rhabdovirus en el cultivo de papayo fue en el estado de Zulia en Venezuela. Durante 1979 se presentaron plantas de papayo con síntomas de amarillamiento general, seguido por un marchitamiento de las hojas jóvenes y necrosis de la punta de la planta, la porción apical de la planta muere y todas las hojas caen; en algunas plantas se producen nuevas formaciones de brotes por debajo de la parte muerta, pero frecuentemente éstos nuevos crecimientos muestran

síntomas de la enfermedad y se colapsan. La enfermedad recibió el nombre de Virus de la necrosis apical del papayo VNAP o Papaya apical necrosis virus (PANV) [Lastra y Quintero, 1981].

El segundo reporte se citó en el Condado de Dade en Florida, Estados Unidos. Durante el otoño de 1980 y 81 se observaron plantas de papayo enfermas en huertas con síntomas de necrosis apical y marchitamiento con curvatura de las hojas en la parte de 1/3 o 1/2 de la corona. Los pecíolos son más cortos, tiesos y fueron arqueados hacia abajo, a menudo desarrollaron líneas paralelas de color gris (costillas); las hojitas presentan una coloración pálida amarillenta, no se expanden normalmente y son recurvadas agudamente, con el tiempo se amontonan y las nuevas son más pequeñas. La corona comienza a redondearse y tiene una apariencia de arrepollamiento, los entrenudos son más cortos; las flores abortan y el prendimiento es más escaso, al realizar una herida el látex fluye libremente de los tejidos. A este Virus se le denominó Virus del Marchitamiento y necrosis del papayo o Papaya droopy necrosis virus (PDNV) [Wan y Conover, 1981].

Posteriormente al llevar a cabo un recorrido por el sureste de Florida observando plantas silvestres y plantaciones de papayo comerciales, se determinó que el PRSV (Potyvirus) está ampliamente distribuido y va de un rango de 0 a 100%; en tanto que el PDNV (Rhabdovirus) obtuvo un rango de 0 a 22%. Además mencionan que no se observaron síntomas ni de BT (Organismo Tipo Mycoplasma) ni del PaMV [Potexvirus] (Wan y Conover, 1983).

Otro reporte se citó en las Provincias de Holguín y la Habana en Cuba, donde plantas de papayo manifestaron síntomas de clorosis en los ápices de las hojas, con marchitez y necrosis del cogollo de la planta, al realizar observaciones al microscopio electrónico y efectuar tinción de inclusiones, se observaron partículas baciliformes y agregados de partículas respectivamente (Mejías, *et al*, 1987).

Aunque el PANV y el PDVN son parecidos en algunos aspectos, se diferencian en otros, principalmente en sintomatología. Ninguno es transmitido mecánicamente; el primero mide 98 X 180-254 nm y el segundo 80-84 X 210-230. Presentan agregados de partículas en el núcleo de las células del parénquima vascular; aunque en ocasiones se observan también en el citoplasma. En el caso del PANV se reporta como vector a *Empoasca papayae* una chicharrita; en cambio no se ha encontrado el vector de PDVN (Zettler y Wan, 1994).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Sintomatología y distribución de plantas virosas por lote.

7.1.1 Sintomatología.

Se realizó una descripción de la sintomatología de las plantas de papayo variedad Maradol afectadas por la nueva enfermedad. Se obtuvo material foliar de papayo variedad Maradol sembrada en el Campo Experimental Cotaxtla con diferentes síntomas, para trabajarla posteriormente en el laboratorio en el Colegio de Postgraduados en Montecillos, Estado de México.

7.1.2 Distribución e incidencia de plantas enfermas.

En dos parcelas del Campo Cotaxtla, en Veracruz se observó la secuencia de síntomas y distribución de plantas enfermas, la primera se sembró el día 18 de enero de 1995 Lote "A" en la época de bajas temperaturas; y el Lote "B" el 12 de junio en la época de altas temperaturas. Las parcelas donde se evaluaron los diferentes síntomas observados para el PRSV se utilizaron, para observar la incidencia y caracterizar la nueva enfermedad. Además se colectaron insectos del tipo chicharritas dentro de las plantaciones y se mandaron identificar al Centro Nacional de Referencia de Sanidad Vegetal en la Ciudad de México, Distrito Federal.

Además a nivel de campo se cuantificó la incidencia de la nueva enfermedad en parcelas de productores de varios municipios de Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Tabasco.

7.2 Observación al microscopio electrónico.

Se utilizó material con diferentes síntomas putativos de Rhabdovirus provenientes de los lotes sembrados de papayo variedad Maradol Campo Cotaxtla, utilizando la técnica de gota e inmersión, para llevar a cabo la tinción negativa.

El procedimiento consistió en tomar una pequeña porción de las hojas con síntomas y colocarlas en un portaobjetos, a continuación se le agregó amortiguador de fosfato de potasio 0.01M con pH 7 y se maceró el tejido con la ayuda de una navaja de rasurar nueva, una vez bien picado el material se trata de separar los residuos vegetales y se concentra el líquido, se toma la rejilla de cobre (previamente recubierta con formaldehído polivinílico [Formvar]) con la ayuda de unas pinzas y se coloca sobre una gota de cualquiera de los dos contrastantes ya sea ácido fosfatúngsico (2% con pH 6.9) y acetato de uranilo (1%); una vez impregnada la rejilla se coloca sobre el líquido del macerado y posteriormente se coloca sobre un papel filtro en una caja de Petri. La

observación se llevó a cabo en el microscopio electrónico Zeiss EM-9 del Colegio de Postgraduados. Otro procedimiento fue el de colocar sobre las rejillas de cobre una gota de los contrastantes y sobre éstas colocar durante cinco minutos un pedazo de tejido con síntomas, posteriormente se quita el exceso con papel filtro y se coloca la rejilla en una caja de Petri con un papel filtro en el fondo.

7.3 Tinción de inclusiones.

Se siguió la técnica de Christie y Edwardson (1977), la cual consistió en fijar las muestras en 2 metoxietanol (etilen glicol monometil éter), cortar secciones de tejido en un micrótomo de congelación de CO₂ Modelo 880 American Optical, haciendo cortes de 25 micras, se sumergen los cortes por 15 minutos en una solución formada por agua destilada desionizada, anaranjado calcomine y luxol verde brillante en una proporción de (1:1:10). Transcurrido el tiempo se enjuagaron los cortes en etanol absoluto brevemente y se pasaron a una solución de metil celosolve por un minuto, se secaron y se pasaron a un portaobjetos al cual le fue añadido una gota de glicerina, procurando acomodar los cortes antes de situar el cubreobjetos, una vez realizado esto se pasaron a un microscopio óptico y se observaron con el objetivo de inmersión (100X), colocando una gota de aceite de inmersión.

También se siguió el procedimiento de Mejías *et al* (1987), que consiste en colocar los cortes de tejido en una solución acuosa al 0.1% de Rosa de Bengala, por 15 a 60 minutos, se lavan brevemente con agua y se colocan en un portaobjetos, al cual le fue adicionado una gota de glicerina, se acomodaron los cortes, procurando que no quedaran encimados, se colocó el cubreobjetos y se observaron al microscopio óptico como se mencionó anteriormente. En ambos casos se realizó también la tinción con material sano. Esta parte del trabajo se llevó a cabo en el en el laboratorio de Histopatología del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados en Montecillos, Estado de México.

7.4 Preparación de material para cortes al ultramicrótomo.

De las muestras que se utilizaron para la observación de tinción negativa, se tomaron trocitos de 5.0 cm, los cuales fueron colocados en frascos con glutaraldehído 3% en amortiguador de cacodilato de sodio al 2% con pH 6.9, dejándose reposar por tres horas a 41° C. Posteriormente se seccionaron en trocitos de 0.5 mm y se colocaron en glutaraldehído 3% en cacodilato de sodio 0.2M con pH 6.9 durante dos horas a 4° C. A continuación se realizaron tres cambios o lavados de 15 minutos cada uno con cacodilato de sodio 0.2M pH 6.9. El material se postfijo en tetraóxido de osmio 1% en cacodilato de sodio 0.2M con pH 6.9 durante 95 minutos, se lavaron tres veces durante quince minutos nuevamente con la misma solución y se deshidrataron tres veces durante 20 minutos, cada uno en alcohol etílico de 50, 70, 90 y 100%. Se realizaron dos cambios de resina Spurr y se llenaron cápsulas de plástico con esta misma sustancia, colocándose una pieza de tejido en cada una, las cápsulas se colocaron sobre una

placa de ELISA usada y se dejaron en la estufa a 45° C toda la noche, posteriormente se polimerizó la resina por 24 horas a 60° C. Una vez polimerizado se cortó la resina con una navaja gruesa hasta encontrar el tejido, dándole una forma de pirámide para poder realizar los cortes, para ello se utilizó un ultramicrótomo Austria OMU3, modelo 570 con microscopio estereoscópico, con aumentos de 0.7 a 4.2 X y cuchilla de vidrio. Una vez obtenidos los cortes éstos se montaron en una rejilla de cobre y se les añadió el contrastante y se observaron en los microscopios electrónicos Zeiss modelo EM9 y JEOL 100B de la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados en Montecillos, Estado de México.

7.5 Pruebas de transmisión del agente causal.

Se llevó a cabo mediante la transmisión mecánica utilizando un amortiguador (fosfato de sodio dibásico 0.01M y pH 7.0) a las siguientes especies de plantas: *Carica papaya* var Maradol, *Nicotiana tabacum* var. xanthi, *Gomphrena globosa*, *Cucurbita pepo* var. zucchini, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Lycopersicon esculentum*, *Cucumis metuliferus*, *C. sativus* y *C. melo*.

Otra prueba realizada consistió en colectar frutos de plantas enfermas con los síntomas característicos de la nueva enfermedad, se colectó la semilla, se eliminó el mucílago de la misma (sarcotesta) se secó y posteriormente se sembró en charolas germinadoras con substrato y se evaluó el porcentaje de germinación además de observar la presencia de síntomas de origen viral.

Se efectuaron transmisiones a partir de injerto de material enfermo obtenido directamente de campo, de plantas con síntomas característicos de necrosis apical y se injerto en plantas sanas de papayo Maradol, crecidas en invernadero en macetas de plástico con capacidad de 20 litros de suelo, el método empleado fue el de enchapado lateral.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Sintomatología y distribución de plantas enfermas por lote.

8.1.1 Sintomatología.

Aunque se encontraron síntomas del PRSV en las plantaciones visitadas, fue posible distinguir y diferenciar los síntomas de la nueva enfermedad. Está consistía en acortamiento de entrenudos, lo que provocaba enanismo de la planta infectada (Figura, 14) comparado con las plantas sanas que eran más altas; el follaje era menos abundante y presentaba una apariencia de arrepollamiento, las hojas más jóvenes presentaron una coloración amarilla clara casi transparente, después se observó una necrosis de los márgenes de las hojas (Figura, 15) y posteriormente estas adquirían una consistencia coriácea y se presentó desprendimiento de tejido, quedando sólo las nervaduras más gruesas, los pecíolos se arquearon en la parte cercana de la lámina y se observaron una serie de estrías gris-rojizas a lo largo de los pecíolos, las flores y frutos pequeños adquieren una posición vertical en vez de horizontal como es característico. No se presentaron las manchas aceitosas en pecíolos, tallos o frutos, pero en el follaje más viejo se puede observar unos amarillamientos difusos sin forma definida, pero que no era uniforme en todas las plantas. En estados avanzados de la enfermedad se presentó una necrosis de flores (mes de septiembre), por lo que en el tronco hay ausencia de frutos y las hojas secas quedan unidas al tallo, al disminuir el tamaño de las hojas llegó un momento en que sólo se observó un pequeño arrepollamiento del follaje superior en las hojas terminales (Figuras, 16 y 17). Posteriormente comenzó a presentarse defoliación de la planta, aunque nunca hubo muerte del punto de crecimiento como lo reportan en Venezuela y Florida, incluso algunas plantas comenzaron a recuperarse del daño en el mes de noviembre, pero después muchas de ellas fueron infectadas por el PRSV y en ese caso se combinaron los síntomas ya que se observaron mosaicos y deformación de los foliolos (manos de chango), presencia de manchas aceitosas en el envés de las hojas, pecíolos, tallos y frutos.

Está sintomatología concuerda con la reportada para el Virus de la necrosis apical del papayo (PANV) en Venezuela (Lastra y Quintero, 1981) y el Virus de la marchitez apical del papayo (PDVN) en Florida, Estados Unidos (Wan y Conover, 1981). Aunque se mencionó que las dos enfermedades son distintas, concuerdan en la sintomatología ocasionada en plantas de papayo, el virus no se transmite mecánicamente, pero difieren en las mediciones de la partícula, lo cual puede ser ocasionado por los diferentes métodos de tinción, o que se deba a diferentes variantes putativas del mismo virus. Al llevar a cabo una incisión en hojas, pecíolos, tallos o frutos, la savia fluye libremente, lo que descartó la presencia de la enfermedad Bunchy Top (Cook, 1972).



Figura 15. Planta con síntomas de enanismo.

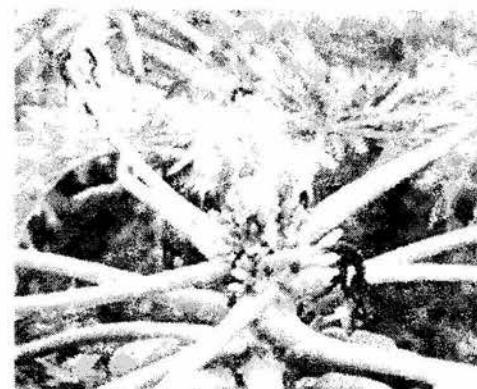


Figura 16. Necrosis apical de hojas.

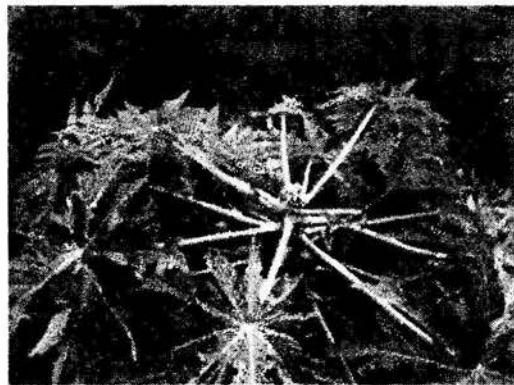


Figura 17. Planta con arrepollamiento del cogollo.

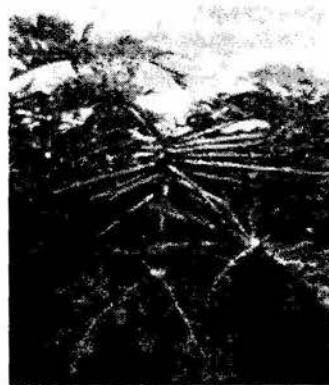


Figura 18. Planta con arrepollamiento del cogollo.



Figura 19. Pecíolos arqueados y con listados (costillas)



Figura 20. Planta sin presencia de manchas aceitosas

8.1.2 Distribución e incidencia de plantas enfermas.

En las parcelas del Campo Cotaxtla donde se siguió el desarrollo de la enfermedad se encontró que en el Lote sembrado en época de temperaturas bajas, la enfermedad se presentó a partir del verano (agosto) y va disminuyendo hacia los meses fríos (Tabla, 8), parte de la información concuerda con los reportes de Wan y Conover (1981) en que se presentó la enfermedad a partir del verano. Éstos autores mencionaron que la necrosis del follaje tierno (síntoma más severo) se da en el invierno y en el caso nuestro sucede en agosto y septiembre. El segundo lote sembrado en la época de altas temperaturas también comenzó a mostrar plantas enfermas a partir de agosto y las plantas enfermas van disminuyendo en los meses más fríos del año (Tabla, 9)

Tabla 7. Número de plantas enfermas con síntomas de necrosis apical observados en el Lote "A", de agosto a diciembre de 1995 de un total de 400 plantas. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.

	Meses					
	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Número de plantas con síntomas	0	3	26	9	12	12
Necrosis apical						
Número de plantas acumuladas	0	3	29	38	50	62

Tabla 8. Número de plantas enfermas con síntomas de necrosis apical observados en el Lote "B", de agosto a diciembre de 1995 de un total de 696 plantas. Campo Experimental Cotaxtla, Medellín de Bravo. Veracruz.

	Meses					
	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Número de plantas con síntomas	0	2	10	11	4	6
Necrosis apical						
Número de plantas acumuladas	0	2	12	23	27	31

Tanto en el lote "A" como el "B" se presentaron plantas en las cuales se combinaron los dos síntomas, siendo más agresivo en planta adulta el PRSV, pues era el que enmascaraba al PANV, aunque se podían notar los estragos de este último sobre el tallo (acortamiento de entrenudos).

Los insectos del tipo chicharritas colectados en las parcelas de papayo en Veracruz, se identificaron en la Dirección general de Sanidad Vegetal, como los géneros *Tettigonia prolixa*, *T. occatoria* y *Tettigonia* sp, además de *Agallia modesta* y *A. lingula* de la familia Cicadellidae. También se identificó al género *Sogata* sp., de la familia Delphacidae. Ninguno de éstos es reportado como vector de Rhabdovirus en papayo ya que en Venezuela citan que la chicharrita *Empoasca papayae* Oman es el vector (Lastra y Quintero, 1981). Otra diferencia es que el PANV es transmitido por la chicharrita *Empoasca papayae* Omán y el PDNV no se le conoce el vector, dado que esta chicharrita no está reportada para el estado de Florida en los Estados Unidos en papayo, por lo que se desconoce su forma de transmisión (Wan y Conover, 1981).

Los resultados están de acuerdo con Wan y Conover (1981) ya que éstos autores tampoco detectan a la chicharrita *E. papayae* en plantaciones de papaya en Florida. Los vectores reportados para el grupo de los Rhabdovirus comprenden a chicharritas, áfidos, ácaros y chinches del Orden Hemiptera (Peters, 1981).

La distribución de las plantas enfermas en el campo era del tipo agregado, lo que puede indicar que el vector no tiene mucha capacidad de vuelo. Las condiciones ambientales que se presentaron al iniciarse las primeras plantas enfermas, fueron temperaturas máximas de 35° C; media de 28° C y mínimas de 20° C, con altas precipitaciones.

Los síntomas concuerdan con los de Florida y Venezuela para el PDVN y PANV respectivamente (Wan y Conover, 1981; Lastra y Quintero, 1981), además de que en esos sitios se menciona que la enfermedad se presenta en verano, pero es más agresiva durante los meses de invierno, tal como está sucediendo en nuestro caso. Aunque no se mencionan las temperaturas en los países donde se reporta en nuestro caso se presentó con temperaturas máximas de 35° C, medias de 28.4° C y mínimas de 20° C, en los meses posteriores las infecciones tienden a bajar.

La incidencia de la nueva enfermedad se observó principalmente sobre la variedad de papayo "Maradol" de origen cubano y en menor proporción en "Cera" y "Mamey" de origen criollo de Veracruz. Todos los estados visitados (Tabla, 10), mostraron plantas enfermas con los síntomas característicos, pero sólo en el caso de Veracruz se llevaron a cabo observaciones al microscopio electrónico de partículas. Los porcentajes de incidencia fueron bajos de 0.1% a 10%, dentro de las plantaciones lo cual está de acuerdo con Wan y Conover (1983), quienes reportan incidencias bajas al efectuar muestreos en varios condados de Florida en Estados Unidos.

Tabla 9. Presencia de síntomas de PRSV y Rhabdovirus en diferentes variedades de papayo en varios estados y municipios del sureste de México.

Estado	Municipio	Presencia PRSV	Presencia PANV	Variedad
Chiapas	Mapastepec	X		Maradol
	Huehuetán	X		Maradol
	Suchiate	X	X	Maradol
Tabasco	Cunduacán		X	Mamey
	Cárdenas	X	X	Maradol
	Reforma	X	X	Mamey
	Del Centro	X		Mamey
Oaxaca	Acatlán de Pérez Figueroa	X	X	Maradol
	Tetitlán	X	X	Maradol
Veracruz	Paso de Ovejas	X	X	Cera y Maradol
	Puente Nacional	X	X	Cera y Maradol
	Alamo	X	X	Cera y Maradol
	Piedras Negras	X	X	Maradol
	Cotaxtla	X	X	Cera y Maradol
	Medellín de Bravo	X	X	Maradol
	Jamada	X	X	Maradol
	Axtopán	X	X	Cera y Maradol

8.2 Observación al microscopio electrónico.

Las muestras obtenidas de campo presentaban los siguientes síntomas:

Muestra 1.- Líneas grises en los pecíolos, necrosis del tejido tierno sobre todo en los márgenes, manchas amarillas en las hojas parecidas a mosaicos en algunas zonas, pero más difusas, presencia de abolsamientos pero no de coloración oscura como en el caso del PRSV.

Resultados. Con ácido fosfotungstico y en macerado se observaron partículas沿adas flexibles partidas y partículas esféricas. Las primeras posiblemente eran del Virus de la mancha anular del papayo y las segundas quizás del Virus de la Mancha anular del tabaco ya que Rodríguez (1994) lo reporta aunque en baja proporción (0.17%) en Veracruz al usar la prueba serológica de ELISA; también existe un reporte de Cuba (Fariñas, 1990) de partículas esféricas aunque aquí no llegan a identificar al virus.

Muestra 2.-También presenta líneas grises en pecíolos, necrosis de hojas tiernas con desprendimiento de tejido, en las maduras quedan sólo restos de tejido con abolsamientos y mosaico, cerca de las nervaduras. Las hojas son más tiesas y presentan amarillamientos.

Resultados. Con la técnica de acetato de uranilo y macerado quedó muy cargada de material la preparación, no se pudo observar. Con la de colocar sólo el tejido si quedó bien y se pudieron observar solamente partículas de forma de bacilo. Esto está de acuerdo con Cambell y Lin (1972) quienes citan que con la tinción de acetato de uranilo los Rhabdovirus quedan de forma de bacilo.

Muestra 3.- Con líneas en los pecíolos, manchas cloróticas en hojas viejas, necrosis en intermedias, con mucha clorosis en las tiernas, en todas se observó necrosis en los márgenes.

Resultados. Con ácido fosfotúngsico tanto en la muestra de macerado como en la de poner el tejido, se observaron partículas elongadas flexibles enteras y partidas.

Muestra 4.- Presentaba los síntomas típicos del PRSV, mosaicos con abolsamientos y combinado con los del Rhabdovirus tejido tierno clorótico.

Resultados. Con acetato de uranilo la preparación se presentó muy cargada no se pudo observar. Con ácido fosfotúngsico y macerado de material se observaron varillas elongadas flexuosas completas y partidas, además de partículas en forma de bala (Características de Rhabdovirus) y esféricas. Esto concuerda con Cambell y Lin (1972) quienes mencionan que en la tinción con ácido fosfotúngstico los Rhabdovirus tienden a presentar la forma de bacilo, pero en mayor proporción la de bala.

En una de las preparaciones con ácido fosfotúngsico se observaron partículas filamentosas flexibles cortas y partículas en forma de bala (Figura, 20); las primeras eran posiblemente partículas del PRSV y las segundas del nuevo virus, que correspondían al PANV, que presenta esta característica. En preparaciones con acetato de uranilo las partículas observadas fueron de forma baciliforme, lo cual concuerda con Creamer (1992) quien al utilizar el acetato de uranilo en el Virus del Mosaico enano del sorgo encontró partículas de forma baciliforme. También está de acuerdo con Peters y Kitajima (1970), quienes mencionan que el ácido fosfotúngsico causa una fractura cerca de la base de la partícula baciliforme y se forma la de bala. Otros autores además mencionan que la tinción con ácido fosfotúngstico da partículas de forma de bala, mientras que las tratadas con acetato de uranilo las presentan en forma baciliforme, estando la osmosis y el efecto de imbibición presentes afectando las partículas en la tinción (Francki *et al*, 1987).

8.3 Tinción de inclusiones.

Con el colorante Anaranjado Calcomine y Luxol verde Brillante el nucleolo se tiñó de color verde y cerca de este se observaron inclusiones del tipo granuloso y vacuolar; con el Azure A, las inclusiones se observaron dentro del núcleo de un color azul intenso y con la tinción de rosa de Bengala los núcleos e inclusiones tomaron una coloración rosa y fueron del tipo granular, lo anterior está de acuerdo con Mejías y colaboradores (1987), quienes realizaron un estudio similar en Cuba.

8.4 Cortes al ultramicrótomo.

Al observar las preparaciones del ultra micrótomo al microscopio electrónico se observaron partículas de forma de bacilo, éstas se localizaron en el espacio perinuclear de los núcleos de células infectadas y dentro de vesículas formadas por el retículo endoplasmático (Figura, 21).

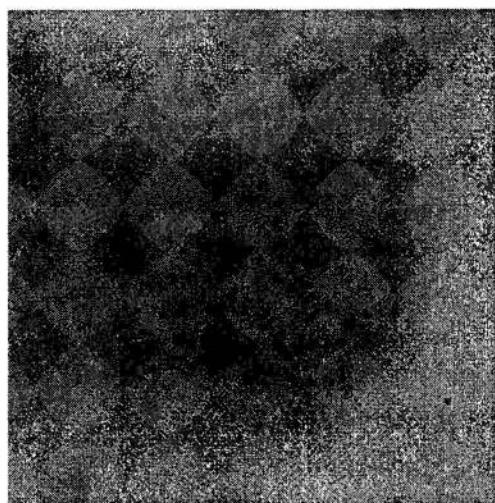


Figura 21. Virus de forma de bala característicos de Rhabdovirus procesados por tinción negativa.

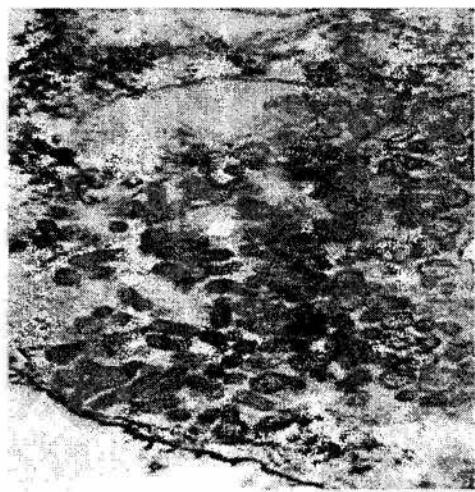


Figura 22. Virus observados en cortes de tejido con el ultramicrótomo de plantas con síntomas de Rhabdovirus.

8.5 Transmisión del agente causal.

Las plantas inoculadas mecánicamente no manifestaron síntomas lo cual concuerda con los estudios llevados a cabo en Florida, en donde encontraron que el Virus de la Marchitez y necrosis apical no se transmite de esta manera (Zettler y Wan 1994; Lastra y Quintero, 1981).

Los resultados de la prueba de transmisión por semilla fue negativa, al no mostrar síntomas de la enfermedad las plantas emergidas de la prueba. Lo anterior está de acuerdo con Peters (1981) y Franck y colaboradores (1987) quienes mencionan éstos virus no se han reportado como transmitidos por semilla; el por ciento de germinación de las semillas estuvo entre 40% a 47%, lo cual es bajo, no obstante que se obtuvo de frutos recién cosechados. No se obtuvieron síntomas característicos de la enfermedad en las plantas injertadas.

IX. CONCLUSIONES

1. Se lograron caracterizar tres aislamientos del PRSV, que fueron la VPO-28, VTB-6 de Veracruz y la ChT-11 de Chiapas.
2. Estos aislamientos de México correspondieron mejor en las secuencias con los aislamientos de Estados Unidos y Australia que con los aislamientos de Asia.
3. Se detectaron cuatro malezas y cuatro cultivos como reservorio del PRSV en campo (*Amaranthus hybridus*, *A. espinosus*, *Gomphrena nitida*, *Cucurbita foetidissima* y cultivos *Cucurbita pepo*, *Cucumis melo*, *Citrullus vulgaris* y *Carica papaya*).
4. Se determinó qué Virus de la Marchitez y necrosis apical del papayo PANV perteneciente al grupo de los Rhabdovirus, es el causante de una nueva enfermedad en el cultivo de papayo en México.

X. BIBLIOGRAFIA

- Adlerez, W.C. 1972. *Momordica charantia* as a source of Watermelon Mosaic Virus 1 for cucurbit crops in Palm beach County, Florida. Plant Disease Reporter, 56: 563-564.
- Adsuar, J. 1946. Studies on virus disease of papaya (*Carica papaya* L.) in Puerto Rico. 1. Transmission of papaya mosaic virus. Technical. Paper No. 1. University of Puerto Rico. Agricultural Experimental Station Rio Piedras, Puerto Rico. 10 pp.
- Adsuar, J. 1950. Studies on virus diseases of papaya (*Carica papaya* L.) mosaic in Puerto Rico. IV Preliminary studies on the host range of papaya mosaic. University of Puerto Rico. Agr. Experimental Station, Technical. Paper. No. 5. 5 pp.
- Adsuar, J. 1972. A new virus disease of papaya (*Carica papaya*) in Puerto Rico. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico, 56 (4): 397 402.
- Allen, T.C., McMorran, J.P., and Locatelli, E.A. 1983. Isolation of tomato spotted wilt virus from Hydrangea and four weed species, Plant Disease, 67: 429-431.
- Anderson, C.W. 1959. A study of field sources and spread of five viruses of peppers in central Florida. Phytopathology, 49: 97-101.
- Atreya, C.D., Raccah, B., and Pirone T.P. 1990. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmisibility of a potyvirus, Virology, 178: 161-165.
- Barnett, W.O. 1992. A summary of potyvirus taxonomy and definitions. Archives of Virology. (Supplement), 5: 435-444.
- Becerra, L.E.N. y Sánchez, M.J.R. 1985. Dinámica poblacional de áfidos, sus plantas hospederas y su influencia sobre las virosis que afectan el cultivo de papayo en dos Municipios del Estado de Veracruz. Memoria del XII Congreso Nacional de Fitopatología, 11-14 septiembre. Guanajuato, Guanajuato. Resumen 8.
- Becerra, L.E.N. 1987. Dinámica poblacional y hospederas de áfidos vectores del Virus de la mancha anular del papayo en Veracruz. Memoria del XIV Congreso Nacional de Fitopatología, 15-17 julio, Morelia, Michoacán. Resumen 11.
- Becerra, L.E.N. 1994. Manejo integrado del Virus de la mancha anular del papayo. Revista de la Universidad Cristóbal Colón, 11 (5): 17-27.
- Berger, P.H. 1992. The usefulness of aphid transmission as a taxonomic criterion for potyvirus. Archives of Virology (Supplement.), 5: 251-255.

- Brlansky, H.R. and Lee, F.R. 1990. Numbers of inclusion bodies produced by mild and severe strains of Citrus Tristeza Virus in seven citrus hosts. *Plant Disease*, 74: 297-299.
- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J. Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1rds) 'Plant Virus Online Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version 20th August 1996' URL. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>.
- Campbell, R.N. and Lin, M.T. 1972. Broccoli necrotic yellows virus. Descriptions of Plant Viruses No. 115. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologist. Kew Surrey, England. 4 p.
- Cárdenas, S.E. 1992. Caracterización de aislamientos del Virus Mancha anular del papayo, patogénesis y epidemiología de la enfermedad de la mancha anular del papayo en *Carica papaya* L. Tesis Doctor en Ciencias. C.P. Montecillos, Estado de México. 209 pp.
- Cárdenas, S. E., y Téliz, O.D. 1994. Caracterización de aislamientos del Virus de la Mancha Anular del Papayo. *Agrociencia. Serie Protección Vegetal*. 5 (1): 103-112.
- Conover, R.A. 1962. Virus diseases of the papaya in Florida. *Phytopathology*, 52: 6.
- Conover, R.A. 1964. Mild Mosaic and Faint Mottle Ringspot, two papaya virus diseases of minor importance in Florida. *Proceedings of the Florida State. Horticultural Society*, 77:444-448.
- Cook, A.A. 1972. Virus diseases of papaya. Florida. Agricultural. Experiment. Stations. Institute of Food and Agricultural Sciences. Technical. Bulletin, No. 750. 19 pp.
- Cook, A.A. and Milbrath, M.G. 1971. Virus disease of papaya on Oahu Hawaii and identification of additional diagnostic host plant. *Plant Disease. Reporter*, 55: 785-788.
- Cook, A.A. and Zettler, F.W. 1970. Susceptibility of papaya cultivars to Papaya Ringspot and Papaya Mosaic Viruses. *Plant Disease Reporter*, 54(10): 893 895.
- Corbett, M.K. and Sisler, H.D. 1964. *Plant Virology*. University of Florida Press. Gainesville. U.S.A. 527 pp.
- Costa, A.S. and Muller, G.W. 1980. Tristeza control by cross protection: AUS-Brasil Cooperative Success. *Plant Disease*, 64: 538-541.
- Chala, V.H., Harrison, C.W. and Halliwell, C.W. 1987. Identification of two distinct strains of watermelon mosaic virus 2 affecting cucurbits in Texas. *Plant Disease*, 71: 750-752.

- Chandrasrikul, A. and Patrakosol, P. 1986. Virus disease of horticultural crops in Thailandia. Plant Virus diseases of horticultural crops in the tropics and subtropics. 1986. FFTC Book Series No. 33. Taipei, Taiwan; Food and Fertilizer Technology Centre for the Asian and Pacific Region, 7-11 p.
- Cho, J.J., Mau, R.F.L., Gonsalves, D., and Mitchell, W.C. 1986. Reservoir weed hosts of Tomato Spotted Wilt Virus. *Plant Disease*, 70: 1014-1017.
- Christie, S.R., Christie, R.G. and Edwardson, J.R. 1974. Transmission of a bacilliform virus of sowthistle and *Bidens pilosa*. *Phytopathology*, 64: 840-845.
- Christie, R.G. and Edwardson, J.R. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Florida Agricultural Experiment Station Monography Series No. 9. 150 pp.
- Christie, R.S., Purcifull, E.D., Crawford, E.W. and Ahmed, A.N. 1987. Electron microscopy of negatively stained clarified viral concentrates obtained from small tissues samples with Appendices negative staining techniques. Bulletin 872. Agricultural Experimental Station. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida, Gainesville, Florida. U.S.A. 45 pp.
- Chu, P.W.G. and Francki, R.I.B. 1982. Detection of Lettuce Necrotic Yellow Virus by enzyme-linked immunosorbent assay in plant hosts and the insect vector. *Annals of Applied Biology*, 100: 149-156.
- Creamer, R. 1992. Purification and protein characterization of Sorghum Stunt Mosaic Rhabdovirus. *Phytopathology*, 82; 1473-1476.
- Davis, M.J., Kramer, J.B., Ferwerda, F.H., and Brunner, B.R. 1996. Association of a bacterium and not a phytoplasm with papaya bunchy top disease. *Phytopathology*, 86: 102-109.
- De Bokx, J.A. 1965. Host and electron microscopy of two papaya viruses. *Plant Disease Reporter*, 49: 742-746.
- Della, V.M.G.S., Camargo, A.L.E. & Rezende, M.J.A. 2003. Nucleotide sequence comparison of the capsid protein gene of severe and protective mild strains of Papaya Ringspot Virus. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 678-681.
- De León, M.J.R. y Becerra L.E.N. 1990. Identificación de vectores de virus en papayo. En: Memoria Tercera Reunión Anual del Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias del Estado de Veracruz. SARH-INIFAP., 145 pp.

- De los Santos, R. F., Becerra, L.E.N., Mosqueda, V.R., Vásquez, H.A., Vargas, G. A.B. 2000. Manual de producción de papaya en el estado de Veracruz. Folleto Técnico No. 17 2a. Edición. INIFAP-CIRGOC-CECOT. Ver., Ver. 87 pp.
- Díaz, B.V., Rodríguez, P.M. y Flores, E.E. 1982. Incidencia y cuantificación de daños ocasionados por el Virus de la Mancha anular del papayo en la región central del Estado de Veracruz. X Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Culiacán, Sinaloa 17 p.
- Duffus, J.E. 1964. Host relationships of Beet Western Yellows Virus strains. *Phytopathology*, 54: 736-738.
- Duffus, J.E. 1971. Role of weeds in the incidence of virus diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 319-340.
- Edwardson, J.R. and Christie, R.G. 1978. Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 16: 31-55.
- Faan, H.C. and Johnson, J. 1951. The overwintering of the Cucumber Mosaic Virus. *Phytopathology*, 41: 1001-1010.
- FAOSTAT. 2005. <http://faostat.fao.org/faostat/notes/citation.htm>. Última actualización febrero 2005.
- Fariñas, M.E. 1983 (a). Las enfermedades virales de la fruta bomba *Carica papaya*. Boletín de Reseñas. Cítricos y otros frutales. La Habana, Cuba. Centro de Información y Divulgación Agropecuario (CIDA). 60 p.
- Fariñas, M.E. 1983 (b). Pruebas de transmisión del Virus del Mosaico de la fruta bomba *Carica papaya* L., a *Jacaratia mexicana* A. DC. Ciencia y Técnica de la Agricultura. Serie Cítricos y otros Frutales, 6 (2): 143-147.
- Fariñas, M.E. 1990. Principales plagas y enfermedades que afectan el cultivo de papaya en Cuba. La Habana. Cuba. Centro de Información y Divulgación Agropecuario (CIDA). 32 p.
- Femi, L.A. 1980. Transmission and properties of viruses isolated from *Carica papaya* L., Nigeria Journal of Horticultural Science. 55: 191-197.
- Fos, A., Danet, J.L., Zreik, L., Garnier, M. and Bove, J.M. 1992. Use of a monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasma like organism in plants and insects and to identify a vector in France. *Plant Disease*, 76: 1092-1096
- Francki, R.I.B., Milne, R.G. and Hatta, T. 1987. Plant Rhabdoviridae. In: *Atlas of plant viruses*. Vol 1. C.R.C. Press. 73-99 pp.

- Gabrovska, I.T. y Valdivieso, S. 1967. Las enfermedades virosas de la fruta bomba (*Carica papaya L.*) en Cuba. Revista de Agricultura, 1: 1-21.
- García, G.B.M., 1987. Pruebas de transmisión por áfidos (Homoptera: Aphididae) del Virus de la Mancha Anular del Papayo (*Carica papaya L.*). Tesis de licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad Veracruzana, 73 p.
- Garza, L.J.G. 1976. Control de la diseminación del Virus en papaya (*Carica papaya*). Adelantos de la Investigación No. 1. Campo Agrícola Experimental de Tecomán. C.I.A.B.I.N.I.A.-S.A.G. 1 p.
- Gera, A., Loebenstein, G and Raccah, B. 1979. Protein coats of two strains of Cucumber Mosaic Virus affect transmission by *Aphis gossypii*. *Phytopathology*, 69: 396-399.
- Gibbs, A., and Harrison, B. 1976. Variation, strains and classification. In: *Plant Virology. The Principles*. John Wiley & Sons. NY. U.S.A. 159-182 p.
- Gonsalves, D. and Ishii, M. 1980. Purification and serology of Papaya Ringspot Virus. *Phytopathology*, 70: 1028-1032.
- Gonsalves, D. and Trujillo, E.E. 1986. Tomato Spotted Wilt Virus in papaya and detection of the virus by ELISA. *Plant Disease*, 70: 501-506.
- Gonsalves, D. and Garnsey, S.M. 1989. Cross-protection techniques for control of plant virus diseases in the tropics. *Plant Disease*, 73: 592-597.
- González, G., Mejías, Y., y Rodríguez, D. 1988. Virus de la Mancha Anular de la fruta bomba (Papaya Ringspot Virus) en Cuba. *Ciencia y Técnica en Agricultura. Serie Protección de Plantas*, 11: 17-31.
- Greber, R.S. 1966. Identification of the virus causing Papaw Yellow Crinkle with Tomato Big Bud Virus by transmission test. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 23 (2): 147-153.
- Hammond, J. 1992. Potyvirus serology, sequences and biology. *Archives of Virology (Supplement)*, 5: 123-138.
- Haque, S.Q., and Parasram, S. 1973. *Empoasca stevensi*, a new vector of bunchy top disease of papaya. *Plant Disease Reporter*, 57: 412-413.
- Hema, M.V. and Prasad, D.T. 2004. Comparison of the coat protein of a south Indian strain of PRSV with other strains from different geographical locations. *Journal of Plant Pathology*, 86: 35-42.
- Hernández, P.R. 1994. Estudio sobre el Virus de la Mancha Anular de la fruta bomba (*Carica papaya L.*), señalización de vectores, control e integración con otras

- medidas sanitarias. Tesis Doctor Universidad Central de las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Instituto de Biotecnología de las plantas, Villa Clara, Cuba, 143 pp.
- Hine, R.B., Holtzman, O.V. and Raabe, R.D. 1965. Disease of papaya (*Carica papaya* L.) in Honolulu, Hawaii. Bulletin 136. Hawaii Agricultural Experiment Station. College of Tropical Agriculture. University of Hawaii. 26 pp.
- Hollings, M and Brunt, A.A. 1981. Potyvirus Group. In: Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists. Descriptions of Plant viruses No. 245. 7 pp.
- Holmes, O.F., Hendrix, W.J., Ikeda, W., Jensen, D.D., Lindner, C.R. and Storey, B.W. 1948. Ringspot of papaya (*Carica papaya*) in the Hawaiian Islands. *Phytopathology*, 38: 310-312.
- Hull, R. 1970. Studies on Alfalfa Mosaic Virus IV an unusual strain. *Virology*, 42: 283-292.
- (<http://www.virustaxonomyonline.com/virtax/1pext.dll/vtax/in10?fn=document-frame.htm>)
- ICTV. 2005. Virus Taxonomy. Clasification and Nomenclature of Virus. Eighth Report of International Committee on the Taxonomu of Viruses (ICTV). Ed. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A. Elsevier Academic Press, 1259 pp.
- Ishii, M. and Holtzman, V.O. 1963. Papayo mosaic in Hawaii. *Plant Disease Reporter*, 47 (11): 947-951.
- Ishii, M. 1972. Observations on the spread of Papaya Ringspot Virus in Hawaii. *Plant Disease Reporter*, 56: 331-333.
- Ivancheva, G.T., Valdivieso, A.S., Bécquer, A., y Sáenz, B. 1967. Las enfermedades virosas de la fruta bomba (*Carica papaya* L.) en Cuba. *Revista de Agricultura*, 1: 1-21.
- Jackson, A.O. and Christie, S.R. 1979. Sonchus Yellows Net Virus. Descriptions of Plant Viruses No. 115. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologist. Kew Surrey, England. 5 p.
- Jensen, D.D. 1949. Papaya virus diseases with special reference to papaya ringspot. *Phytopathology*, 39: 191-211.
- Johnson, R.R., Black, I.L., Hobbs, H.A., Valverde, R.A., Story, R.N. and Bond, W.P. 1995. Association of *Frankliniella fusca* and three winter weeds with Tomato Spotted Wilt Virus in Louisiana. *Plant Disease*, 79: 572-576.

- Jones, G.E. y Dawson, W.O. 1987. Genética y evolución de virus fitopatógenos de ARN. En: Temas en Virología II. Alvizo V.H.F. y Lozoya S.H. Eds. Sociedad Mexicana de Fitopatología. 21-30 p.
- Kitajima, E.W., Mattos, J.K.A., Parente, T.V., Marinho, V.L.A., Sa, P.B. de. 1987. Ocorrencia do virus do mosaico do mamoeiro (Papaya Ringspot Virus) no Distrito federal. Fitopatología Brasileira, 12: 106-108.
- Kulkarni, H.Y. and Sheffield, F.M.L. 1968. Interim report on virus of pawpaw in East Africa. East African Agricultural and Forestry Journal, 33: 323-324.
- Kuhn, C.W. and Wyatt, S.D. 1979. A variant of Cowpea Chlorotic Mottle Virus obtained by passage through beans. Phytopathology, 69: 621-624.
- Lastra, R. and Quintero, E. 1981. Papaya apical necrosis a new disease associated with a rhabdovirus. Plant Disease, 65: 439-440.
- Lima, A.R.C., Lima, A.J.A., Souza, T.M.Jr., Pio-Ribeiro, G & Andrade, P.G. 2001. Etiología e estratégias de controle de vírus do mamoeiro no Brasil. Fitopatología Brasileira, 26 (4): 689-702.
- Lin, C.C., Su, H.j. and Wang, D.N. 1989. The control of Papaya Ringspot Virus in Taiwan. Technical Bulletin ASPAC Food and Fertilizer Technology Center, 114: 1-13.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., and Dougherty W.G. 1993. Pathogen derived resistance to potyvirus: working, but why?. Seminars Virology, 4: 369-379.
- López, P.O. 1972. Identificación de las virosis de la lechosa (*Carica papaya* L.) en Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía. (Maracay, Venezuela), 6 (4): 5-36.
- Lozoya, S.H. 1987. Taxonomía de virus fitopatógenos. En: Alvizo, V.H.F. y Lozoya, S.H. Temas en Virología II. Sociedad Mexicana de Fitopatología., 31-63 pp.
- Martelli, G.P. and Russo, M. 1973. Eggplant Mottled Dwarf Virus. Descriptions of Plant Viruses No. 115. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologist. Kew Surrey, England. 4 p.
- Marys, E., Carballo, O. and Izaguirre-Mayoral, L.M. 1995. Properties of a previously undescribed supercoiled filamentous virus infecting papaya in Venezuela. Archives of Virology, 140: 891-898.
- Matthews, R.E.F. 1970. Plant Virology. Academic Press. New York. U.S.A. 778 pp.
- McDonald, J.G. and Kristjansson, G.T. 1993. Properties of strains of Potato Virus YN in North America. Plant Disease, 77: 87-89.

- Mejías, Y., Rodríguez, D. y González, G. 1987. Rhabdovirus asociado a síntomas de necrosis apical en fruta bomba *Carica papaya* en Cuba. Ciencia Técnica Agrícola. (Serie Protección de plantas), 10: 57-62.
- Mora, G., Téliz, D., Durán, F. y Ávila, C. 1987. Incidencia de la Mancha Anular del Papayo en Veracruz. Memoria del XIV Congreso Nacional de Fitopatología, 15-17 julio Morelia Michoacán. Resumen 10.
- Morton, J.F. 1987. Papaya. In: Fruits of warm climates. Creative Resources Systems, Inc. 336-346 p.
- Naylor, A.G. 1965. Control of Papaw Bunchy top-Virus-disease in Jamaica. American Society Horticultural Science Caribe Region Proceedings. 13 th. Annual Meeting, 9: 30-37.
- Noa-Carrazana, J.C., Ruíz-Castro, S., Tovar-Cortés, R. y Silva-Rosales, L. 2001. Estudio de enfermedades virales en plantaciones de papayo en México. Memorias del Congreso Nacional de Fitopatología. 15-18 de julio. Querétaro, Qro. Resumen F-159.
- Ochoa, de F. M. y Galindo, A.J. 1975. Mancha anular de la papaya *Carica papaya*. En: Avances de la Enseñanza e Investigación. Colegio de Postgraduados, Chapingo 90 p.
- Ochoa, de F. M. y Galindo, A.J. 1976. Virosis del papayo en México. En: Avances en la Enseñanza y la Investigación. Colegio de Postgraduados. 100-101.
- Ochoa, de F. M. y Galindo, A.J. 1977. Virosis del papayo (*Carica papaya* L.) en México. En Resúmenes del VII Congreso Nacional de Fitopatología. México, D.F. 37 p.
- Opina, O.S. 1986. Studies on a new virus disease of papaya in the Philippines. Plant Virus diseases of horticultural crops in the tropics and subtropics. In: FFTC Book Series No.33. Taipei, Taiwan; Food and Fertilizer Technology Centre for the Asian and Pacific Region. 157-168 p.
- Ortiz-García, C. F. 1999. Incidencia de la mancha anular del papayo en Tabasco, México. Memorias del congreso Nacional de Fitopatología 9-13 julio Puerto Vallarta, Jalisco. Resumen C-18.
- Ortiz-García, C.F. y Saldaña-Hernández, M.I. 2001. Comunicación personal.
- Peters, D. 1971. Sowthistle Yellow Vein Virus. Descriptions of Plant Viruses No. 62. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologist. Kew Surrey, England. 4 p.

- Peters, D. 1981. Plant Rhabdovirus group. Descriptions of Plant Viruses No. 244. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologist. Kew Surrey, England. 6 p.
- Peters, D. and Kitajima, E.W. 1970. Purification and electron microscopy of Sowthistle Yellow Vein Virus. *Virology*, 41: 135-150.
- Pontis-Videla. R.E. 1953. Las virosis de la lechosa (*Carica papaya* L.) en Venezuela. 1. Transmisión del Mosaico. *Agronomía Tropical*, 2: 241-251.
- Purcifull, D.E. and Hiebert, E. 1979. Serological distinction of Watermelon Mosaic Virus isolates. *Phytopathology*, 69: 112.116.
- Purcifull, D., Gonsalves, D., Edwardson, J. and Hiebert, E. 1984. Papaya Ringspot Virus. Descriptions of Plant Viruses No. 292. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologist. Kew Surrey, England. 8 p.
- Quiot-Douine, L., Purcifull,, D.E., Hiebert, E., and Mejía, M.V.G. 1986. Serological relationships and In Vitro translation of an antigenically distinct strain of papaya Ringspot Virus. *Phytopathology*, 76 : 346-351.
- Quiot-Douine, L. Lecoq, H., Quiot, J.B., Pitrat, M., and Labonne, G. 1990. Serological and biological variability of virus isolates related to strains of Papaya Ringspot Virus. *Phytopathology*, 80: 256-263.
- Raccah, B., Bar-Joseph, M. and Loebenstein, G. 1978. The role of aphid vectors and variation in virus isolates in the epidemiology of tristeza disease. *Plant Disease Epidemiology*: 221-227.
- Rajapakse, R.H.S. and Herath, H.M.W. 1981. Vectors of the papaya virus in Sri Lanka. *Beitrage trop. Landwirtsch Veterinarmed*, 19(3): 359 361.
- Ramos, N.F., Lima, J.A.A. y Goncalves, M.F.B. 2003. Symptoms of potyvirus interactions on melon hybrids, watermelon varieties and zucchini. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 199-204.
- Reddy, R.S., Cheema, S.S. and Dhillon, R.S. 1987. Studies on papaya mosaic virus (PaMV) symptomatology and incidence. *Punjab Horticultural Journal*, 27: 73-75.
- Regenmortel, Van. M.H.V. 1992. What is a virus. *Archives of Virology*. (Suppl. 5): 47-53.
- Rist, D.L. and Lorbeer, J.W. 1989. Occurrence and overwintering of Cucumber Mosaic Virus and Broad Bean Wilt Virus in weeds growing near commercial lettuce fields in New York. *Phytopathology*, 79: 65-69.

- Rist, D.L. and Lorbeer, J.W. 1991. Relationships of weed reservoirs of Cucumber Mosaic Virus (CMV) and Broad Bean Wilt Virus (BBWV) to CMV and BBWV in commercial lettuce fields in New York. *Phytopathology*, 81: 367-371.
- Rochow, W.F. 1967. Predominating strains of Barley Yellow Dwarf Virus in New York; changes during ten years. *Plant Disease Reporter*, 51: 195-199.
- Rodríguez, E.J.G. 1994. Distribución de las virosis del papayo en México. Tesis para Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Estado de México. 84 p.
- Sánchez, M.V., Agüero, R., y Rivera, C. 1998. Plantas hospederas de los virus más importantes que infectan el melón, *Cucumis melo* (Cucurbitaceae) en Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 46: 13-25.
- SIAP. 2003. Centro de Estadísticas Agropecuarias (C.E.A.). Sistema de Información Agropecuaria de Consulta SIACON Versión 1.1 (CD).
- Simmonds, J.H. 1965. Papaw diseases. *Queensland Agricultural Journal*, 91: 666 667.
- Sinha, R.C. and Behki, R.M. 1972. American Wheat Striate Mosaic Virus. Descriptions of Plant Viruses No. 99. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologist. Kew Surrey, England. 4 p.
- Singh, P.B., Srivastava, M.K., Gupta, P.R. and Abidi, H.S.M. 1978. Possible role of alternate host in natural spread of Papaya Leaf Curl Virus to *Carica papaya*. *Indian Journal of Microbiology*, 18: 188-189.
- Story, G.E. and Halliwell, R.S. 1969. Identification of Distortion Ringspot Virus disease of papaya in the Dominican Republic. *Plant Disease Reporter*, 53(9): 757 760.
- Shukla, D.D. and Ward C.W. 1989 Structure of potyvirus coat proteins and its applications in the taxonomy of the potyvirus group. *Advances of Virus Research*, 36: 273-314.
- Téliz, O.D., Mora, A.G., Gonsalves, D., Avila, C. y Durán, F. 1987. Intento de control de la mancha anular del papayo en Veracruz mediante protección cruzada. *Memorias del XIV Cong. Mex. de Fitopatología*. Morelia, Michoacán. 118 p.
- Téliz, O.D., Mora, A.G., Nieto, A.D., Gonsalves, D., García, E., Matheis, L. y Ávila, C. 1991. La mancha anular del papayo en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 9: 64-68.
- Tennant, P.F., Gonsalves, C., Ling, K.S., Fitch, M., Manshardt, R., Slightom, J.L. and Gonsalves D. 1994. Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein transgenic papaya and clasically cross-protected papaya. *Phytopathology*, 84: 1359-1366.

- Tomlinson, J.A., Carter, A.L., Dale, W.T., Simpson, C.J. 1970. Weed plants as source of Cucumber mosaic Virus. *Annuals Applied. Biologist*, 66: 11-16.
- Treviño, M.H. 1980. Informe de prácticas profesionales realizadas en el CAECOT sobre incidencia de virosis en papayo. *Fruticultura. CAECOT-INIA*. 20p.
- Trujillo, E.D. and Gonsalves, D. 1967. Tomato Spot Wilt in papayo (abstract). *Phytopathology*, 57: 6.
- Vance, V.B., Berger, P.H., Carrington, J.C., Hunt, A.G. and Shi, X.M. 1995. 5' proximal potyviral sequence mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology*, 206: 583-590.
- Vegas, G.A., Trujillo, P.G. y Cermeli, M. 1985. Importancia, distribución e incidencia de los virus que afectan la lechosa (*Carica papaya L.*), en algunas zonas productoras, del país. *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)*, XIV (1-2): 213-237.
- Vegas, A., González, A., Trujillo, G., y Pino, I. 1998. Dificultades en el diagnóstico serológico de cepas atenuadas del virus de la mancha anillada de la lechosa. *Fitopatología Venezolana*, 11: 40-44.
- Wan, S.H. and Conover, R.A. 1981. A rhabdovirus associated with a new disease of Florida papayas. *Proceedings of Florida State Horticultural Society*, 94: 318-321.
- Wan, S.H.. and Conover, R.A. 1983. Incidence and distribution of papaya viruses in southern Florida. *Plant Disease*, 67: 353-356
- Wang, C.H., Bau, H.J. and Yeh, S.D. 1994. Comparison of the nuclear inclusion b protein and coat protein genes of five Papaya Ringspot Virus strains distinct in geographic origin and pathogenicity. *Phytopathology*, 84: 1205-1210.
- Wellman, L.F. 1937. Control of southern celery mosaic in Florida by removing weeds that serve as source of mosaic infection. *Technical Bulletin: No. 548. U.S.D.A.* 16 p.
- Wolcott, N.G. 1928. Increase of insect transmitted plant disease and insect damage through weed destruction in tropical agriculture. *Ecology*, 9: 461-466.
- Yeh, S-D., and Gonsalves, D. 1984. Evaluation of induced mutants of Papaya Ringspot Virus for control by cross protection. *Phytopathology*, 74: 1086-1091.
- Yeh S., Gonsalves, D., Provvidenti, R. 1984. Comparative studies on host range and serology of Papaya Ringspot Virus and Watermelon Mosaic Virus 1. *Phytopathology*, 74: 1081-1085.

Yeh, S.D., Gonsalves, D., Wang, L.H., Namba, R. and Chiu, J.R. 1988. Control of Papaya Ringspot Virus by cross protection Plant Disease, 72: 375-380.

Zettler W.F. and Wan S.H. 1994. Papaya droopy necrosis and papaya apical necrosis: In: Plotz, R.C., Zentmeyer, G.A., Nishijima, W.T., Rohrbach, K.G. and Ohr, H.D. (Eds.) Compendium of Tropical Fruit Diseases. APS. St. Paul Minnesota U.S.A. 66-67pp.

APÉNDICES

A. PROCEDIMIENTO DE ELISA.

- 1.- Por medio de una micropipeta se añadieron 100 microlitros del anticuerpo de cubrimiento a cada pozo de la placa de ELISA que se utilizo. La placa se incubó en cámara húmeda 4 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C en el refrigerador.
- 2.- Se tiró el contenido de la placa y se lavo cada pozo con el amortiguador de lavado PBST, inundando completamente cada pozo, en tres ocasiones.
- 3.- Se añadieron 100 microlitros del macerado de cada una de las muestras vegetales a probar, estás se obtuvieron al macerar un gramo de tejido en un mortero agregando lentamente al ir moliendo diez mililitros de amortiguador de extracción, posteriormente se realizó una dilución tomando un mililitro del extracto y se colocó en nueve mililitros del mismo buffer . Las placas se incubaron por dos horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C en el refrigerador.
- 4.- Se vació el contenido de la placa y se lavó con PBST cuatro veces.
- 5.- Se añadieron 100 microlitros de la enzima conjugada a cada uno de los pozos. El conjugado es preparado en amortiguador de conjugado, después se incuba por 2 horas a temperatura ambiente.
- 6.- Se lavó nuevamente como en el paso 4.
- 7.- Después se añadieron 100 microlitros de la solución de PNP (Para Fenil Fosfato) substrato de la enzima (1 miligramo/mililitro) a cada uno de los pozos y se incubó a temperatura ambiente por 30-60 minutos o más (lo bastante para observar la reacción). El resultado se observó visualmente y se midió la absorbancia en un lector de ELISA a 405 nm, una reacción positiva dará una coloración amarilla intensa.

B. DESCRIPCIÓN DE RHABDOVIRUS.

Virus de la Redecilla amarilla del Sonchus ocurre naturalmente en ciertas malezas de la familia Compositae incluyendo *Bidens pilosa*, *Sonchus oleraceus* (cardo) y *Senecio glaubellus*. Todos los hospederos encontrados en la naturaleza tienen también infección del Virus del moteado de *Bidens*, estas plantas muestran varios grados de enanismo junto con necrosis venal y amarillamiento de hojas. El virus es transmitido por el áfido *A. coreopsis* el cual coloniza *B. pilosa*, además por inoculación mecánica de extractos de plantas que contienen un agente reductor. No se transmite por los áfidos *Hyperomyzus lactucae* o *Dactanotus* sp, ambos de los cuales colonizan *S. oleraceus*. Transmisión a través de semilla no se ha detectado en *S. oleraceus*. La infectividad del Virus de la red amarilla de *Sonchus* es rápidamente perdida a menos que el tejido foliar sea molido en la presencia de un agente reductor como sulfito de sodio 0.5%, con este la infectividad de extractos de hoja es mantenida por menos de 8 horas a 20° C pero por más de 48 horas a 41° C. El punto final de dilución es de 10-3 a 10-4. Muchas partículas están presentes en el núcleo o espacio perinuclear y unas pocas partículas son encontradas en el citoplasma de las células de las plantas (Jackson y Christie, 1979).

Virus de la Vena Amarilla del Cardo tiene un rango estrecho de hospederos es transmitido por el áfido *Hyperomyzus lactucae* de una manera persistente; a 25° C el virus tiene un período mínimo de incubación en el vector de cerca de 8 días. No es transmisible por inoculación de savia y no se encontró transmisión por semilla en *Sonchus oleraceus*. La infectividad de la suspensión purificada de virus es retenida por varios días a 21° C. En preparaciones fijadas con glutaraldehido previo a la tinción con fosfotungstato o acetato de uranilo, las partículas son baciliformes de 230 nm de longitud y 100 nm de ancho. Cuando la fijación es omitida las partículas son de forma de bala y 180 nm de largo (Peters, 1971).

Virus del Amarillamiento necrótico del brócoli tiene un rango estrecho de hospederos y es transmitido por áfidos, pero con dificultad con inoculación de savia. Algunos autores reportan no transmisión con *M. persicae* y *Brevicoryne brassicae*; sin embargo otros si lo hacen con el último áfido. No se encontró transmisión por semilla en *Datura stramonium*. Las partículas son baciliformes en acetato de uranilo y miden 275X75 nm; en fosfotungstato de potasio son vistas ocasionalmente partículas baciliformes pero muchas partículas son de forma de bala y miden 266X66 nm. La forma semejante a bala es relacionada como un artificio de la tinción. Partículas del virus son encerradas en una membrana limitada o saco en el citoplasma de las células del parénquima. Éstos sacos se forman por el retículo endoplásmico, y el estado final de ensamblaje del virus ocurre cuando la partícula incompleta pasa a través de la membrana dentro del lumen (cavidad) del saco. En células que contienen virus, las mitocondrias se hinchan. Transmisión mecánica a *Datura stramonium* y la expresión de síntomas, fueron erráticas en los invernaderos en el verano. Esto parece ser debido a la alta intensidad de luz y/o temperatura alta (21-35° C) [Cambell y Lin, 1972].

Virus del Mosaico estriado del trigo americano tiene un rango estrecho de hospederos, es transmitido por dos especies de chicharritas de manera persistente, no es transmisible por inoculación de savia. Los saltahojas *Endria inimica* y *Elmyana virescens*; *E. inimica* y *Elmyana virescens* son eficientes vectores, el período mínimo de incubación es cerca de 15 días. Todos los instares pueden adquirir e inocular el virus, el mínimo y máximo período de incubación es de 4 y 24 días respectivamente. El virus puede ser inoculado en cerca de 15 minutos por algunos insectos virulíferos. Muchos insectos continúan la transmisión del virus por varias semanas pero algunos cesan de hacerlo después de 5 semanas. No se transmite a la progenie de los insectos. La transmisión a través de semilla es rara o nula. Las partículas son fácilmente rotas si no son previamente fijadas con glutaraldehido durante la extracción de tejido o cuando se montan en fosfotungstato para el microscopio (Sinha y Behki, 1972).

El Virus del Enanismo moteado de la berenjena es transmitido por injerto e inoculación de savia. En secciones de tejido las partículas inmaduras, las que aún están conectadas a la envoltura nuclear, son de forma de bala, pero las maduras son baciliformes y miden 220X66 nm. Partículas son presentes en los tejidos del parénquima de la hoja, en todas las partes de las flores excepto estambres, y en el pericarpio del fruto; también pueden encontrarse en las células del parénquima del floema, pero no en tubos maduros y elementos de las traqueidas. El vector (probablemente aéreo) no es conocido, transmisiones con *M. persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* y la chicharrita *Laodelphax striatellus* no fueron efectivas (Martelli y Russo, 1973).