



2
2ej
00341

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de la Distribución de las Inclusiones Citoplásmicas Inducidas
por el PRV, en Células Epidérmicas y Subepidérmicas del
Pericarpio, en la Mancha Anular del Fruto de Papaya
(*Carica papaya* L) Infectado.

H. Matos
132202

T E S I S I N A

Que para obtener el Diploma de:

**ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRONICA
APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A

MARIA DE LOURDES SEGURA VALDEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. Breve descripción de los aspectos botánicos y agronómicos de la planta	2
2. Histología del fruto	4
3. El virus de la mancha anular de la papaya (PRV)	5
a). Las partículas virales	10
b). Inclusiones citoplásmicas	12
c). Transmisión de la enfermedad	13
d). Morfogénesis de la partícula viral	16
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	19
V. MATERIAL Y MÉTODO	20
VI. RESULTADOS	26
VII. DISCUSIÓN	42
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. REFERENCIAS	50
X. APÉNDICE	57
1. Descripción botánica de <i>Carica papaya</i> L.	57
2. Fotosíntesis y Fotorrespiración	61

I. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es el de conocer la distribución de las inclusiones citoplásmicas inducidas por el virus de la mancha anular (PRV), en las células epidérmicas y subepidérmicas del pericarpio de papaya (*Carica papaya* L.), correlacionándola con la distribución de los anillos de la mancha anular.

La mancha anular en el fruto se dividió en cuatro zonas. Los fragmentos de los frutos de papayas infectadas fueron tomados en una huerta en producción en el estado de Veracruz y fijados con glutaraldehído al 6.5%, postfijados en tetróxido de osmio al 1% e incluidos en una resina epóxica. Los cortes ultrafinos fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión, trabajando a 80 KV.

Se observaron inclusiones citoplásmicas en células epidérmicas y subepidérmicas en tres zonas de la mancha anular de papayas infectadas. La zona 4 sólo muestra estructuras que interpretamos como partículas virales y que están presentes también en las otras zonas. Asimismo, fué claro un engrosamiento de la cutícula y una deformación moderada de los cloroplastos. La presencia de peroxisomas también fué mayor que en células normales.

Esta es la primera demostración de la presencia de las inclusiones citoplásmicas en el pericarpio de frutos de papaya. Se sugiere que la presencia de peroxisomas indica que una de las vías que los virus podrían estar utilizando para obtener los aminoácidos que requieren, es la desviación de la ruta metabólica fotosintética hacia la fotorrespiración, lo que explicaría en parte la disminución del contenido de carbohidratos y el aumento de aminoácidos publicado por otros autores. La ausencia de inclusiones en la zona 4 sugiere una distribución centrífuga del virus, del punto de infección hacia las células laterales, vía los plasmodesmos. Se discuten las implicaciones sobre la diagnosis temprana de la enfermedad. La presencia de inclusiones citoplásmicas no determina el patrón anular de la mancha en el fruto, el cual podría depender de los cloroplastos.

II. INTRODUCCIÓN

1. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS ASPECTOS BOTÁNICOS Y AGRONÓMICOS DE LA PLANTA

La especie *Carica papaya* L. es una dicotiledónea que se ubica taxonómicamente en la familia Caricaceae. Dentro de la familia, es la especie de mayor importancia económica. Debido a la gran adaptación de la planta y a la amplia aceptación de la fruta, ofrece prometedoras consideraciones tanto para los mercados locales como para la exportación. Como el plátano, la piña y el mango, la papaya es uno de los cultivos más importantes y redituables de los trópicos y subtrópicos (González, 1984; Yeh et al., 1988). De acuerdo con Cronquist (1988) su ubicación taxonómica es la siguiente:

DIVISIÓN: Angiospermae

CLASE: Magnoliopsida

SUBCLASE: Dilleniidae

ORDEN: Violales

FAMILIA: Caricaceae

GÉNERO: *Carica*

ESPECIE: *C. papaya* L.

El cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) es uno de los más desarrollados y con mayor valor económico en los trópicos y

subtrópicos del mundo. Se le encuentra en Hawaii, Malaya, Burma, Ceylán, India, Sud-Africa, Tangañika, Kenya, Filipinas, Cuba, Jamaica, Puerto Rico, Panamá, Trinidad y México (Yeh *et al.*, 1988; CAECOT, 1979).

En México, se le localiza en más de la mitad de los estados del Territorio Nacional (Baja California, Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán, siendo Veracruz el estado productor más importante (CAECOT, 1979). En 1983, el Campo Experimental Cotaxtla (CAECOT, 1983) y Mandujano (1980), mencionaban que el 80% de la superficie total se concentraba en los estados de Veracruz, Guerrero y Jalisco, siendo Veracruz el más importante, ya que le correspondía el 55% de la superficie y el 63% de la producción total. Para 1988 CONAFRUT registra que el 82.3% de la superficie total le correspondía a Veracruz, Guerrero y Oaxaca, pero en Veracruz sólo se representa el 38.7% de la superficie y el 36.3% de la producción.

Carica papaya (L.) es originaria de América Tropical, probablemente del Sur de México o de América Central, sin que se conozca aún en estado silvestre (Storey, 1976; González, 1984).

Del látex se extraen enzimas proteolíticas industriales; éstas y su derivado seco proteolítico, la papaína, tienen numerosas aplicaciones (Apéndice I) (Moreno, 1980).

La planta es un arbusto o árbol, monoico o dioico, con el follaje densamente concentrado en el ápice. La papaya cultivada presenta frecuentemente una gran variedad de tipos florales hermafroditas, además de las flores femeninas y masculinas típicas. El fruto es una baya, amarilla o anaranjada, variablemente ovoide, con semillas elipsoides, numerosas, que presentan sarcotesta mucilaginoso y endotesta morena y arrugada. (Apéndice I) (Moreno, 1980).

2. HISTOLOGÍA DEL FRUTO

En el pericarpio del fruto adulto se distinguen las siguientes partes (Roth y Clausnitzer, 1943): la epidermis externa, en la cual las células son pequeñas y sus membranas externas están tangencialmente ensanchadas. Debajo de la epidermis externa se hallan varias capas de células pequeñas, también ensanchadas tangencialmente (aproximadamente de 5 a 10 capas). Hacia adentro aumenta el tamaño de las células, éstas se redondean y dejan espacios intercelulares más grandes entre sí. Hacia la parte central, las células parenquimáticas contienen muchos cloroplastos de forma alargada (forma de látigo). La parte interna del pericarpio está cubierta por varias capas de tejido

esponjoso con grandes espacios intercelulares; las células de esta zona están muy alargadas tangencialmente, formando brazos en varias direcciones. La epidermis interna no se reconoce en el estado maduro del fruto.

3. EL VIRUS DE LA MANCHA ANULAR DE LA PAPAYA (PRV)

La enfermedad causada por el virus de la mancha anular de la papaya (PRV, Papaya Ringspot Virus) es destructiva y representa el mayor obstáculo para realizar plantaciones a gran escala. El PRV está reportado como el factor limitante más importante para los productores de Hawaii, Florida, Caribe, Ciudades de Sur América, Africa, Australia y el lejano Oriente (Story, 1969; Yeh *et al.* 1988).

En Brasil, Barbosa y Paguio (1982) encontraron que la incidencia podía incluso exceder el 90%, dependiendo de la población de áfidos y que las pérdidas de cosecha de plantas infectadas fué de cerca del 70%.

En México, en años recientes, el PRV, se ha considerado como la principal limitante en la producción de este cultivo a nivel nacional. Esta enfermedad ha ocasionado daños tan severos que ha hecho desaparecer a este frutal de muchas zonas productoras del

país, sin que hasta el momento se tenga conocimiento de variedades o tipos de papaya que presenten resistencia o una tolerancia adecuada a esta enfermedad (CRECIDATH, 1980)

La sintomatología de la enfermedad es variable y depende del estado de infección, vigor de la planta, de la temperatura y de la cepa del virus y tamaño de la planta; pero en general se puede caracterizar por la presencia de manchas cloróticas en las hojas en forma de mosaico, acortamiento de los peciolo, presencia de manchas de aspecto aceitoso o acuoso, de forma alargada en peciolo y tallo; y principalmente por la presencia de manchas en forma de anillos concéntricos de color verde o café oscuro sobre el fruto, lo que le dá el nombre a la enfermedad. El sabor, forma y tamaño de los frutos se ven afectados considerablemente y en estados avanzados la lámina foliar se reduce tomando un aspecto filiforme (Fariñas, 1983).

Las primeras interpretaciones de los efectos fisiológicos provocados por una infección viral en hojas son dos: (i) una que considera una alteración en los cloroplastos, que se manifiesta como un daño que culmina con su desintegración. Otra (ii), que considera que los primeros efectos de la infección viral no involucran directamente a los cloroplastos. De acuerdo con esta segunda idea, la infección viral podía comenzar con una reducción del número de los cloroplastos, pero esto no causaba mayor cambio en su actividad fotosintética. Sin embargo, la actividad del

cloroplasto podía ser alterada en estados avanzados de la enfermedad, pero tales cambios eran un resultado más que una primera causa (Magyarosy, *et al.*, 1973).

En investigaciones más recientes, de carácter bioquímico (Magyarosy *et al.*, 1973), se han aportado evidencias de que la infección viral sistémica hace disminuir la tasa fotosintética en hojas y la de fotofosforilación en cloroplastos aislados. Sin embargo, estos trabajos no aportan evidencias sobre si esta disminución de la actividad de los cloroplastos se debe a un primer efecto o es el resultado de una declinación general de la actividad metabólica de la hoja infectada .

Magyarosy *et al.* (1973) llevaron a cabo un trabajo sobre el efecto de la infección de un virus sistémico (el virus del mosaico de la calabaza) sobre la función y la estructura de los cloroplastos. Ellos encontraron que la infección afecta las reacciones del citoplasma de la célula, pero no tiene efecto directo sobre la actividad fotosintética o la ultraestructura de los cloroplastos. Con respecto al efecto sobre el citoplasma de las células infectadas, observaron una desviación de los productos de azúcares a aminoácidos y ácidos orgánicos, un incremento de los ribosomas citoplásmicos y un menor número de cloroplastos. Concluyen que el mecanismo por el cual el virus ejerce su efecto en el citoplasma es directo sobre la capacidad

biosintética de la hoja, provocando un cambio hacia la síntesis de aminoácidos, aunque el mecanismo en sí se desconoce.

El descubrimiento de la Mancha Anular en Papaya fué publicado en 1945 por Lindner *et al.* En trabajos posteriores, Jensen (1946-1947) demuestra la naturaleza viral de la enfermedad, su período de incubación y que los áfidos eran capaces de transmitir el virus. Las especies de áfidos que él menciona son *Mysus persicae* Sulzer y tres especies (no determinadas en ese entonces) del género *Aphis* (Jensen, 1949).

La morfología de la partícula viral, la transmisibilidad por áfidos, las relaciones serológicas y la capacidad para inducir inclusiones tipo "pinwheel" en las células hospederas, son las características consideradas para ubicar al PRV en el grupo de los Potyvirus (Purcifull *et al.*, 1984).

El PRV se divide en dos tipos principales que están serológicamente muy relacionados: Tipo P (que infecta papaya) que aislado, además de causar la enfermedad en papaya, puede hacerlo también en cucurbitáceas. Tipo W (Virus del Mosaico de la Sandía WMV-1) que causa una importante enfermedad en la sandía y otras cucurbitáceas pero no infecta papaya. Ambos tipos aislados son antigénicamente indistinguibles y debido a sus similitudes citológicas y biológicas se justifica su agrupación bajo el

nombre de Virus de la Mancha Anular sugerido por Lovisolo en 1980 (Purcifull *et al.*, 1984).

Chen (1984), en un trabajo realizado en Taiwán sobre observaciones al microscopio electrónico de hojas infectadas por el PRV, encontró mediante tinción negativa que las partículas filamentosas median entre 700 y 750 nm de longitud; en cortes ultrafinos observó inclusiones en forma de "rehilete" ("pinwheel"), tubulares y pequeños agregados laminares. El concluyó que el PRV pertenece a la subdivisión III del grupo de los potyvirus.

El PRV tiene la siguiente ubicación taxonómica:

GRUPO: Potyvirus. Criptograma: [R/1:3.0-3.5:E/E:S/Ve/Ap]
5-6

SUBDIVISIÓN: III

TIPO: P

NOMBRE: Papaya Ringspot Virus (PRV). R/1:*/#:E/E:S/Ve/Ap
(Virus de la mancha anular de la papaya)

Además, en un estudio realizado sobre virus aislados de 9 hospederos susceptibles y resistentes de Taiwán, Hawaii, Florida y Ecuador, los cuales inclulan miembros de las Chenopodiaceae, Cucurbitaceae y Caricaceae, no se encontraron diferencias significativas entre la susceptibilidad y serología, lo que indica que el PRV y el WMV-1 están muy relacionados. Por otro lado, los aislados de PRV de regiones muy separadas

geográficamente tienen propiedades biológicas y serológicas muy similares (Yeh, *et al.*, 1984).

Otras propiedades que caracterizan a los potyvirus son su inactivación térmica a 50-60 °C, su concentración en la savia de entre 5-25 mg/l y una longevidad, *in vitro*, de pocos días (Jensen, 1969; Maramorosch, 1977)

a. Las partículas virales.

Las partículas del virus de la mancha anular (PRV) aisladas son filamentosas, de aspecto flexible, contienen RNA y miden 780 x 12 nm. Al igual que todos los potyvirus, inducen la formación de inclusiones citoplásmicas cilíndricas, en forma de espiral o "pinwheel" e inclusiones amorfas (de Bokx, 1965; Hollings and Brunt, 1981)

La partícula del virus consiste de aproximadamente un 5% de nucleoproteínas y 95% de proteínas (Maramorosch, 1977). El ácido nucleico es una sola cadena de RNA que sedimenta a 39S, parecido a los otros Potyvirus. La parte proteica presenta una subunidad con peso molecular de 3.6 a 3.65 x 10⁴ daltones, y dos pequeños productos con un peso molecular de 3.1 a 3.4 x 10⁴ y 2.6 a 2.7 x 10⁴ daltones, respectivamente. Se cree que las partes más

Al del tipo W y para la proteína del componente auxiliar del TEV.
(Purcifull *et al*, 1984).

b. Inclusiones citoplásmicas.

Se presenta una constante asociación de gran cantidad de proteínas no estructurales con la infección por potyvirus. Esta asociación es única para el caso de los virus de RNA que afectan a las plantas. Las proteínas se aglomeran en el citoplasma y presentan diferentes arreglos en estructuras morfológicas conocidas como inclusiones. Las inclusiones cilíndricas, también conocidas como inclusiones citoplásmicas o "pinwheel" se han observado en todos los hospederos infectados por potyvirus. Se ha demostrado que las inclusiones cilíndricas son específicas para el potyvirus de que se trate y su estructura es independiente de la planta hospedera (Dougherty and Hiebert, 1980).

Las inclusiones pueden ser aisladas y parcialmente purificadas. En estudios sobre la síntesis *in vitro* del RNA del TEV se ha demostrado que en el genoma viral existe la información para la codificación de estas proteínas no estructurales que forman las inclusiones en células infectadas (Dougherty and Hiebert, 1980; Matthews, 1982).

La mayoría de estas inclusiones, al ser observadas en un corte transversal, presentan un tubo central del cual surgen, en forma radiada, especies de "brazos" que dan el efecto de rehilete ("pinwheel"). En reconstrucciones de cortes seriados se muestra que las inclusiones consisten de una serie de placas curvadas con una periodicidad de cerca de 5 nm. En general tienen un aspecto estructural geométrico complejo y su estructura ha sido confirmada mediante criofractura, encontrándose que para algunos potyvirus los "pinwheel" son más curvados y para otros son más abiertos. Las partículas del virus podrían estar asociadas todo el tiempo a los "brazos" de las inclusiones pero particularmente en las etapas tempranas de infección (Purcifull and Edwardson, 1967; Matthews, 1982).

En ocasiones, las inclusiones se han encontrado en fuerte asociación con el retículo endoplásmico. Sin embargo, no se les ha encontrado asociadas con las partículas virales. Cerca de estas últimas, se ha observado la presencia de vesículas de varios tamaños y al aparato de Golgi asociada a éstas (Kim and Fulton, 1969).

c. Transmisión de la enfermedad.

La forma de transmisión de los virus por áfidos puede ser clasificada de acuerdo a la manera en la que los áfidos portan

las partículas virales: a) en el estilete (stylete-borne), denominada no persistente, no circulativa; y b) en forma circulante dentro de su organismo o persistente. En el primer caso, las partículas virales pueden ser tomadas de células epidérmicas o subepidérmicas y el áfido mantiene su infectividad solo por una o dos horas, mientras que en el segundo caso, los áfidos deben hacer penetrar su estilete en los tejidos de la planta hasta llegar al floema. En éste, el áfido se mantiene infectivo por más tiempo debido a que el virus llega a multiplicarse incluso dentro del cuerpo del vector (Dixon, 1978).

Al igual que todos los Potyvirus, el PRV es transmitido naturalmente por áfidos, de manera no persistente, y artificialmente por inoculación mecánica con extractos de savia infectada (Maramorosch, 1977). La adquisición del virus por el áfido y la inoculación a la planta por el vector ocurre en pocos minutos. En pruebas de transmisión con áfidos, una vez que han adquirido los virus, se encontró que ésta se llevaba a cabo por *Mysus persicae* entre 15 y 45 segundos y por *Aphis citricola* entre 10 y 60 segundos (Purcifull *et al.*, 1984)

El proceso involucrado en la transmisión no persistente y no circulativa de los virus por vectores áfidos ha sido sujeto de especulación por algún tiempo. Existía la hipótesis de que el mecanismo de transmisión de los virus "no persistentes" era cuando el áfido comía y su estilete se contaminaba de material

infeccioso de una planta hospedera. Sin embargo, el tiempo tan breve de adquisición y transmisión de estos virus, y la ausencia de un periodo latente, sugiere que la transmisión no ocurre como resultado de la contaminación del estilete, sino que debe existir una relación más específica entre éste y las partículas virales (Berger and Pirone, 1986).

Lim *et al.* (1977) utilizaron esferas de látex cubiertas con inmunoglobulinas antivirales y encontraron, mediante microscopía electrónica de barrido, que la interacción entre el virus y el estilete es específica y no mera contaminación. Ellos sugieren que las proteínas de la cubierta de la partícula viral son importantes en la transmisión por áfidos, aunque piensan que también puede deberse a la naturaleza interna del estilete.

En trabajos posteriores, se demostró que la transmisión de los potyvirus por áfidos es dependiente de la presencia de una proteína producida en las células de la planta infectada, llamada "helper component" (HC); Thornbury *et al.* (1985) aportan evidencias, aunque indirectas, que sugieren que la HC es un producto del genoma viral y no una sustancia producida por el hospedero en respuesta a la infección potyviral y que cada potyvirus produce una proteína HC serológicamente diferente. Más adelante, Berger y Pirone (1986) probaron preparaciones altamente infecciosas que no pudieron ser transmitidas por los áfidos, a menos que éstos últimos tuvieran primero o simultáneamente,

acceso al HC. Ellos demostraron, mediante partículas virales radioiodinadas, que la contaminación de los estiletes no ocurría, pues encontraron que la marca radioactiva estaba específicamente asociada con los estiletes del maxilar y no con los mandibulares.

d. Morfogénesis de la partícula viral

Se ha observado en células de la planta del "fruto de la pasión" infectada por el PWV (passionfruit woodiness virus) -otro potyvirus-, que la formación de las partículas virales puede llevarse a cabo en el citoplasma, ya sea agregadas lateralmente o bien como partículas individuales. Los agregados de viriones se encuentran frecuentemente unidos a parte del sistema endomembranoso de la célula como son el tonoplasto, el retículo endoplásmico o a la membrana plasmática aunque, en general, los viriones no están asociados a la membrana ni a organelos citoplásmicos (Kim and Fulton, 1969; Maramorosch, 1977). A pesar de que los viriones siempre han sido observados en el citoplasma, Maramorosch (1977) sugiere que el sitio de replicación del ARN viral es en o cerca de los cloroplastos. Previamente, Mayhew and Ford (1974) aportaron evidencias que implican a los cloroplastos como sitios de síntesis. Ellos consideran más importante el descubrimiento de una especie de RNA resistente a Ribonucleasa pancreática (rr-RNA) en los cloroplastos de células de tejido infectado, el cual no fué

encontrado en los cloroplastos de células de tejido sano, lo que parece indicar que el rr-RNA es de tipo viral.

III. HIPÓTESIS

Las observaciones del virus *in situ* publicadas hasta ahora, se han llevado a cabo en células de láminas foliares (ver por ejemplo Story *et al.*, 1968; Story and Halliwell, 1969) de plantas enfermas y las que han sido observadas aisladas (ver por ejemplo Purcifull *et al.*, 1984), se han extraído de la savia de plantas infectadas. A la fecha, no se conocen informes de observaciones en células de los frutos, a pesar de que es el tipo de mancha que se presenta en éstos lo que da la característica principal, e incluso el nombre, a la enfermedad.

En este trabajo se esperaba encontrar las inclusiones citoplásmicas tipo "pinwheel" y cilíndricas en células epidérmicas y subepidérmicas subyacentes a la mancha anular en el pericarpio de frutos infectados.

IV. OBJETIVOS

Los objetivos que se persiguen en el presente trabajo son:

- 1). Conocer la distribución del virus en las células epidérmicas y subepidérmicas del pericarpio en las manchas anulares de los frutos infectados.
- 2). Analizar cualitativamente las estructuras celulares de células de frutos infectados.

V. MATERIAL Y MÉTODO

Se tomaron muestras de la mancha anular de 3 frutos de plantas de papaya que presentaban síntomas típicos de la enfermedad provocada por el PRV. Estos síntomas son: clorosis en las hojas, manchas alargadas de aspecto acuoso en los tallos y peciolo, acortamiento de los peciolo y presencia de manchas anulares en la superficie de los frutos (Figuras. nos. 1, 2 y 3). También se tomaron muestras de un fruto inmaduro de tamaño similar a los de las plantas enfermas.

Las plantas se seleccionaron de una huerta en producción de aproximadamente 8 meses de establecida, en el Municipio de Manlio F. Altamirano, del Estado de Veracruz.

El tamaño de las muestras, tanto de tejido sano como enfermo, fué de aproximadamente 1 mm^2 . Las tomas se realizaron en la mancha circular central (zona 1), en la región circundante (zona 2), en el anillo inmediato a ésta (zona 3) y en la zona más exterior al anillo (zona 4) (Fig. No. 1c).

Cada muestra fué procesada para microscopía electrónica de transmisión (MET) de acuerdo con el procedimiento descrito por

Figura no. 1. Morfología general del tipo de planta infectada por PRV, utilizada para los muestreos. La sintomatología que presenta es típica: clorosis, acortamiento de los peciolo, manchas en tallo y peciolo (no mostrados) y, principalmente, las manchas anulares sobre la superficie del fruto.

La figura no. 2 muestra un acercamiento del fruto señalado con una flecha en la primera figura.

En la figura no. 3 se indica la ubicación de las zonas de la mancha anular que se analizaron (zonas 1, 2, 3 y 4).



2

3

Zetler (1968). Brevemente, el procedimiento consiste de una fijación con glutaraldehído al 6.5% amortiguado en fosfatos 0.16M, a pH de 7.2 durante 20 horas a 4°C, seguida de una postfijación con tetraóxido de osmio al 1%, amortiguado también en fosfatos, durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se prosiguió con el procesamiento habitual para MET de acuerdo con el diagrama del final de esta sección.

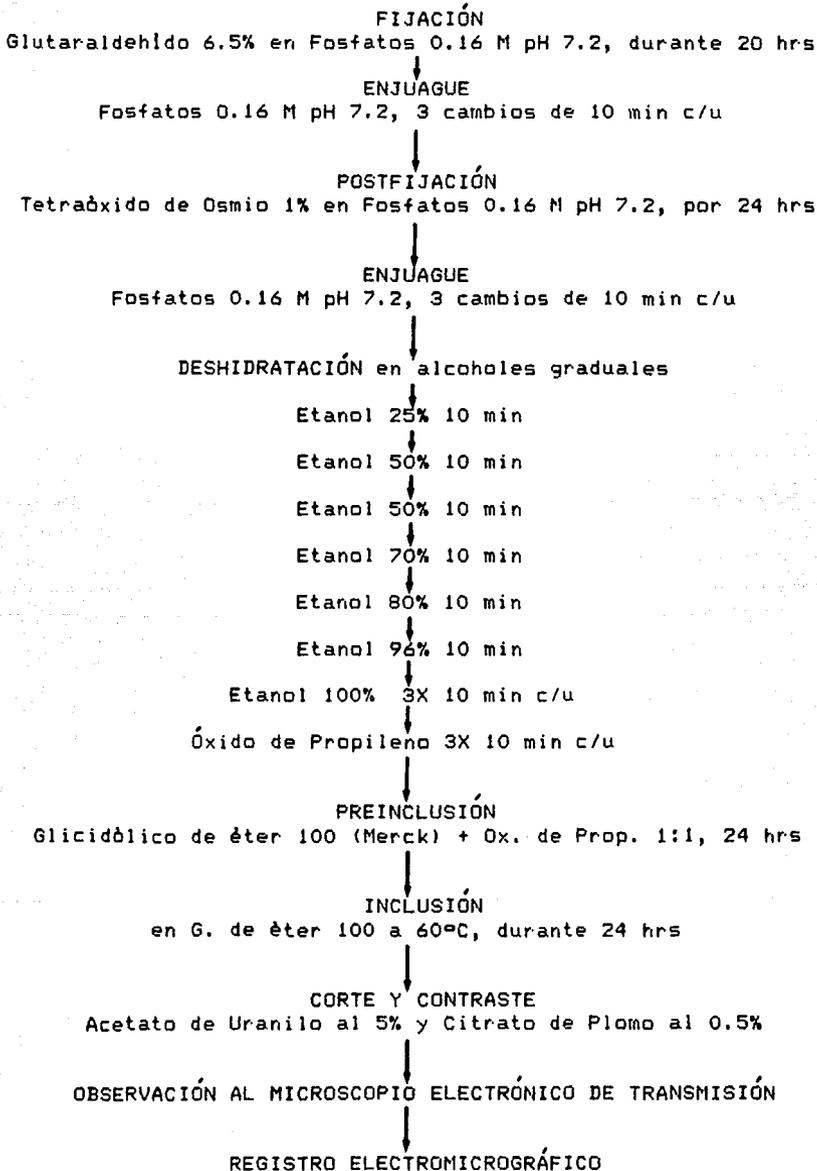
Los cortes ultrafinos se realizaron de entre 60 y 90 nm de espesor con cuchillas de vidrio y de diamante. Se montaron en rejillas de cobre de diferentes "mesh" o de un solo agujero, cubiertas con una película de formvar. Se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Su observación y registro electromicrográfico se llevó a cabo con dos microscopios electrónicos de transmisión convencionales, modelos EM-9 y EM-10, Carl Zeiss.

Se analizaron las células epidérmicas y subepidérmicas del pericarpio de las regiones que presentan la mancha en frutos infectados. En total se revisaron 100 electromicrografías y 72 fotomicrografías, de las que se seleccionaron las que se utilizan para ilustrar este trabajo.

Las gráficas del análisis morfométrico se realizaron con un programa llamado "Histograma 4", elaborado por el Dr. G. H. Vázquez Nin, del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la

Facultad de Ciencias, U.N.A.M. Este es un programa que dibuja los histogramas a partir de los datos promedio y sus desviaciones estándar.

En la edición del texto se utilizó el programa PCW-Text.



VI. RESULTADOS

Microscopía de luz.

Con microscopía de luz, en el tejido infectado se observa que ocurre engrosamiento de la cutícula (aproximadamente al doble) y abultamiento de los cloroplastos, que en el tejido sano se presentan con su forma normal alargada (fusiformes) que describen Roth y Clautnitzer (1943) (Figs. nos. 4 y 5).

Microscopía electrónica.

Al microscopio electrónico, se observan inclusiones citoplásmicas similares a las descritas para hoja de plantas hospederas de PRV (Figs. nos. 6 y 7). Estas inclusiones se encontraron tanto en células epidérmicas como subepidérmicas del pericarpio de las zonas 1, 2 y 3 de frutos enfermos y presentan forma cilíndrica.

En cortes transversales, las inclusiones se observan circulares o como rehiletes ("pinwheel") (Figs. nos. 6 y 7). En cortes longitudinales aparecen como tubos formados de varias láminas. Para comprobar su estructura tridimensional, se realizó un estudio morfométrico en el que se midieron tanto los diámetros de las inclusiones que presentan aspecto circular y del centro

Figura no. 4. Micrografia óptica de las células epidérmicas (E) y subepidérmicas (SE) del pericarpio de frutos sanos de papaya. Se aprecian los cloroplastos (flechas) con su forma normal alargada que describen Roth y Clautnitzer (1943), y la cutícula (cabezas de flecha) delgada. 100 X.

Figura no. 5. Micrografia óptica de las células epidérmicas (E) y subepidérmicas (SE) del pericarpio de frutos infectados de papaya (zona I), en la que se observa, con respecto al tejido sano, que hay un engrosamiento de la cutícula (cabezas de flecha) y variación en la forma de los cloroplastos (flechas), que toman apariencia globosa. 100 X.

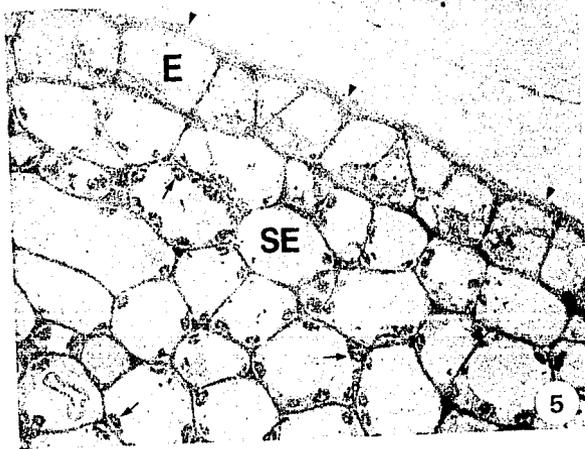
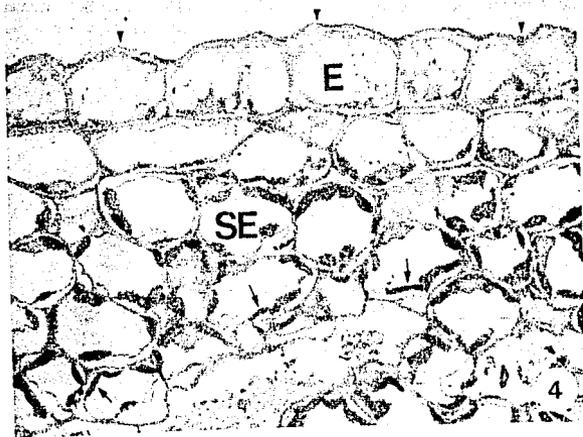


Figura no. 6. Micrografía electrónica de una célula epidérmica del pericarpio (zona 2). Las inclusiones citoplásmicas señaladas con el cuadro, se encuentran cercanas al núcleo (N). En el recuadro se muestra un aumento de esta zona, en el que se observan las inclusiones cilíndricas cortadas transversal (C) o longitudinalmente (flecha gruesa) y que en ocasiones muestran forma de rehilete (pinwheel) (Pw). La zona de las inclusiones citoplásmicas se asocia con el retículo endoplásmico rugoso (RER). Con las flechas delgadas se señalan estructuras que por su aspecto, se sugiere que son las partículas virales. Vacuolas (V), cutícula (Cu), pared celular (P), dictiosomas (D), mitocondrias (M). Uranilo-plomo. X 7,250; recuadro, X 28,000.

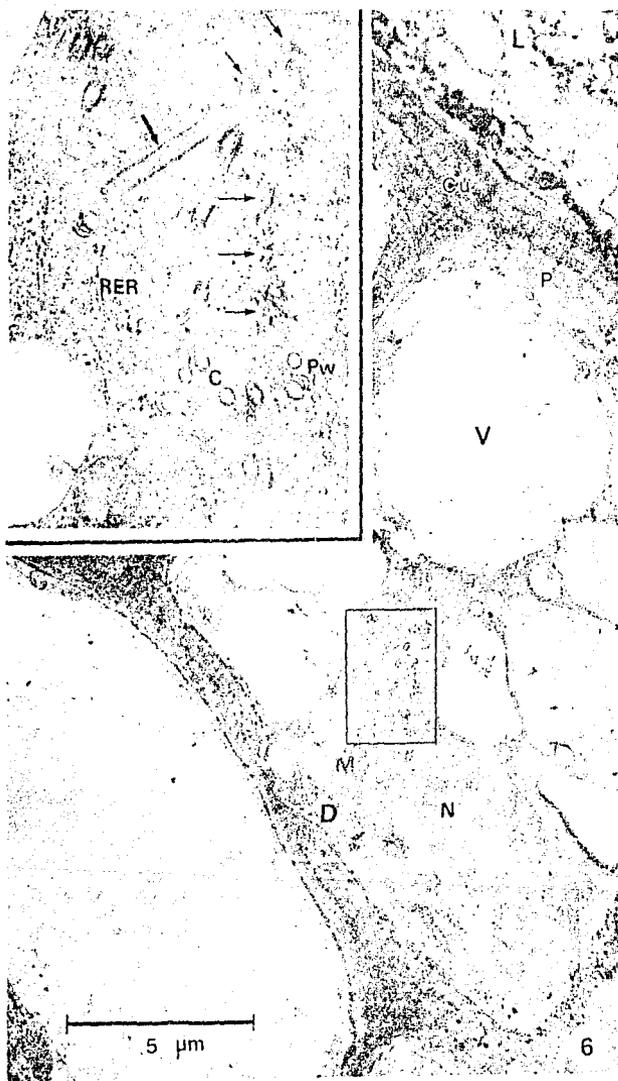
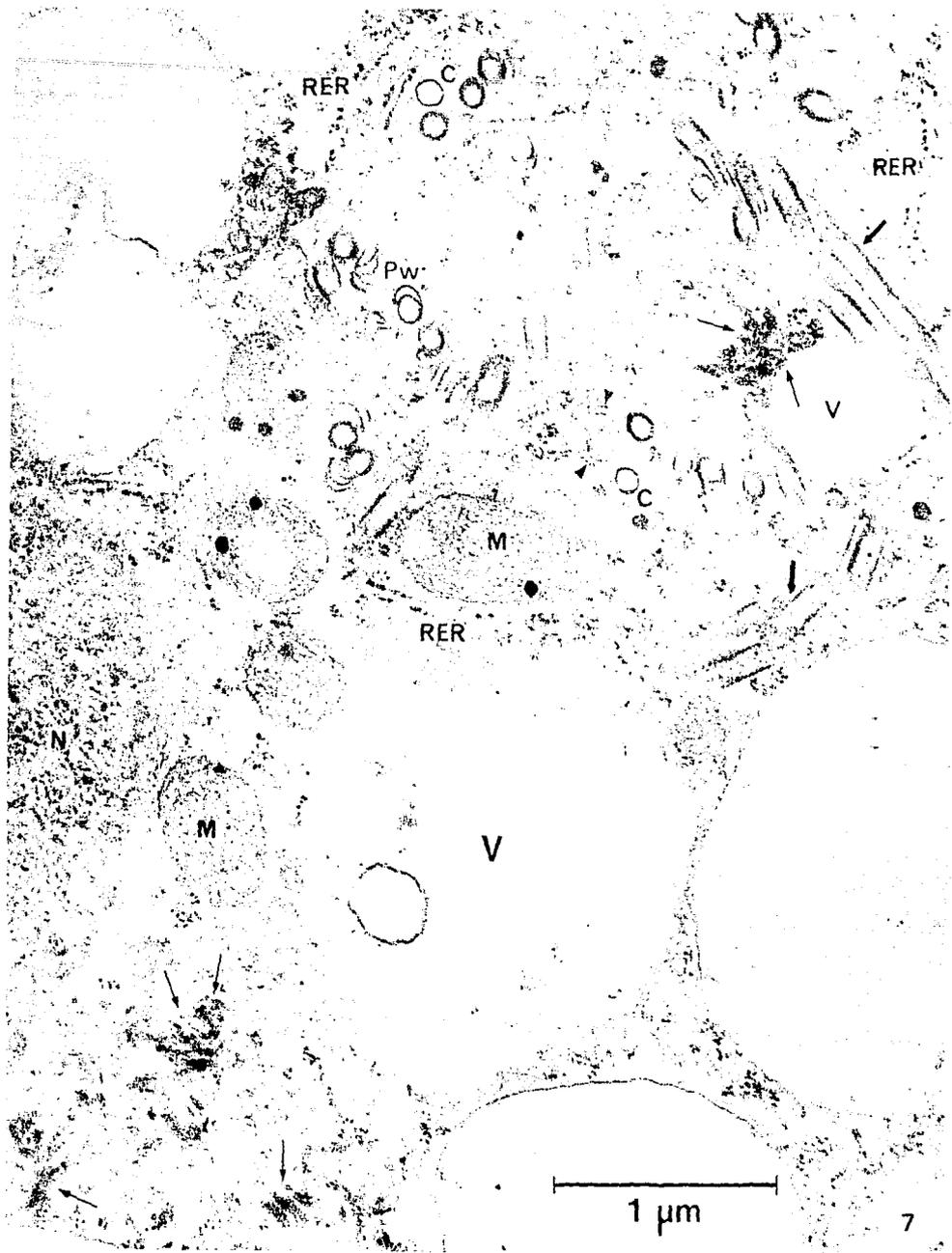


Figura no. 7. Micrografía electrónica a gran aumento, de las inclusiones citoplásmicas inducidas por el PRV en el pericarpio del fruto de papaya infectado (zona I). Muestran forma circular (C) o de rehilete (pinwheel) (Pw) y asociación con el retículo endoplásmico rugoso (RER). Se observan también unas estructuras que por su aspecto y asociación con tonoplastos, pueden corresponder a las partículas virales (flechas delgadas). Vacuolas (V), mitocondrias (M), núcleo (N). Uranilo-plomo. X 40,000.



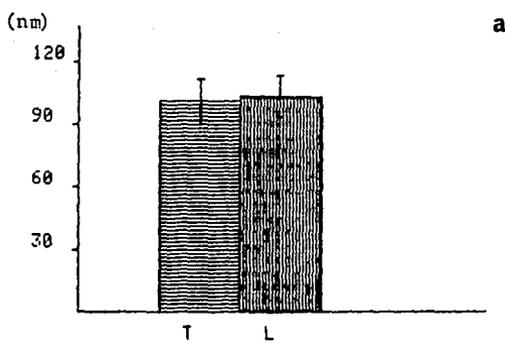
del "pinwheel", así como los de los "tubos". Las medidas coinciden, como puede apreciarse en la Fig. no. 8a. Para ratificar ésto y demostrar que las estructuras de aspecto filamentosas no son la partícula viral, se tomaron los datos de los "brazos del pinwheel" y los de las láminas que forman los tubos y se comprobó que también coinciden (Fig. no. 8b), desechando la posibilidad de que sean la partícula viral.

Las inclusiones citoplásmicas se encontraron siempre asociadas al RER (Reticulo Endoplásmico Rugoso) (Figs. nos. 6 y 7).

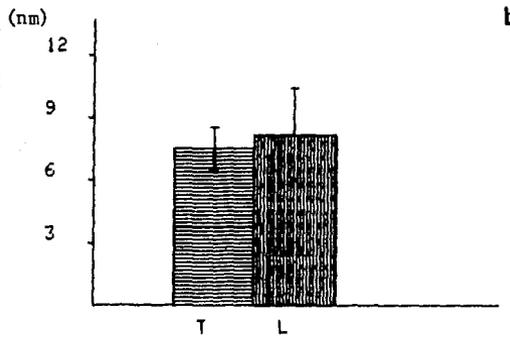
En las muestras de tejido de frutos sanos no se encontraron las inclusiones citoplásmicas (Figs. nos. 13 a 15).

En la zona 4 no se encontraron inclusiones típicas sino estructuras amorfas, que en ocasiones se asocian con cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias (Fig. no. 10).

Con el microscopio electrónico, se observa que en el tejido infectado los cloroplastos presentan en su interior grandes vesículas poco densas a los electrones (no osmiofílicas) (Fig. no. 9), que parecen contribuir a su forma globosa. Aunque las mismas vesículas se observan en los cloroplastos de tejido sano, son mucho menos abundantes. No se encontraron cloroplastos con forma normal (fusiforme) en tejido enfermo.



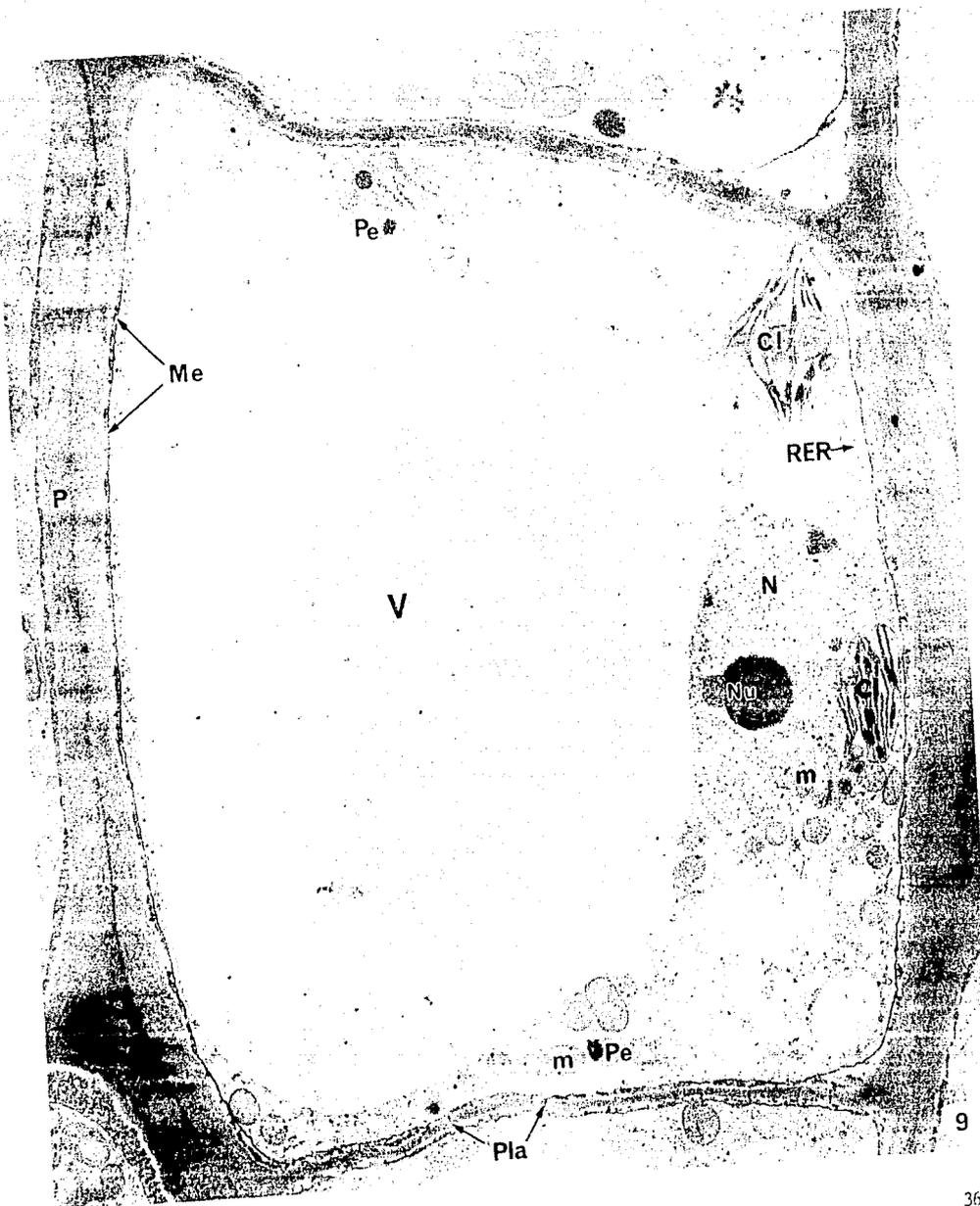
Diámetro de las inclusiones citoplásmicas



Espesor de las láminas de las inclusiones citoplásmicas

Figura no. 8. Gráficas del estudio morfométrico de las inclusiones citoplásmicas. En (a), la primera barra corresponde a la media (en nanómetros) del diámetro de las inclusiones que se observan circulares o como el centro del rehilete (pinwheel), en cortes transversales (T); la segunda barra corresponde al grosor de las inclusiones citoplásmicas en cortes longitudinales (L). En (b), se observa el espesor de las placas que forman la estructura cortada transversalmente (astas del rehilete o pinwheel) (T) (primera barra) y de estas placas cortadas longitudinalmente (segunda barra) (L). Se indica la desviación estándar en cada caso.

Figura no. 9. Micrografía electrónica de una célula subepidérmica del pericarpio del fruto de papaya infectado (zona 2) en la que se observa el nucléolo (Nu) formando un cuerpo nucleolar y los cloroplastos (Cl) con grandes vesículas no osmiofílicas. Núcleo (N), mitocondrias (m), peroxisomas (Pe), retículo endoplásmico rugoso (RER), vacuolas (V), membrana plasmática (Me), plasmodesmos (Pla) y pared celular (P). Uranilo-plomo, X 9,450.



9

También en los cloroplastos de las células de tejido enfermo de la zona 4, se observaron vesículas grandes no osmiofílicas. Ocasionalmente, ocurren invaginaciones de citoplasma con mitocondrias y ribosomas en su interior (Fig. No. 12).

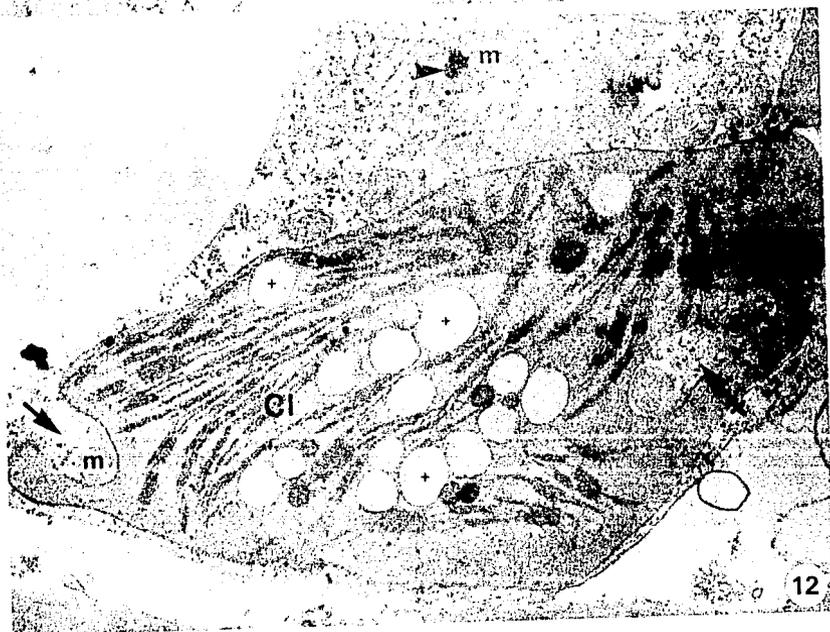
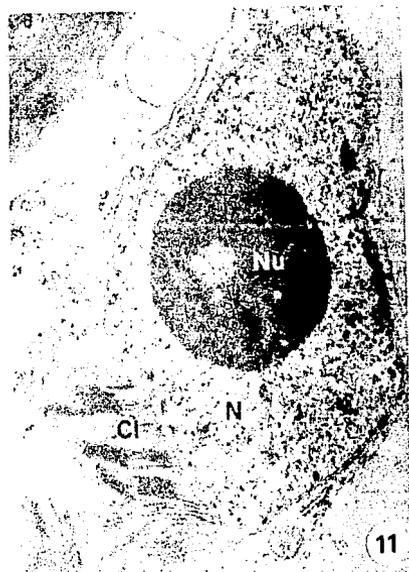
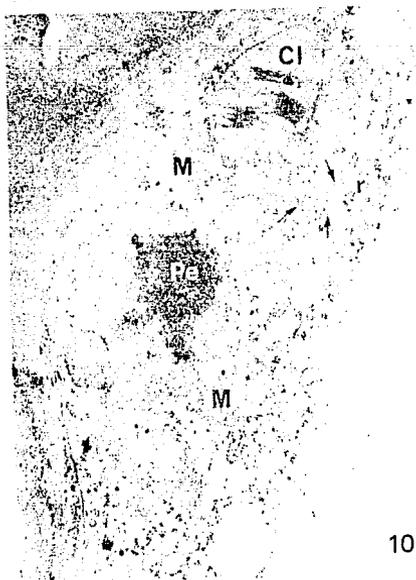
También se pudo apreciar una constante asociación entre la presencia de numerosos peroxisomas con inclusión cristalina en su interior y la infección potyviral (Figs. nos. 9, 10 y 12). Algunas veces se observaron mitocondrias con una inclusión en su interior (Fig. no. 12).

Figuras nos. 10 a 12. Micrografías electrónicas de células subepidérmicas de la zona 4 del pericarpio de fruto de papaya infectado.

Figura no. 10. Se aprecian estructuras que por su aspecto pudieran ser las partículas virales (viriones) (flechas) que se encuentran cercanas al cloroplasto (Cl) y al peroxisoma (Pe). Uranilo-plomo, X 25,000. Mitochondrias (M).

Figura no. 11. Se observa un núcleo interfásico (N) de esta misma zona que presenta aspecto normal. El nucléolo (Nu), característico de vegetales (ver Risueño y Medina, 1986), presenta una "vacuola". Un cloroplasto (Cl) se encuentra adherido al núcleo; es notable la estrecha asociación entre las membranas de ambos organelos. Uranilo-plomo, X 19,200.

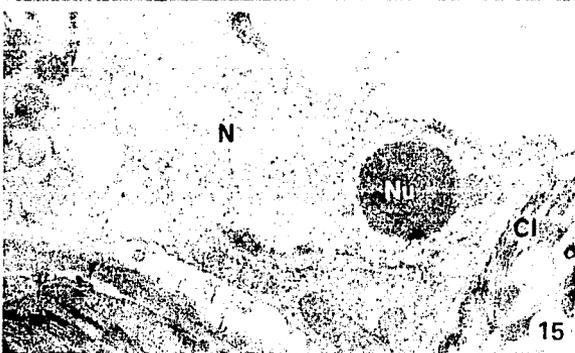
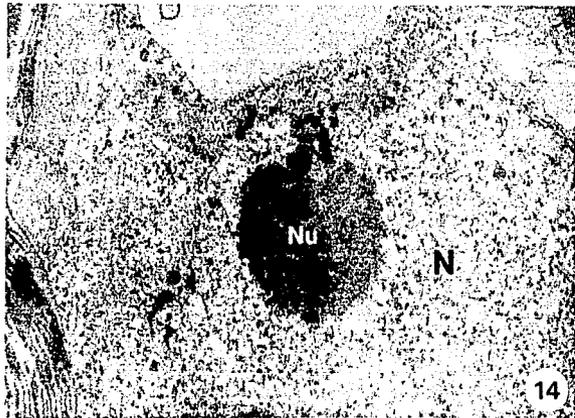
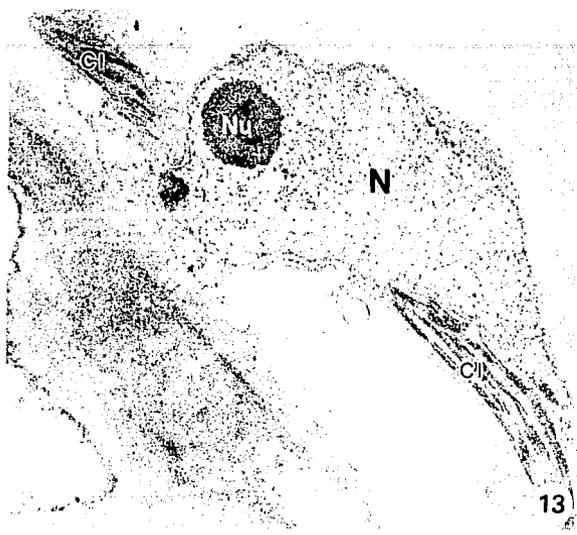
Figura no. 12. Se observa un cloroplasto (Cl) con gran cantidad de vesículas no osmiofílicas (+), una lobulación (flecha) con una mitocondria (m) y una invaginación de citoplasma (flecha cruzada) que contiene dos mitocondrias. También se puede apreciar una inclusión (cabeza de flecha) dentro de las mitocondrias que están cercanas a este cloroplasto. Uranilo-plomo, X 20,000.



Figuras nos. 13 a 15. Micrografías electrónicas de células subepidérmicas de frutos normales.

Figura no. 13. Se observa un núcleo (N) y su nucléolo (Nu) con aspecto normal. También se observan cloroplastos (Cl) sin vesículas en su interior y con aspecto normal fusiforme. Uranilo-plomo, X 12,000.

Figuras nos. 14 y 15. Se muestran dos núcleos con nucléolos y cuerpos nucleolares. En la figura no. 15 se aprecia una porción de un cloroplasto (Cl) con vesículas no osmiofílicas. Uranilo-plomo; fig. no. 14, X 24,000; fig. no. 15, X 25,000.



VII. DISCUSIÓN

Inclusiones citoplásmicas

En este trabajo se demuestra la presencia de inclusiones citoplásmicas inducidas por el virus de la mancha anular (PRV), en las células epidérmicas y subepidérmicas del pericarpio del fruto de papaya (*Carica papaya* L.) infectado .

La localización de las inclusiones en tejido epidérmico y subepidérmico concuerda con lo planteado acerca de la transmisión del virus por los áfidos de manera no persistente y que para dicha transmisión no es necesaria la succión de látex.

La manera más común en que los áfidos transmiten virus es la no circulativa y no persistente. En ella, el virus se adquiere y se transmite durante pruebas de alimentación breves de unos cuantos segundos de duración. El virus no es retenido por su vector por periodos largos ni después de la ecdisis del insecto (García, 1987). Por esta razón, aunque la longitud del estilete del áfido, que es de alrededor de 500 μm (Forbes, 1977), supera por mucho el espesor de las células epidérmicas ($\bar{x}=17.8 \mu\text{m}$, $n=20$), no es necesario que el insecto introduzca todo el estilete

para alimentarse y tomar savia, ya que las partículas virales se encuentran en las capas celulares más externas. Asimismo, el virus puede ser transmitido tan solo si el áfido realiza piquetes de prueba que apenas hagan contacto con las capas celulares más externas.

La asociación de las inclusiones con el RER sugiere que la síntesis de proteínas de la célula hospedera está siendo utilizada por el virus.

En la zona 4 se describen unas estructuras que parecen ser o bien las partículas virales que pasaron de una célula a otra o bien, inclusiones en formación. Sin embargo por su aspecto y por su asociación a tonoplasto (Fig. no. 7) se sugiere que pueden ser más bien las partículas virales. Con el objeto de conocer si esas estructuras son o no los viriones, es decir son de naturaleza ribonucleoproteica, sería necesario realizar un estudio citoquímico con la técnica regresiva de contraste preferencial a base de EDTA (Bernhard, 1969), en material infectado.

Por otro lado, el hecho de no encontrar inclusiones en la zona 4, hace pensar que la formación de las inclusiones ocurre centrifugamente, es decir, del punto de infección (zona 1) hacia afuera (zona 4), a través de los plasmodesmos

Lo que sugiere que los plasmodesmos pueden ser la conexión para la transmisión de los virus de una célula a otra, es que se encontraron más abundantes en las membranas celulares transversales al plano de la epidermis y en menor cantidad en las membranas que son paralelas a este plano (Figura no. 9). Esto coincide con lo que describen Roth y Clautnitzer (1943), acerca de que en el crecimiento del fruto, una vez que ha alcanzado su desarrollo fisiológico, lo que predomina son las divisiones celulares anticlinales, y siendo los plasmodesmos puntos de comunicación entre una célula y otra que se forman al momento de la división, es lógico encontrarlos con esta disposición. Además, esta disposición apoya la idea de que la transmisión de los virus de una a otra célula es de manera centrifuga y podría explicar la apariencia de anillos concéntricos. Sin embargo, la apariencia verde, oscura o clara, de anillos e interanillos (zonas 1 y 3 y zonas 2 y 4 respectivamente) no se debe a la presencia de partículas o inclusiones en el citoplasma, pues ambas se presentan en las zonas 1 a 3 de igual manera.

La coloración puede deberse a un mayor número de cloroplastos globosos en las zonas 1 y 3. Se hace necesario entonces realizar un estudio cuantitativo de cloroplastos e inclusiones en las cuatro zonas de la mancha anular.

El por qué se dá un patrón de distribución anular en el color no se puede explicar con las observaciones presentadas

aquí. Se propone estudiar el desarrollo del patrón de coloración de la mancha anular después de infecciones controladas, paralelamente al estudio cuantitativo de cloroplastos e inclusiones y al estudio químico de los pigmentos, en particular de la clorofila.

La presencia de inclusiones citoplásmicas puede, entonces, ser un criterio de diagnóstico temprano de la enfermedad viral, lo que puede contribuir, eventualmente, a la erradicación de esta enfermedad, conociendo los mecanismos subcelulares precisos que originan estas estructuras.

Cloroplastos

El estroma es el espacio intermembrana de los cloroplastos, el cual está formado por una sustancia fundamental finamente granulada donde se bañan diversas inclusiones: glóbulos muy osmiofilos o plastoglóbulos, granos de almidón de aspecto homogéneo y claro que incluso pueden ser observados al microscopio de luz, fibrillas de ADN agrupadas en masas o nucleótidos y gran cantidad de ribosomas, llamados plastroribosomas (Berkaloff, 1984).

Las grandes vesículas no osmiofilicas que se encontraron en este estudio al interior de los cloroplastos, podrían corresponder a las vesículas de almidón descritas anteriormente.

Estas vesículas, como ya se mencionó antes, están presentes también en el tejido sano, por lo que pueden no tener relación con la infección potyviral. Sin embargo, los cloroplastos ovoides como los que se observan en este estudio y no los cloroplastos de forma alargada fueron los únicos observados en las 4 zonas del tejido enfermo.

Por lo anterior, la presencia de gran cantidad de cloroplastos con numerosas vesículas, bien puede ser la causa de la diferencia en coloración en el tejido que forma los anillos, el cual presenta un color más oscuro (que le dá el aspecto acuoso) que el resto del pericarpio y representar además, una de las primeras respuestas citológicas de la planta a la infección puesto que se encontraron en células de tejido que provenía de una planta con aspecto sano. Esto es contrario a lo que encontró Magyarosy (1973), ésto es que una infección viral sistémica no altera la ultraestructura de los cloroplastos. Por lo que se sugiere hacer un muestreo en frutos de plantas cuya sanidad sea garantizada mediante su aislamiento en un invernadero, por ejemplo. Por otro lado, se hace necesario realizar un estudio ultraestructural a diferentes tiempos después de la inoculación, con el objeto de conocer el patrón de distribución de las inclusiones y de los virus, así como de la alteración de cloroplastos y aparición de peroxisomas.

Las invaginaciones de citoplasma con mitocondrias en su interior en el estroma del cloroplasto, ya habian sido descritas por Kim y Fulton en 1969. Por otro lado, en plantas C3 y C4, y especies que presentan un metabolismo intermedio entre estos dos, se menciona la presencia de inclusiones citoplásmicas con mitocondrias en su interior (Brown *et al.*, 1983). La diferencia entre estas plantas es la presencia (plantas C3) o ausencia de fotorrespiración (plantas C4), por lo que esta característica podría ser un indicio de que esta ruta metabólica está involucrada en la respuesta a la infección por parte del hospedero. Si el virus se replica en el cloroplasto, puede ser un mecanismo para asegurar un mayor aporte de energía.

Peroxisomas

La presencia de gran cantidad de peroxisomas puede ser un indicador más de esto último, ya que los peroxisomas participan con los cloroplastos y las mitocondrias en el metabolismo del ácido glicólico; esta cooperación funcional es el origen de los intercambios gaseosos de la fotorrespiración (Apéndice 2) (Berkaloff, *et al.* 1984). En tejido sano no se encontraron peroxisomas. Esto apoya la idea de que el virus pudiera estar incrementando la tasa de fotorrespiración.

Todo esto coincide con lo encontrado en el estudio de Magyarosy *et al.* en 1973, en el cual demuestran que el

metabolismo de la célula se está desviando de la producción de azúcares a la producción de aminoácidos. Ellos sin embargo, no encontraron un incremento en la cantidad de ribulosa 1,5-difosfato y en la actividad de la ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa, la enzima con la que se continúa el proceso de fotorrespiración en el peroxisoma. Pero por otro lado, en este proceso se involucra una reacción de oxidación del glicolato a glioxilato que libera peróxido de hidrógeno, el cual se descompone por la catalasa presente en los peroxisomas. El glioxilato es ulteriormente metabolizado a otros productos tales como glicina, serina, oxalato, formiato o bióxido de carbono (Alberts, *et al.*, 1989; Darnell, *et al.*, 1986; Giese, 1979; Lehninger, 1981)

En varias ocasiones se pudo observar la asociación de los cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias. Además, en la zona 4 se encontraron también asociadas las estructuras que se presume son las partículas virales (Fig. no. 10).

VIII. CONCLUSIONES

El Virus de la Mancha Anular (PRV) induce la formación de inclusiones citoplásmicas características de la enfermedad, asociadas a retículo endoplásmico rugoso en el tejido epidérmico y subepidérmico del pericarpio del fruto de plantas de papaya que presentan los síntomas típicos de la enfermedad. Además provoca hinchamiento de los cloroplastos y aparición de peroxisomas.

La distribución de las inclusiones inducidas por la infección potyviral es constante en los anillos e interanillos de las manchas, y parece ser centrífuga pues no aparecen después del último anillo. Entonces, el patrón de distribución en forma de anillos claros y oscuros concéntricos en el pericarpio de frutos infectados por el PRV, no depende de la presencia o ausencia de las inclusiones citoplásmicas directamente, sino a otra(s) estructura(s) que pueden ser los cloroplastos globosos.

IX. REFERENCIAS

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D., 1983. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Publishing, Inc. New York, U.S.A.

Barbosa, F.R. e Paguio, O.R., 1982. Virus da mancha anelar do mamoeiro: incidencia e efeito na producao do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Fitopatologia Brasileira** 7(3): 365-373.

Berger, P. H. and Pirone, T. P., 1986. The Effect of Helper Component on the Uptake and Localization of Potyviruses in *Morus persicae*. **Virology** 153: 256-261.

Berkaloff, A., Bourguet, J., Favard, P. y Lacroix, J.C., 1984. **Biologia y Fisiologia Celular**. Vol. III: Cloroplastos, Peroxisomas, Divisi3n Celular. Ed. Omega. Barcelona, Espaa.

Bernhard, W., 1969. A new procedure for electron microscopical cytology. **J. Ultrastruct. Res.**, 52: 362-376.

Brown, R.H., Rigsby, L.L. and Akin, D.E., 1983. Enclosure of Mitochondria by Chloroplasts. **Plant Physiol.** 71: 437-439.

CAECOT (Campo Agrícola Experimental Cotaxtla), 1979. Marco de Referencia de Fruticultura "Mango y Papaya". CAECOT, CIAGOC (Centro de Investigaciones Agrícola del Golfo Centro), SARH, México.

Chen, M.J., 1984. Electron microscopy observation of papaya ringspot virus in infected papaya leaves. *Plant Protection Bull.* 26(1): 23-31.

CRECIDATH (Centro Regional de Enseñanza, Capacitación e Investigación para el Desarrollo Agropecuario del Trópico Húmedo), 1980. Avances en la Investigación sobre cultivos frutícolas. CRECIDATH, Colegio de Postgraduados, San Juan, Mpio. de Paso de Ovejas, Veracruz.

Cronquist, A., 1988. The evolution and classification of flowering plants. 2nd. Ed. The New York Botanical Garden. New York, U.S.A.

Darnell, J., Lodish, H. and Baltimore, D., 1986. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books. U.S.A.

de Bokx, J. A., 1965. Hosts and electron microscopy of two papaya viruses. *Plant Disease Reporter* 49(9): 742-746.

Dixon, A. F. G., 1978. **Biology of Aphids**. The Institute of Biology's. Edward Arnold. London, England

Dougherty, W. G. and Hiebert, E. 1980. Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate. Identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as a product of the potyvirus genome. *Virology* 204: 174-182.

Fariñas, M. L. 1983. **Las enfermedades virales de la Fruta Bomba *Carica papaya***. Estación Nacional de Sanidad de Citricos y Otros Frutales. Ministerio de Agricultura, Cd. de la Habana, Cuba.

Forbes, A.R., 1977. The mouthparts and feeding mechanism of aphids. En: Harris, K.F. and Maramorosch, K. (eds.). **Aphids as virus vectors**. Ac. Press, New York.

Francki, R.I.B., Milne, R.G. and Hatta, T. 1985. **Atlas of Plant Viruses** Vol. I. C.R.C. Press Inc., Florida, U.S.A.

García G., B.M., 1987. Pruebas de transmisión por áfidos (Homóptera: Aphididae) del virus de la mancha anular de la papaya (*Carica papaya* L.). Tesis de Licenciatura, Biología. Fac. de Ciencias Biológicas, Universidad Veracruzana. Xalapa, México.

Giese, A. C., 1979. **Fisiología Celular y General**, Ed. Interamericana. México.

González de C., M. 1984. **Especies Vegetales de Importancia Económica en México**. Ed. Porrúa, S. A., México.

Hollings, M. and Brunt, A.A., 1981. Potyvirus group. En: Harrison B. D. and Murant, A. F. (Eds.). **CMI/AAB. Description of Plant Viruses No. 245**, 7 pp.

Jensen, D. D., 1949. Papaya Virus Diseases with special reference to papaya ringspot. **Phytopathology** 49: 191-211

Kim, K. S. and Fulton, J. P., 1969. Electron Microscopy of Pokeweed Leaf Cells Infected with Pokeweed Mosaic Virus. **Virology** 37: 297-308.

Lehninger, A., 1981. **Bioquímica**. 3a. Ed., Omega. Barcelona, España.

Lim, W. J., de Zoeten, G. A. and Hagedorn, 1977. Scanning Electron-Microscopic Evidence for Attachment of a Nonpersistently Transmitted Virus to its Vector's Stylets. **Virology** 79: 121-128.

Magyarosy, A. C., Buchanan, B. B. and Schürmann, P., 1973. Effect of a Systemic Virus Infection on Chloroplast Function and Structure. *Virology* 55: 426-438.

Maramorosch, K. 1977. *The Atlas of Insect and Plant Viruses. Including mycoplasma, viruses and viroids.* Ac. Press, New York.

Matthews, R. J., 1982. *Plant Virology.* Academic Press. New York, U.S.A.

Mayhew, D. E. and Ford, R. E., 1974. Detection of Ribonuclease-Resistant RNA in Chloroplasts of Corn Leaf Tissue infected with Maize Dwarf Mosaic Virus. *Virology* 57: 503-509.

Moreno, N. P., 1980. *Caricaceae.* Flora de Veracruz, Fascículo No. 10, INIREB, Jalapa, Ver. México.

Purcifull, D. E. and Edwardson, J. R., 1967. Watermelon Mosaic Virus: Tubular inclusions in Pumpkin Leaves and Aggregates in Leaf Extracts. *Virology* 32: 393-401.

Purcifull, D., Edwardson, J., Hiebert, E. and Gonsalves, D., 1984. Papaya Ringspot Virus. En: Harrison, B. D. and Murrant, A. F. (Eds.). *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* No. 84, 8 pp.

Roth, I y Clautnitzer, I., 1943. Desarrollo y Anatomía del Fruto y de la Semilla de *Carica papaya* L. (Lechosa). *Acta Botánica Venezolana* 7(1-4): 187-206.

Storey, W. B., 1976. Papaya. En: *Evolution of crop Plants*. Simmonds, N. W. Ed. Longman, New York.

Story, G.E., Halliwell, R.S., y Smith, L.R., 1968. Investigación de los virus de papaya (*Carica papaya* L.) en la República Dominicana, con apuntes especiales sobre la asociación de un organismo del tipo mycoplasma con la enfermedad "Bunchy Top". Instituto Superior de Agricultura, División de Investigaciones Agrícolas, Boletín No. 14, 12 pp.

Story, G. and Halliwell, R. S., 1969. Identification of Distortion ringspot virus disease of papaya in the Dominican Republic. *Plant Disease Reporter* 53(9): 757-760.

Thornbury, D. W., Hellman, G. M., Rhoads, R. and Pirone, T. P., 1985. Purification and Characterization of Potyvirus Helper component. *Virology* 144: 260-267.

Yeh, S.-D. and Gonsalves, D., 1985. Translation of Papaya Ringspot Virus RNA *in vitro*: Detection of a Possible Polyprotein That is Processed for Capsid Protein, Cylindrical-Inclusion Protein, and Amorphous-Inclusion Protein. *Virology* 143: 260-271.

Yeh, S.-D., Gonsalves, D. and Providenti, R., 1984. Comparative studies on host range and serology of papaya ringspot virus and watermelon mosaic virus. *Phytopathology* 74(9): 1081-1085.

Yeh, S.-D., Gonsalves, D., Wang, H.-Ll., Namba, R. and Chiu, R.-J. 1988. Control of Papaya Ringspot Virus by Cross Protection. *Plant Disease* 72 (5): 375-380.

Zettler, F. W., Edwardson, J. R. and Purcifull, D.E., 1968. Ultramicroscopic Differences in Inclusions of Papaya Mosaic Virus and Papaya Ringspot Virus Correlate with Differential Aphid Transmission. *Phytopathology* 58: 332-335.

XI. APÉNDICE

1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *Carica papaya* L.

Arboles o arbustos, monoicos o dioicos, perennes, generalmente de 2 a 8 m de altura; en la base, hasta de 25 cm o más de diámetro; tallo monopódico succulento, meduloso, a menudo hueco por dentro, follaje densamente concentrado en el ápice, generalmente sin ramas; corteza verde o grisácea, lisa, con numerosas cicatrices foliares horizontales. Hojas de 7 a 9, lobadas, de 20 a 45 cm de largo y ancho, algunas veces más grandes; los peciolo de 10 a 65 cm de largo, fistulosos, algunas veces pubescentes. Inflorescencias en las axilas de las hojas superiores. Las características de las flores varían dependiendo de la forma sexual de que se trate. El fruto es una baya, amarilla o anaranjada hasta verdosa, su forma y tamaño varía dependiendo también de la forma sexual del que proceda. La pulpa es amarilla a anaranjada succulenta; semillas numerosas, elipsoides, más o menos de 4 mm de largo por 2 mm de ancho (en estado seco); sarcoatesta mucilaginoso, endotesta morena arrugada (Moreno, 1980).

La planta es polígama y presenta tres diferentes formas sexuales descritas por Storey en 1935 (citado en: Moreno, 1980): masculina, femenina y hermafrodita, ésta última puede presentar diferentes combinaciones en una planta y originar diferentes

tipos de plantas (CAECOT, 1979). A continuación se describen las diferentes formas sexuales y sus variantes.

PLANTA FEMENINA. Produce flores pistilada en inflorescencias pequeñas, a menudo reducidas a una sola flor; el pedúnculo es de 2 cm o menos de largo. Las flores son subsésiles, el pedicelo solo llega a medir hasta 0.3 mm de largo. La corola es grande, blanco amarillenta; los pétalos están ligeramente imbricados en prefloración, pero están separados hasta la base. Los estambres son reminiscentes. El pistilo presenta ovario unilocular, elipsoide, el estilo es corto y las ramas del estigma son, a menudo, muy amplias. La forma del fruto es esférico u obovoide. Esta forma sexual es la que presenta mayor producción de frutos (CAECOT, 1979; Moreno, 1980).

PLANTA MASCULINA. Esta planta presenta inflorescencias cimosas con pedúnculos largos (de 15 a 50 cm de largo). Las flores masculinas son numerosas, hasta 100 por inflorescencia. Los pétalos son de color blanco, crema o amarillo y en ocasiones con betas moradas, gamopétalos, formando un tubo hasta las dos terceras partes de la longitud total de los pétalos, los cuales son imbricados en prefloración. Los estambres son 10 (raramente otro número); los superiores, de anteras basifijas con el conectivo petaloide; los estambres inferiores, con anteras dorsifijas y con el conectivo petaloide. El pistilo es rudimentario y no funcional. Este tipo de planta ocasionalmente

produce flores hermafroditas que se convierten en frutos pequeños de forma alargada, por lo que localmente se les reconoce como "*chililla de perro*" (CAECOT, 1979; Moreno, 1980).

PLANTA HERMAFRODITA. Produce inflorescencias de pedúnculos cortos (en relación a las plantas masculinas). Las flores son alargadas, pequeñas, gamopétalas (la unión se presenta hasta en 1/3 de la longitud total). Como ya se mencionó, esta forma sexual presenta una gama de variantes (CAECOT, 1979; Storey, 1935 [citado en: Moreno, 1980]):

- a) Tipo Pentandria. Posee ovario y 5 estambres funcionales, alternos con los pétalos. El ovario es profundamente 5-lobado, fruto obovoide, fuertemente lobado.
- b) Tipo Elongata. Posee ovario y 10 estambres, sus pétalos están unidos en tres cuartas partes de su longitud. Los estambres se presentan en dos series en el cuello del tubo; el ovario es alargado y cilíndrico, levemente 5-lobado. El fruto varía de cilíndrico alargado a elipsoide.
- c) Tipo Intermedio. Flores con pétalos unidos en la base o hasta por la mitad de su longitud, estambres de 2 a 10;

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

gineceo deformado, de forma variable. Este tipo es inestable y se dice que sus flores no se ajustan a un patrón definido; producen frutos malformados.

d) Tipo "Estéril de Verano". Su apariencia es de planta masculina, pero en algunos casos es capaz de desarrollar un pistilo monocarpelar funcional y producir fruto.

El tallo es comestible en conservas. Del látex se extraen las enzimas proteolíticas industriales; éstas y su derivado seco proteolítico, la papaína, tienen numerosas aplicaciones: se emplean en la clarificación de cerveza, en el procesamiento de pieles, para el tratamiento de fibras de lana y seda y en la elaboración de queso, de jabones, cosméticos y chicles; la papaína se utiliza como ablandador de carnes; el látex tiene también varios usos medicinales que incluyen el tratamiento de la dispepsia, la difteria, como antihelmíntico, en algunas lesiones y manchas en la piel y se emplea en la composición de preparados para combatir alergias nasales al polen. La semilla y las hojas o flores en infusión también sirven para atacar algunas de las enfermedades ya mencionadas. En el látex se encuentran varios alcaloides; el más estudiado ha sido la carpaina, que a pesar de ser tóxico en grandes cantidades, tiene propiedades farmacéuticas parecida al digitalis y es efectivo en el tratamiento de amibiasis (CAECOT, 1979; González, 1984; Moreno, 1980).

2. FOTOSÍNTESIS Y FOTORRESPIRACIÓN

El proceso de la fotosíntesis está siempre asociado a la fotorrespiración; en esta última, se convierte ribulosa 1-5-difosfato a CO₂ y se consume O₂.

La fijación de CO₂ y la fotorrespiración son dos reacciones competitivas que actúan con la ribulosa 1-5-difosfato. La primera se ve favorecida con presiones altas de CO₂ y bajas de O₂. La segunda ocurre a bajas presiones de CO₂ y altas de O₂, bajo condiciones atmosféricas normales.

Enseguida se presenta un esquema en que se muestran estas dos reacciones (tomado de Darnell *et al.*, 1986)

