



# Caracterización sintomatológica y molecular del virus de la mancha anillada del papayo (PRSV) que infecta *Carica papaya* L. en el norte del Perú

Characterization symptomatology and molecular from papaya ringspot (PRSV) that infects *Carica papaya* L. in northern Peru

Shirley Valderrama<sup>1</sup>; Carolina Cedano<sup>1</sup>\*; Jorge Tenorio<sup>2</sup>; Javier Romero<sup>3</sup>; Segundo Carbajal<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Fac. CC. Agropecuarias, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n. Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

<sup>2</sup> Centro Internacional de la Papa (CIP), Av. La Molina 1895, Lima, Perú.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Crta. de la Coruña, km 7,5 – 28040, Madrid, España.

<sup>4</sup> Universidad Pedro Ruiz Gallo, Juan XXIII 391 Lambayeque, Perú.

Recibido 13 enero 2014. Aceptado 16 noviembre 2015.

## Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo la caracterización sintomatológica y molecular del virus que infecta *Carica papaya* L. en zonas del norte peruano. Para ello, de diferentes campos en producción se colectaron hojas tiernas de *C. papaya* con síntomas de mosaico, clorosis, aclareo de nervaduras y distorsión de la lámina foliar. Savia de estas hojas fue inoculada en forma mecánica sobre plantas libres de virus de *C. papaya*, *Chenopodium murale*, *Ch. amaranticolor*, *Ch. quinoa*, *Cucumis melo*, *C. sativus* y *Cucurbita pepo*; las que fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 45 días al cabo de los cuales en las hojas jóvenes de *C. papaya* se observó aclareo de nervaduras, mosaico, distorsión y reducción de la lámina foliar; en las especies *C. melo*, *C. sativus* y *Cucurbita pepo* clorosis sistémica, en *Ch. murale*, *Ch. amaranticolor* y *Ch. quinoa* no se evidenciaron síntomas. Las plantas de *C. papaya*, *C. melo*, *C. sativus* y *Cucurbita pepo* infectadas, fueron analizadas por la técnica serológica de NCM-ELISA y RT-PCR comprobándose que el virus que se encuentra infectando las plantaciones de las zonas evaluadas en el norte del Perú, es el virus de la mancha anillada del papayo (PRSV).

**Palabras clave:** mosaico, distorsión, inoculación mecánica, plantas infectadas.

## Abstract

The objective of present study was symptomatic and molecular characterization of the virus that infects *Carica papaya* L. in areas of northern Peru. To do this, of different fields were collected leaves of *C. papaya* with mosaic symptoms, chlorosis and distortion the leaf. Sap of these leaves was inoculated mechanically onto virus-free plants of *C. papaya*, *Chenopodium murale*, *Ch. amaranticolor*, *Ch. quinoa*, *Cucumis melo*, *C. sativus* and *Cucurbita pepo*; which they were kept at room temperature for 45 days, after which young leaves in of *C. papaya*, mosaic, distortion and reduction of the leaf blade was observed; in the species *C. melo*, *C. sativus* and *Cucurbita pepo* systemic chlorosis. *Ch. murale*, *Ch. amaranticolor* and *Ch. quinoa* they no showed symptoms evident. The plants infected were analyzed by serological technique NCM-ELISA and RT-PCR proving that the virus that is infecting the plantations assessed in the north of Peru, it is the papaya ringspot virus (RSVP).

**Keywords:** mosaic, distortion, mechanical inoculation, plants infected.

## 1. Introducción

*Carica papaya* L. “papaya” (Caricaceae) es uno de los cultivos cuyos frutos son apetecibles por su alto valor nutritivo, sus propiedades digestivas y medicinales

(Rieger, 2006). Su corto período vegetativo, alto rendimiento y producción continua, son factores que han determinado ventajas sobre otros frutales, involucrando en los últimos diez años a más del 35% de

\* Autor para correspondencia  
E-mail: [ccedano@unitru.edu.pe](mailto:ccedano@unitru.edu.pe) (C. Cedano).

los agricultores especialmente de la Amazonía peruana (IIAP, 2010).

De acuerdo con la estadística agraria en el año 1979 la superficie nacional sembrada con papayo ha experimentado un brusco descenso debido a una enfermedad viral conocida como la mancha anillada del papayo o "*Papaya ringspot*" (PRSV), por la cual, el área cultivada y los rendimientos han disminuido elevándose en forma correspondiente el precio. En el 2003, la enfermedad se presentó en Huánuco y San Martín, ocasionando la desaparición de aproximadamente de 6000 ha (Marín *et al.*, 2010). En Ucayali el 90% de la superficie total sembrada, está afectada por PRSV (INIA, 2010).

La presencia de la mancha anillada del papayo o "*Papaya ringspot*" (PRSV), es el principal impedimento para la producción comercial del papayo en el Perú limitando a una sola cosecha las plantaciones infectadas y la ausencia de frutos, si la infección ocurre en la etapa inicial del cultivo (MINAG, 1982).

Los síntomas del virus de la mancha anillada del papayo en las hojas son aclareo de nervaduras, mosaico, clorosis, distorsión y reducción de la lámina foliar; en tallos y peciolo manchas húmedas translúcidas de aspecto aceitoso y anillos en los frutos. Estos síntomas, que aparecen usualmente luego de dos semanas de iniciada la infección, varían en intensidad dependiendo del tipo de variante del virus, temperatura del ambiente, vigor, estado de desarrollo y nivel nutricional de la planta (Brunt *et al.*, 1990; CMI/AAB, 1994; Purcifull *et al.*, 1984).

En varios países se han desarrollado estrategias para el manejo de esta enfermedad mediante ingeniería genética, así como técnicas de detección rápida mediante el uso de PCR (Gonsalves, 1998; Tenorio *et al.*, 2007; Marys *et al.*, 2000).

Ante la severidad del problema, urge el desarrollo de un paquete tecnológico que permita la siembra y producción comercial de papaya en zonas endémicas de esta enfermedad. Por lo expuesto, en la presente investigación se planteó como

objetivo la caracterización sintomatológica y molecular del virus que infecta a *Carica papaya* L., en zonas del norte del Perú.

## 2. Materiales y métodos

### Colección de material vegetal infectada por virus

De campos comerciales de papayo ubicados en Paján, Chepén (La Libertad); Pátapo, Monsefú, Túcume (Lambayeque); Tambogrande, San Lorenzo, Chulucanas (Piura) y Corrales (Tumbes) se colectaron hojas jóvenes del tercio superior con síntomas virales como mosaico, aclareo de nervaduras, distorsión y reducción de la lámina foliar. Las muestras se depositaron en bolsas de polipropileno (10 cm x 15 cm), debidamente identificadas y se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Trujillo.

### Inoculación mecánica del virus

Savia de las hojas infectadas se inoculó mecánicamente en plantas libres de virus de *Carica papaya* de las variedades "Criolla" y "Solo" tipo Hawaina; *Chenopodium murale*, *Ch. amaranticolor*, *Ch. quinoa*, *Cucumis melo* "melon", *C. sativus* "pepinillo" y *Cucurbita pepo* "zapallito italiano". Se utilizaron 15 plantas por lugar de colección más 5 plantas testigo. Se preparó el inóculo colocando las hojas de papaya con síntomas en un mortero esterilizado y frío, luego se agregó solución tampón fosfato de potasio 0,01 M con pH 7, en proporción de 5 mL/g de muestra y se trituró hasta su total homogenización. Posteriormente, se espolvorearon con carburundum 4 ó 5 hojas de cada plántula y se frotó suavemente sobre la superficie foliar con un hisopo de algodón embebido con la savia infectada. Las plantas inoculadas, se identificaron y colocaron en un ambiente protegido con malla antiáfidos, registrando diariamente la temperatura y regándolas con solución nutritiva de Hoagland cada 3 días. Las plantas inoculadas se evaluaron durante 45 días; tiempo durante el cual se

describió progresivamente la evolución y tipo de síntomas desarrollado en cada planta. Las plantas testigo se inocularon solo con tampón fosfato de potasio.

### Detección serológica del virus

La determinación serológica del virus se realizó mediante la prueba de ELISA empleando membrana de nitrocelulosa (NCM-ELISA). Para ello, 45 días después de la inoculación de las plantas jóvenes de *C. papaya*, se extrajo 3 hojas (hoja apical, media y basal) y se colocaron en una bolsa tipo zip-loc con 5 mL de Buffer Tris Salino (TBS) conteniendo 0,2% de sulfito de sodio, se homogenizó y se dejó reposar, en posición vertical, durante 30 minutos a temperatura ambiente (24 °C). Se colocó 20 µL de este preparado sobre la membrana de nitrocelulosa y se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 min, posteriormente, se procedió a sumergir la membrana de nitrocelulosa en la solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente y con un movimiento suave (50 rpm). Luego se lavó la membrana con TBS y se añadió el primer anticuerpo PAB (anticuerpo policlonal) en TBS + 2% de leche. Se incubó toda la noche a temperatura ambiente con movimiento de 50 rpm. Transcurrido este tiempo, se lavó la membrana de nitrocelulosa con TTBS para añadir el segundo anticuerpo GAR (anticuerpo para IgG), se incubó por 1 hora en las mismas condiciones descritas anteriormente. Finalmente, para el revelado se vertió 50 mL de solución sustrato NBT/BCIP (colorante Nitro Blue tetrazolium + 5 Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) en una placa Petri, sumergiendo la membrana hasta observar indicios de cambio de color en los casilleros control.

### Detección molecular por RT-PCR

Para la extracción de ARN viral de PRSV, se utilizó 0,2 g de hojas de *Carica papaya* y *Cucumis sativus* infectadas con los aislamientos. Este material fue molido en

un mortero con ayuda de nitrógeno líquido y mezclado con 0,5 mL del reactivo Concert Plant RNA (Invitrogen). La mezcla fue centrifugada por 2 min a 9000 rpm, para luego transferir el sobrenadante a un tubo de micro centrifuga limpio. Se añadió 0,1 mL de NaCl 5M y 0,3 mL de cloroformo, se mezcló y se volvió a centrifugar por 10 min en las mismas condiciones. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se agregó un volumen igual de isopropyl y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se realizó una última centrifugación a 9000 rpm por 1 min, para después añadir 30 µL de agua libre de nucleasas (NFW). El pellet fue resuspendido en etanol al 75% y centrifugado a 9000 rpm por 1 min (4 °C). Las muestras fueron mantenidas a -70 °C hasta su posterior análisis.

Los primers utilizados fueron MB12 (5'GATCCGCCCCGACAAACACACAAG TGCGATG 3') (Bateson *et al.*, 1994) y REP4 (5' GCTTCCGGAGCATCGATTG GAGGC 3'), con un producto esperado de 1 250 pares de bases aproximadamente. Para realizar la transcriptasa reversa (RT) se utilizaron 5 µL de ácidos nucleicos de cada aislamiento de PRSV en estudio. El protocolo consistió de dos etapas: desnaturalización y alineación. En la primera etapa se utilizaron 5 µL de ARN totales, 3 µL de NFW y 2 µL de primer negativo MB12 para PRSV. La mezcla fue llevada a 95 °C por 5 min y luego a 4 °C por el mismo tiempo, utilizando el termociclador modelo PTC-200. En la segunda etapa, se mezcló 8,25 µL de NFW, 5 µL de buffer RT, 0,75 µL de DDT (didesoxitimidina) 0,1 M, 0,25 µL de dNTPs (dinucleótidos) 10mM, 0,25 µL de inhibidor de RNAsas 40 U/µL, 0,5 µL de la enzima M-MLV (enzima transcriptasa reversa) 200 U/µL por cada aislamiento. La mezcla fue llevada a 40 °C por 60 min, 95 °C por 5 min y 4 °C como temperatura final. De este producto se utilizó, para el PCR, un volumen de reacción de 13,37 µL de NFW, 2,5 µL de buffer de Taq (*Thermus aquaticus*) polimerasa 10X, 3,0

$\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  25 mM, 0,63  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM, 0,5  $\mu\text{L}$  de primer negativo MB12, 0,5  $\mu\text{L}$  de primer positivo REP 4, 0,5  $\mu\text{L}$  de la enzima Taq Mata y se añadió 2  $\mu\text{L}$  de ADNc de cada muestra.

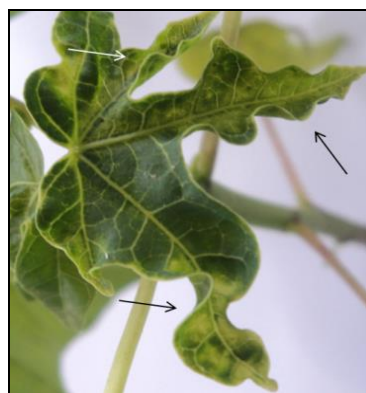
Para visualizar el ADN resultante se usó la técnica de electroforesis utilizando un tanque horizontal, gel de agarosa al 1,0 % y 0,1% de azul de bromofenol más 0,1 % de xilencianol, con una corriente eléctrica de 90 voltios por 1 hora, proporcionada por una fuente de poder Bio-Rad® y se visualizó en un trans-iluminador ultravioleta UVP®. En cada pocillo se colocó 15  $\mu\text{L}$  de marcador molecular, control positivo y control negativo (sin ADN), más 2  $\mu\text{L}$  de tampón de carga.

### 3. Resultados y discusión

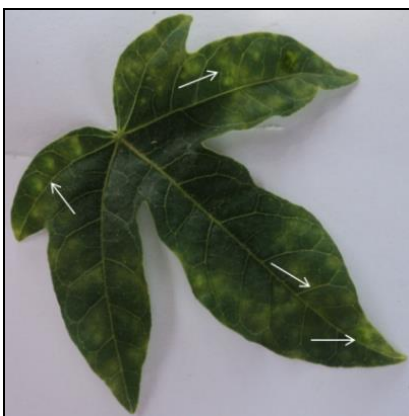
Todos los campos evaluados se encuentran infectados con el virus de la mancha anillada del papayo (PRSV) con valores que varían entre 7 y 100% de incidencia respecto al número total de plantas evaluadas. Se observó clorosis en la mayoría de las hojas, distorsión de las hojas apicales, mosaico asevero, deformación de hojas, reducción de lámina foliar y en algunos casos anillos cloróticos en los frutos. Estos resultados, refuerzan la susceptibilidad del cultivo coincidiendo con lo informado por Marín *et al.* (2010). Las plantas de *Carica papaya* L. inoculadas mecánicamente desarrollaron síntomas de aclareo de nervaduras (Fig. 1), manchas cloróticas (Fig. 2), deformación (Fig. 3), mosaico severo y reducción de lámina foliar (Fig. 4) y hoja filiforme (Fig. 5).



**Figura 1.** Aclareo de nervaduras, 35 días después de la inoculación.



**Figura 3.** Deformación de hoja ,35 días después de la inoculación.



**Figura 2.** Manchas cloróticas, 25 días después de la inoculación.

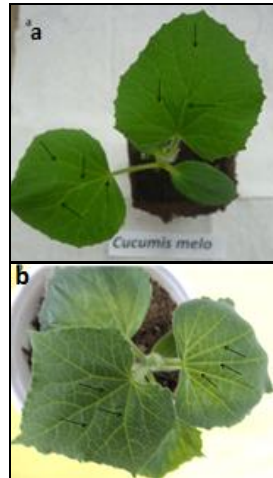


**Figura 4.** Mosaico severo y reducción de lámina foliar, 45 días después de la inoculación.



**Figura 5.** Hoja filiforme, 45 días después de la inoculación.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Kelaniyangoda y Madhubashini (2008), Fribourg (1984), Vegas *et al.* (1985), González *et al.* (2003) y Marín *et al.* (2010) para *Papaya ringspot virus*. Ninguno de los aislamientos virales produjo síntomas en las especies *Chenopodium murale*, *Chenopodium amaranticolor* y *Chenopodium quinoa* (Chenopodiaceae) especies citadas en la literatura mundial como indicadores de lesiones locales para este virus (Shuka *et al.*, 1994) y resultaron negativos en la prueba de NCM-ELISA. Sin embargo, las Cucurbitaceas: *Cucumis melo* “melón”, *C. sativus* “pepinillo” y *Cucurbita pepo* “zapallito italiano”, presentaron clorosis sistémica (Fig. 6) y dieron resultado positivo a la prueba de NCM-ELISA (Fig. 7). Todas las muestras de *Carica papaya* “papaya” y *Cucumis sativus* “pepinillo” inoculadas y que reprodujeron los síntomas de PRSV, resultaron positivas a este virus con la técnica de RT-PCR (Fig. 8).

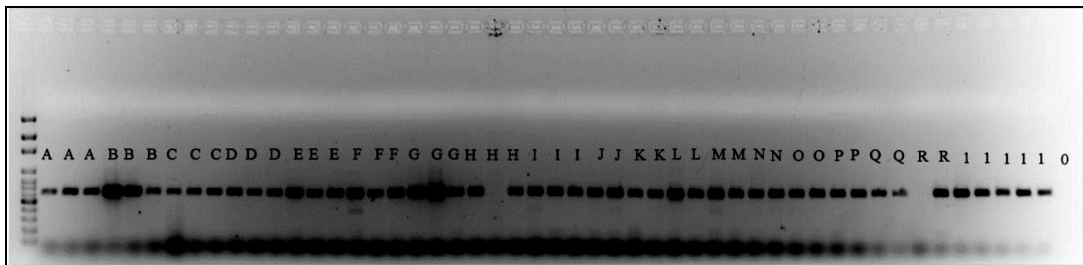


**Figura 6.** (a) *Cucumis melo* L. y (b) *Cucumis sativus* L.; mostrando clorosis sistémica, 15 días.



**Figura 7.** Prueba de NCM-ELISA de las plantas indicadoras, para el virus de la mancha anillada del papaya (PRSV).

Dónde: Savia de hojas de: A: *Cucumis melo* “melón”, B: *Cucumis sativus* “pepinillo”, C: *Cucurbita pepo* “zapallito italiano”, D: *Chenopodium quinoa*, E: *Chenopodium amaranticolor*, F: *Chenopodium murale*, Control +: Positivo (Savia infectada con *Papaya ringspot virus*), Control -: Negativo (Savia libre de virus).



**Figura 8.** Prueba RT-PCR para el virus de la mancha anillada del papaya (PRSV).

Dónde: Savia de hojas de *Carica papaya* infectadas con material procedente de los sectores: A: El Algodonal (Paiján); B: La Viña (Chepén) en La Libertad; C: El Progreso (Pátapo); D: Alican (Monsefú); E: Tranca Sasape (Tucume) en Lambayeque; F: San Pedrillo (Tambogrande); G: San Lorenzo (Tambogrande); H: Huápalas (Chulucanas) en Piura; I: Urcos (Corrales) en Tumbes. Savia de hojas de *Cucumis sativum* infectadas con material procedente de los sectores: J: El Algodonal (Paiján); K: La Viña (Chepén) en La Libertad; L: El Progreso (Pátapo); M: Alican (Monsefú); N: Tranca Sasape (Tucume) en Lambayeque; O: San Pedrillo (Tambogrande); P: San Lorenzo (Tambogrande); Q: Huápalas (Chulucanas) en Piura; R: Urcos (Corrales) en Tumbes. 1: Control Positivo (Savia infectada con PRSV); 0: Control Negativo (Savia libre de virus).

La técnica serológica de NCM-ELISA (Fig. 7) y molecular de RT-PCR (Fig. 8) permitieron determinar que el virus que afecta las plantaciones de papaya en el norte del Perú, es el virus de la mancha anillada (PRSV). Las mismas técnicas fueron utilizadas por Tenorio *et al.* (2007); Marín *et al.* (2010) para demostrar la presencia del virus PRSV en los departamentos de Junín, Huánuco y San Martín. Asimismo, Sánchez de Luque y Martínez-López (1998); Chiriboga (2000); Noa-Carranza *et al.* (2007); Cabrera *et al.* (2009); usaron RT-PCR para diagnosticar la presencia del PRSV en Colombia, Honduras, México y Cuba, respectivamente.

#### 4. Conclusiones

Los síntomas característicos que produjo el virus de la mancha anillada del papayo (PRSV) en *C. papaya* L. fueron manchas cloróticas, mosaico severo, aclareo de nervaduras, deformación, reducción de lámina foliar y hojas filiformes, estrías y manchas aceitosas en tallos y peciolo.

La técnica molecular de RT-PCR permitió determinar que el virus que afecta las plantaciones de papaya en el norte del Perú, es el virus de la mancha anillada del papayo (PRSV).

El rango de hospederos de los aislamientos virales obtenidos en esta investigación estuvo restringido a las especies *Carica papaya* “papaya”, *Cucumis melo* “melón”, *Cucumis sativus* “pepinillo” y *Cucurbita pepo* “zapallito italiano”.

#### 5. Referencias bibliográficas

Brunt, A.; Crabtree, K.; Gibbs, A. 1990. Viruses of tropical plants. CAB International. Redwood Press Ltd. Melksham. Wiltshire. 707 p.  
Cabrera, D.; Sosa, R.; Portal, O.; Alburquerque, Y.; González, J.; Hernández, R. 2009 Alterations induced by *Papaya ringspot potyvirus* on chlorophyll content

in papaya (*Carica papaya* L.) leaves. Fitosanidad 13: 125-126.  
Chiriboga, G. 2000. Caracterización del cultivo de papaya como producto con potencial para exportación, con énfasis en el diagnóstico molecular y serológico de enfermedades. Proyecto especial del programa de Ing. Agrónomo. El Zamorano, Honduras, 75 p.  
CMI/AAB. 1994. Descriptions of plant viruses: Papaya Ringspot Virus. Surrey, England. N° 292.  
Fribourg, C.E. 1984. El virus de la mancha anillada del papayo en el Perú. Fitopatología 19 (2): 46.  
Gonsalves, D. 1998. Control of *Papaya ringspot* virus in papaya: a case study. Annual Review of Phytopathology 36: 415-437  
González, A.; Trujillo, G.; Vegas, A. 2003. Uso de hospedantes diferenciales para la identificación de cepas del virus de la mancha anillada de la lechosa (PRSV). Revista Mexicana de Fitopatología 21(1): 67-70.  
INIA. 2010. INIA estudia solución a arrasadora plaga en papaya. Disponible en: <http://tiempoagrario.blogspot.pe>  
Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP). 2010. Guía técnica del cultivo de papaya. 38p.  
Kelaniyangoda, D.; Madhubashini, L. 2008. Indicator plants: Tools for detecting *Papaya ring spot* potyvirus and *Cucumber mosaic* Cucumovirus. University of Peradeniya Sri Lanka. Journal of Food and Agriculture 1(2): 64-69.  
Marín, J.; Alpartida, C.; Tenorio, J. 2010. Brote reciente de la mancha anillada del papayo en el Perú. XXI congreso Peruano de Fitopatología. Tarapoto-Perú.  
Marys, E.; Carballo, O.; Izaguirre, M. 2000. Ocurrence and relative incidence of viruses infecting papaya in Venezuela. Annals of Applied Biology 136: 121-124.  
Ministerio de Agricultura (MINAG). 1982. Reunión de coordinación para analizar la problemática fitosanitaria del cultivo del papayo en la zona central de Perú. 2p.  
Noa-Carranza, J.; Gonzales-De-Leon, D.; Silva-Rosales, L. 2007. Caracterización molecular de un aislamiento severo del virus de la mancha anular de la papaya en México y su relación con otros aislamientos. Virus Genes 35: 109-117.  
Purcifull, D.; Edwarson, J.; Heibert, E.; Gonsalves, D. 1984. Papaya ringspot virus No. 292 (revised N° 84). In: Descriptions of Plants Viruses. England. Kew Surrey. CMI/AAB. 8p.  
Rieger, M. 2006. Introduction to Fruit Crops. Haworth Press, Binghamton, New York. 464 p.  
Sánchez de Luque, C.; Martínez-López, G. 1998. El virus de la mancha anular de la papaya (*Papaya Ringspot* Potyvirus, PRSV) en Colombia. Universidad de Caldas, Manizales. Colombia. Virologia, Julio N° 17.  
Shuka, A.; Ward, C.; Brunt A. 1994. The potviridae. CAB. International. Wallingford, UK. 516 p.  
Tenorio, J.; Salazar, J.; Fuentes, S.; Aguilar, C. 2007. Integrated management of papaya ringspot virus (PRSV) in Peru. 10 th Plant Virus Epidemiology Symposium, ICRISAT, India.  
Vegas, A.; Cermeli, M.; Trujillo, G. 1985. Importancia, distribución e incidencia de los virus que afectan a la lechosa (*Carica papaya*) en algunas zonas productoras del país. Agronomía Tropical (Maracay) 14: 213-237.