

## Diagnóstico y caracterización biológica de un aislado del Virus de la Mancha Anular de la Papaya (PRSV-P) procedente de Cienfuegos, Cuba

### Diagnostic and biological characterization of a *Papaya Ringspot Virus* (PRSV-P) isolate from Cienfuegos, Cuba

Dariel Cabrera<sup>1\*</sup>; Maylin Cruz<sup>2</sup>; José E. González<sup>3</sup>; Ricardo Hernández<sup>4</sup> y Orelvis Portal<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

<sup>2</sup>Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera a Maleza km 2,5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT). Apdo. 6, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

<sup>4</sup>Centro de Estudio para la Transformación Agraria Sostenible (CETAS). Universidad de Cienfuegos, Carretera a Rodas km 3, Cienfuegos, Cuba.

<sup>5</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas Carretera a Camajuaní km 5,5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

E-mail: [dcabreram@uclv.edu.cu](mailto:dcabreram@uclv.edu.cu)

El Virus de la Mancha Anular de la Papaya (PRSV-P) aparece en muchos países tropicales y subtropicales donde se cultiva la papaya (Bateson *et al.*, 1994) y constituye el mayor factor limitante de su producción en todo el mundo (Purcifull *et al.*, 1984). En Cuba, su presencia fue registrada por Ivancheva-Gabrovska *et al.* (1967), con incidencias altas (80-99 %), en las zonas occidentales y menores hacia las regiones orientales (Fariñas y López, 1986); lo cual trajo como consecuencia la destrucción de la mayoría de las plantaciones.

El conocimiento epidemiológico de los posibles aislamientos que se puedan presentar en una región o país, es un aspecto básico para el estudio de la distribución y manejo de este virus pues, según Tennant *et al.* (1994), existen plantas transgénicas con niveles elevados de resistencia al virus en determinadas regiones, que manifiestan susceptibilidad frente a aislados de otras zonas geográficas. En Cuba, solo han sido biológicamente analizados e identificados dos aislados verdaderos PRSV-HA (González *et al.*, 1988) y PRSV-VC (Hernández, 1994) correspondientes a La Habana y Villa Clara, respectivamente. No obstante, está registrada la secuencia de la proteína de la capsida (CP) para aislados del PRSV-P colectados en cinco provincias, incluyendo las ya mencionadas. (Portal *et al.*, 2006; Arocha y Jones, 2007)

Con el objetivo de identificar y caracterizar un aislado

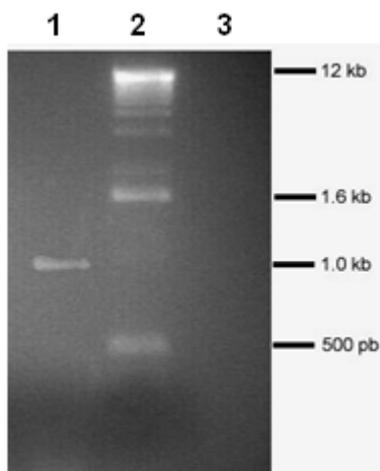
del PRSV-P colectado en plantaciones de papaya en la provincia de Cienfuegos, se tomaron muestras de hojas de papaya, cultivar Maradol roja, con los síntomas característicos descritos por Jensen (1949) y Conover (1964).

La detección viral se realizó mediante el método ELISA (Clark y Adams, 1977), a través del uso de un sistema comercial para la detección del PRSV (Agdia). Para la identificación por RT-PCR, se realizó una extracción de ARN total de las hojas de papaya con síntomas de la enfermedad a través del sistema comercial *RNAeasy® Plant Mini Kit* (Qiagen). Se utilizó, además, el sistema comercial *Access RT-PCR System* (Promega) y oligonucleótidos diseñados para la posterior amplificación del fragmento deseado a partir del ARN extraído.

Para dar seguimiento al desarrollo de la enfermedad producida por este aislado de Cienfuegos (PRSV-CF), se realizó una inoculación de forma mecánica en plantas jóvenes de papaya cultivar Maradol roja. Con este propósito, se tomaron tres hojas expandidas a partir de la tercera hoja desde el ápice (Cruz, 2007) y se utilizó carborundum (600 mesh) como abrasivo. El inóculo utilizado se obtuvo como resultado de la maceración del tejido vegetal (hojas de papaya con síntomas de la enfermedad) en una dilución de 1:10 (peso/volumen) en tampón sodio-potasio 0,01 M (pH 7.0) (Bau *et al.*, 2003) y sulfito de sodio 0,1 %. Se utilizó como testigo, con el fin de establecer una

comparación, el aislado verdadero PRSV-VC.

La muestra analizada resultó positiva al diagnóstico serológico en comparación a una muestra sana de papaya. Como resultado de la reacción de RT-PCR se logró la amplificación de un fragmento de ADN de aproximadamente 850 pares de base (pb), que se corresponde con el tamaño esperado correspondiente a la región que codifica para la CP del virus. (Figura 1)



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa 1,0 %. Fragmento de ADN obtenido como resultado de la reacción de RT-PCR a partir del ARN obtenido de hojas de papaya. Línea 1: Muestra con síntomas de la enfermedad producida por el PRSV colectada en la provincia de Cienfuegos, línea 2: Marcador de peso molecular (1 Kb DNA ladder, Gibco BRL®) y línea 3: Muestra de papaya sana

Los síntomas que produce el PRSV son variables y dependen en gran medida del aislado viral. El aislado severo de Villa Clara (Figura 2) mostró diferencias claramente visibles con el aislado procedente de Cienfuegos (Figura 3) en cuanto a la sintomatología producida y momento de aparición.



**Figura 2.** Mosaico y deformación inducidos por el PRSV-VC en hojas de papaya cultivar Maradol roja

El primer síntoma descrito para ambos aislados es un mosaico ligero, que coincide con lo descrito por Hernández (1994) y Cruz (2007) para el PRSV-

VC, con la manifestación sintomatológica descrita hasta el grado de filiformidad.



**Figura 3.** Mosaico ligero inducido por un aislado PRSV-CF en hojas de papaya cultivar Maradol roja

Los primeros síntomas, en las plantas inoculadas con el PRSV-VC, aparecieron en la cuarta semana después de la inoculación y luego alcanzó un estado severo de filiformidad. Sin embargo, para el aislado PRSV-CF se observó un retardo en la aparición de los síntomas. Los mismos se iniciaron a los 43 días después de la inoculación y se presentaron como un mosaico leve y ligera deformación de las hojas, después de las 12 semanas. Las infecciones causadas por este aislado en las plantaciones detectadas, no alcanzaron la severidad descrita para otros aislados ya caracterizados en otras provincias del país (La Habana y Villa Clara).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arocha, Y. and Jones: Potyvirus identified in papaya in the 2007 survey in Cuba, *GenBank*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2007.
2. Bateson, M.F.; J. Henderson; W. Chaleeprom; A.J. Gibbs *et al.*: "Papaya ringspot potyvirus: isolate variability and the origin of PRSV type P in Australia." *Journal of General Virology*, 75: 3547-3553, 1994.
3. Bau H.J.; Y.H. Cheng; T.A. Yu; J.S. Yang and S.D. Yeh: "Broad-spectrum resistance to different geographic strains of Papaya ringspot virus in coat protein gene transgenic papaya," *Phytopathology*, 93:112-120, 2003.
4. Clark, M.F. and A.N. Adams: "Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses," *Journal of General Virology*, 34: 475-483, 1977.
5. Conover, R.A.: "Distortion ringspot, a severe virus

disease of papaya in Florida,” *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 77: 440-444, 1964.

Recibido: 12/Septiembre/2007

Aceptado: 28/Noviembre/2007

6. Cruz, M.: Evaluación de la respuesta a la inoculación con el Virus de la Mancha Anular de la Papaya de plantas transgénicas de papaya (*Carica papaya* L.) variedad Maradol roja en condiciones semicontroladas. *Tesis presentada en opción al grado de Master en Agricultura Sostenible*, UCLV, Cuba, 2007.

7. Fariñas, M.E. y E. López: Enfermedades virales en diferentes localidades productoras de frutabomba en Cuba. *Simposio de Citricultura Tropical*, La Habana, Cuba, 1986.

8. González, G.; Y. Mejías y D. Rodríguez: “Virus de la Mancha Anular de la Fruta bomba (*Papaya Ring Spot Virus*) en Cuba,” *CIDA. Prot. Plant.* 2 (3), 1988.

9. Hernández, R.: Estudio sobre el Virus de la Mancha Anular de la Fruta bomba (*Carica papaya* L.), señalización de vectores, control e integración con otras medidas fitosanitarias. *Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas*, 113 pp., 1994.

10. Ivancheva-Gabrovska, T.; A.S. Valdivieso; A. Bécquer; B. Sánchez: “Las enfermedades virales de la frutabomba (*Carica papaya* L.)” *Revista Agricultura*, 1: 1-21, 1967.

11. Jensen, D.D.: “Papaya virus diseases with special reference to papaya ringspot,” *Phytopathology*, 39: 191-211, 1949.

12. Portal, O.; D. Cabrera; A. Sánchez; A.L. Darías; J.E. Gonzáles and R. Gómez: “Molecular characterization of two Cuban isolates of the *Papaya Ringspot Virus* by means of coat protein analysis,” *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 71:1203-1205, 2006.

13. Purcifull, D.; J. Edwardson; E. Hiebert; D. Gonsalves,: *Papaya ringspot virus. CMI/AAB Descr. Plant Viruses*, No. 209, 8 pp., 1984.

14. Tennant, P.F.; C. Gonsalves; K.S. Ling; M. Fitch; R. Manshardt; J. L. Slightom; D. Gonsalves: Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathology* 84:1359-1366, 1994.