



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA CUENCA DEL PAPALOAPAN

INOCULACIÓN DEL PRSV-p A PLANTAS DE PAPAYO Y SU TEMPRANA IDENTIFICACIÓN CON PCR BAJO INVERNADERO

Tesis que presenta:

CRUZ FRANCO JOSÉ

Como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERÍA EN AGRONOMÍA

**Tuxtepec, Oaxaca.
Marzo de 2018**



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE
LA CUENCA DEL PAPALOAPAN



COLEGIO DE POSTGRADUADOS,
CAMPUS VERACRUZ

INOCULACIÓN DEL PRSV-p A PLANTAS DE PAPAYO Y SU TEMPRANA IDENTIFICACIÓN CON PCR BAJO INVERNADERO

JOSÉ CRUZ FRANCO
No. de control: 13810074

ASESOR INTERNO:
Ing. Enrique Cavazos Arizpe

ASESOR EXTERNO:
Dr. Francisco Osorio Acosta

PERIODO DE REALIZACIÓN:

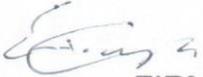
JULIO – DICIEMBRE 2017

SAN BARTOLO, TUXTEPEC, OAX. MARZO 2018

El presente trabajo de tesis, del C. JOSÉ CRUZ FRANCO, denominado INOCULACIÓN DEL PRSV-P A PLANTAS DE PAPAYO Y SU TEMPRANA IDENTIFICACIÓN CON PCR BAJO INVERNADERO, que se desarrolló en el Colegio de Postgraduados Campus Veracruz, fue revisado y aprobado por el:

DIRECTOR INTERNO

Ing. Enrique Cavazos Arizpe



FIRMA

DIRECTOR EXTERNO

Dr. Francisco Osorio Acosta



FIRMA

COLABORADOR DE TESIS

Ing. David Sósol Reyes



FIRMA

MARZO DEL 2018



San Bartolo, Tuxtepec, Oaxaca a 22/02/2018
ASUNTO: Dictamen de tesis aprobada.

ING. ANTELMO PÉREZ LEAL
DEPARTAMENTO ACADÉMICO
P R E S E N T E.

El comité de revisión de tesis del C. José Cruz Franco, asignado por la Academia de Agronomía del Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan de San Bartolo, Tuxtepec, Oaxaca, integrado por los CC. Ing. Enrique Cavazos Arizpe, MA. María del Rosario Salazar Nicolás y Ing. Margarito Peralta Cruz, habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo final titulado "INOCULACIÓN DEL PRSV-P A PLANTAS DE PAPAYO Y SU TEMPRANA IDENTIFICACIÓN CON PCR BAJO INVERNADERO", que se presenta como requisito parcial para obtener el título de Ingeniería en Agronomía, de acuerdo con las normas de elaboración de Tesis de licenciatura y posgrado vigentes en el Instituto; dictaminó su AUTORIZACIÓN para ser presentado en el Examen Profesional correspondiente.

ATENTAMENTE


ING. ENRIQUE CAVAZOS ARIZPE
DIRECTOR


M.A. MARÍA DEL ROSARIO SALAZAR
NICOLÁS
SECRETARIO


ING. MARGARITO PERALTA CRUZ
VOCAL



El presente proyecto de tesis, del C. José Cruz Franco, denominado INOCULACIÓN DEL PRSV-P A PLANTAS DE PAPAYO Y SU TEMPRANA IDENTIFICACIÓN CON PCR BAJO INVERNADERO, que se desarrolló en el Colegio de Postgraduados Campus Veracruz, fue revisado y aprobado para su impresión por el Honorable jurado integrado por:

PRESIDENTE

ING. ENRIQUE CAVAZOS ARIZPE



FIRMA

SECRETARIO

M.A. MARÍA DEL ROSARIO SALAZAR NICOLÁS



FIRMA

VOCAL

ING. MARGARITO PERALTA CRUZ



FIRMA

MARZO DEL 2018

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por el apoyo y la confianza absoluta que me brindaron para concluir con mis estudios, aun habiendo etapas difíciles en mi familia.

Al Colegio de Postgraduados Campus Veracruz por darme la oportunidad de trabajar durante mi tesis.

Al asesor de tesis por el compromiso de este trabajo, al Dr. Francisco Osorio Acosta por permitir formar parte de este proyecto.

Al Ing. David Sósol Reyes por el apoyo durante mi trabajo y a todos los amigos que colaboraron conmigo.

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a mi familia que gracias a su ayuda pude concluir mi carrera.

A mis padres Gregorio Paladio Cruz García y María Franco Velasco por el apoyo incondicional que me brindaron durante todo este tiempo.

De la misma manera a mis hermanos, Gerardo, Pedro y Sandra que con su ayuda y motivación logre salir adelante.

A mi pareja Blanca Bravo por el apoyo que nos brindamos siempre y el motivo de seguir adelante con nuestra pequeña Seydi.

De igual manera la dedico al Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan por ejercer mi carrera profesional en el Tecnológico.

ÍNDICE CONTENIDO

Página

AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.1. objetivo general.....	4
1.1.2. objetivo específico	4
1.2. HIPÓTESIS	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. GENERALIDADES DE LA PAPAYA.....	5
2.1.1. Origen y distribución de <i>Carica papaya</i> L.....	5
2.1.2. Descripción del cultivo	6
2.1.3. Importancia económica del cultivo.....	7
2.1.4. Principal problemática del cultivo	9
2.2. VIRUS DE LA MANCHA ANULAR DEL PAPAYO.....	10
2.2.1. Taxonomía	10
2.2.2. Etapas de la infección viral de <i>Potyvirus</i>	11
2.2.3. Multiplicación del virus.....	12
2.2.4. Movimiento.....	12
2.2.5. Sintomatología	13
2.2.6. Trasmisión del virus.....	14
2.3. ÁFIDOS.....	15
2.4. ANÁLISIS MOLECULAR.....	16

2.4.1. Extracción de RNA.....	17
2.4.2. Electroforesis	17
2.5. TÉCNICA DE PCR.....	18
2.5.1. Qué es la PCR.....	19
2.5.2. Cómo funciona la PCR.....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO.....	22
3.2. SIEMBRA DE SEMILLAS DE PAPAYA.....	23
3.3. AISLAMIENTO DE UNA COLONIA DE ÁFIDOS LIBRE DE VIRUS.....	24
3.3.1. Pruebas de trasmisión viral.....	25
3.4. TRASPLANTE DE PAPAYO	27
3.5. INFECCIÓN DE PLANTAS DE PAPAYO EN INVERNADERO CON PRSV-p.....	28
3.6. MUESTREO DE PLANTAS DE PAPAYO.....	29
3.7. DETECCIÓN MOLECULAR DEL PRSV-P	30
3.7.1. Protocolo de extracción de RNA.....	31
3.7.2. Electroforesis de RNA.....	32
3.7.3. Reversa Transcriptasa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).....	33
3.7.4. Primers utilizados	34
3.7.5. Ciclados de la PCR.....	34
4. RESULTADOS	36
4.1. GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y CRÍA DE PULGONES	36
4.2. DETECCIÓN MOLECULAR DEL PRSV-P	36
4.2.1. Extracción de RNA de la fuente de inóculo	36
4.2.2. Extracción de RNA de plantas de invernadero.....	37
4.2.3. RT-PCR de fuente de inóculo e invernadero.....	38
5. CONCLUSIONES.....	42
6. BIBLIOGRAFÍA.....	43
APÉNDICE	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estacionalidad de exportación de papaya, promedio 2011-2016.	7
Figura 2. Principales países exportadores de papaya a nivel mundial en el 2016.....	8
Figura 3. Etapas del virus después de haber entrado en la célula.	11
Figura 4. Ubicación del estudio	22
Figura 5. Siembra de semillas de papayo en charolas.	23
Figura 6. Pasos para aislar una colonia de pulgones libres de virus.	24
Figura 7. Trasmisión del PRSV-p por medio del vector <i>Aphis nerii</i>	26
Figura 8. Mezcla de sustrato Pindstrup® y tierra negra.	27
Figura 9. Trasplante de papayo en invernadero con maya antiáfida.	28
Figura 10. Infección del PRSV-p a plantas de papayo en invernadero... ..	29
Figura 11. Plantas muestreadas de invernadero.	30
Figura 12. Virus del PRSV-p se muestra en el gel de agarosa.	38
Figura 13. Planta 46 con PRSV-p.	50
Figura 14. Planta 59 con PRSV-p.	51
Figura 15. Planta 90 con PRSV-p.	51
Figura 16. Planta 96 con PRSV-p.	52
Figura 17. Planta 98 y 100 con PRSV-p.	52

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Agentes utilizados en la mezcla para el PCR	33
Cuadro 2. Porcentaje total según el nivel de absorbancia.....	36
Cuadro 3. Nivel de absorbancia de 100 plantas	37
Cuadro 4. Pruebas moleculares RT-PCR de la fuente de inóculo	39
Cuadro 5. Resultados de 100 plantas en cinco muestreos diferentes después de su inoculación.....	40
Cuadro 6. Extracción de ácidos nucleicos de la fuente de inóculo	46
Cuadro 7. Extracción de ácidos nucleicos de 100 plantas de papayo....	46

RESUMEN

El virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-p) afecta en muchos países tropicales y subtropicales, es el mayor obstáculo en la producción. En México, se considera la principal enfermedad en todos los estados productores de papaya. Por lo que la detección temprana es básica para evitar la diseminación de la enfermedad por lo que surge la necesidad de este estudio biológico y molecular donde se busca determinar el tiempo de detección del virus de la mancha anular del papayo (PRSV-p) después de la inoculación con *Aphis nerii* en condiciones de invernadero, a través de PCR. Se obtuvo una fuente de inóculo con PRSV-p para la infección de 100 plantas de papayo, se realizaron cinco muestreos en diferentes fechas después de haber transcurrido 8, 11, 14, 17 y 20 días después de su inoculación. En las pruebas moleculares se realizó a partir de RNA total extraído de 30 mg de tejido foliar, seguida por una reacción reversa transcriptasa (RT), el ADNc obtenido se amplificó con la técnica de "Reacción en la Cadena de la Polimerasa" (PCR), las reacciones fueron realizadas con base a los primers específicos para PRSV-p reportados en la literatura. De 100 plantas analizadas resultaron 6 plantas con el virus, éstas representan un 6% de todas las muestras, lo que indica que las plantas al estar pequeñas de edad el virus no se expande demasiado rápido, así como también la técnica (PCR) es muy sensible a contaminarse, sin embargo, la recombinación genética puede ser la diversificación viral o evolución del PRSV-p puede intervenir en el análisis.

ABSTRACT

The papaya ring spot virus (PRSV-p) affects in many tropical and subtropical countries, it is the biggest obstacle in the production. In Mexico, it is considered the main disease in all papaya-producing states. Therefore, early detection is essential to avoid the spread of the disease, which is why there is a need for this biological and molecular study to determine the detection time of the papaya ring spot virus (PRSV-p) after the inoculation with *Aphids nerii* under greenhouse conditions, through PCR. A source of inoculum with PRSV-p was obtained for the infection of 100 papaya plants, five samplings were made on different dates after having passed 8, 11, 14, 17 and 20 days after their inoculation. In the molecular tests was performed from total RNA extracted from 30 mg of tissue, followed by a reverse transcriptase reaction (RT), the cDNA obtained was amplified with the technique of "Polymerase chain reaction" (PCR), the reactions were carried out based on the specific primers for PRSV-p reported in the literature. Of 100 plants analyzed 6 resulted virus, these represent 6% of all the samples, Which indicates that the plants being small of age the virus do not expand too fast, as well as the technique (PCR) is very sensitive to contamination, however, genetic recombination may be viral diversification or evolution of PRSV-p may intervene in the analysis.

1. INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es una planta propia de América Tropical (Rieger, 2006). Es una planta que pertenece a la familia Caricaceae que está constituida por seis géneros, dentro de los que se incluye *Carica papaya* (Mishra *et al.*, 2007). Ésta sola especie resulta la más importante desde el punto de vista económico (Badillo, 2000).

Con base en estadísticas del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2017), la producción de papaya en México en el 2016 fue de 951.92 M/t.

Sin embargo, el cultivo presenta varios problemas fitosanitarios que han causado bajo rendimiento y mala calidad de los frutos en muchas zonas productoras del país, entre ellos las enfermedades producidas por virus que son las más peligrosas.

Las disminuciones en los rendimientos en este cultivo están asociadas principalmente a enfermedades virales, fúngicas y procariotas. Las enfermedades producidas por virus, transmitidos por insectos vectores de manera no persistentes son las que resultan las más peligrosas.

El Virus de la Mancha Anular del Papayo (PRSV-p) es una de las enfermedades más destructivas en *C. papaya* a nivel mundial. El virus (PRSV-p), es el principal problema que limita la producción a nivel nacional e internacional en zonas tropicales y subtropicales, ésta enfermedad causa mosaico severo, distorsión de las hojas, anillos en la fruta y manchas aceitosas en la parte superior de los tallos y los peciolo, impidiendo el crecimiento de la planta y reduciendo de manera drástica el tamaño y calidad de los frutos (Yeh *et al.*, 2007).

Por los daños que causa el PRSV en las plantaciones, puede limitar la producción de grandes áreas a solo una cosecha (Gonsalves, 1998). Las plantaciones pueden comenzar la producción luego de ocho meses del trasplante y puede continuar produciendo de manera continua durante dos o tres años bajo condiciones normales. Pero debido a esta enfermedad viral las cosechas no se extienden más allá de cuatro meses.

Esta enfermedad es transmitida en campo por áfidos alados de varias especies (*Hemíptera: Aphididae*). En condiciones de laboratorio se utilizan las hembras adultas ápteras para estudios de transmisión viral, ya que son más fáciles de manipular. Sin embargo, pocos estudios se han realizado para saber el tiempo de transmisión viral después de su inoculación.

Surge la necesidad del estudio biológico y molecular, donde se obtendrá una fuente de inóculo con "virus de la mancha anular del papayo" PRSV-

p para la infección de 100 plantas de papayo bajo invernadero, con transmisión viral con base en pulgones *Aphis nerii*.

Se empleará la técnica "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR), una de las estrategias empleadas en los últimos años, con esto lograremos identificar qué plantas presentan el virus después de haber transcurrido 8, 11, 14, 17 y 20 días después de su inoculación y el porcentaje de la enfermedad del PRSV-p relacionada con la edad de la planta.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Determinar el tiempo de detección del virus de la mancha anular del papayo (PRSV-p) después de la inoculación con *Aphis nerii* en condiciones de invernadero a través de la técnica "Reacción en cadena de la Polimerasa" (PCR), y el porcentaje de plantas de papayo que presenta la enfermedad después de ser inoculadas.

1.1.2. Objetivo específico

Identificar las plantas de papayo con PRSV-p y relacionarla con la edad de la planta y los días después de su inoculación.

1.2. HIPÓTESIS

El PRSV-p se detecta en plantas de papayo por medio de la técnica de PCR antes que se presenten los síntomas de la enfermedad.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. GENERALIDADES DE LA PAPAYA

2.1.1. Origen y distribución de *Carica papaya* L.

La papaya (*Carica papaya* L.) es una planta propia de América Tropical (Rieger, 2006). Es una planta que pertenece a la familia *Caricaceae* que está constituida por seis géneros, dentro de los que se incluye *Carica papaya* (Mishra *et al.*, 2007). La planta se cultiva extensamente en los trópicos y subtrópicos, aprovechándose la fruta fresca o procesada, así como el látex y sus derivados. Otros autores mencionan que su origen se ha situado en varios países (Wei y Wing, 2008).

El cultivo de la papaya se ha distribuido ampliamente a lo largo de trópicos y subtrópicos (Wei y Wing, 2008). Se supone que sus semillas se distribuyeron por el Caribe y sureste asiático durante las exploraciones en el Siglo XVI, y luego se extendió rápidamente a India, el Pacífico y África (Villegas, 1997).

2.1.2. Descripción del cultivo

La planta de papaya es considerada perenne, pero de vida corta. Las hojas parecidas a la palma emergen del tallo, sostenidas por largos pecíolos. Las flores se desarrollan en las axilas de las hojas, teniendo un olor agradable. Los pétalos miden de 2.5 a 5.1 cm (Chia, *et al.*, 1989).

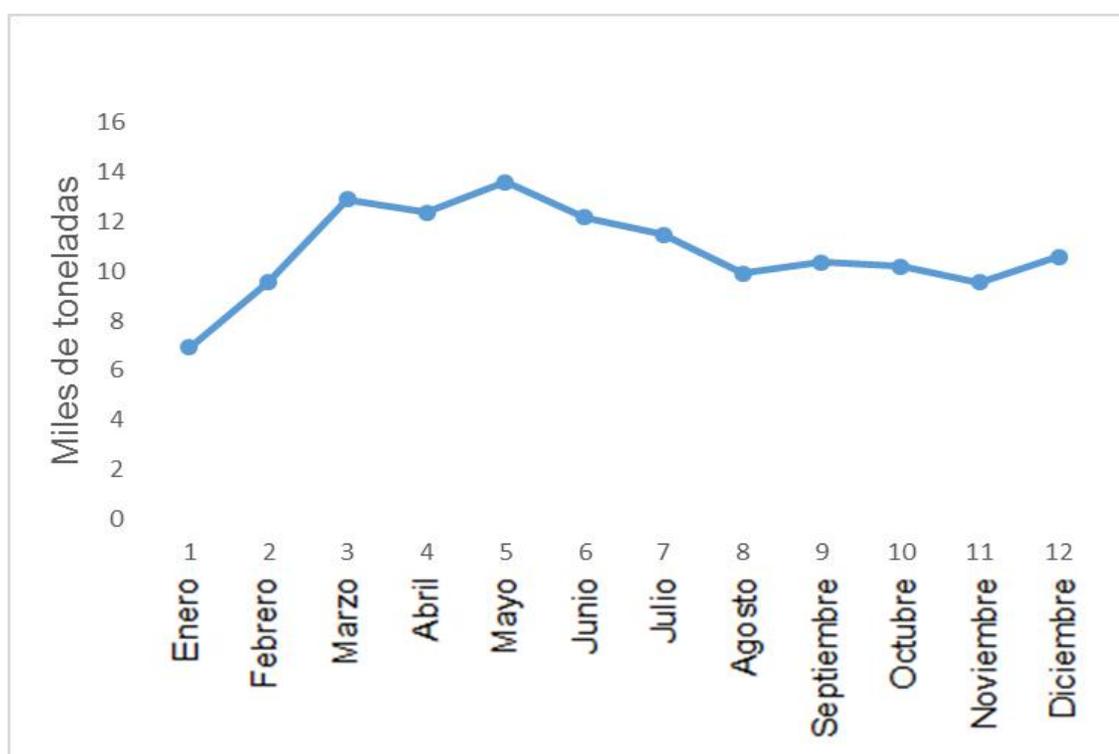
Existen tres tipos de planta: las hermafroditas, hembras y machos. La planta hembra siempre producirá flores femeninas y si no hubiera plantas masculinas o hermafroditas, esta no cuajaría su fruto (Pereira de Araujo, 1987). Al contrario, en las plantas masculinas que usualmente no producen frutos, en raras ocasiones tienen flores con expresiones femeninas pudiendo producir algunos frutos (Chia *et al.*, 1989).

El desarrollo de la papaya es rápido y su vida es de aproximadamente dos años, aunque puede vivir hasta 20. Presenta un solo tallo de crecimiento erecto que termina en un manojito de hojas, que puede medir entre 2 y 10 m de altura. Produce frutos maduros entre los 9 y 12 meses de plantadas las semillas. Comercialmente, se plantan entre 1 500 y 2 500 plantas/ha, con una producción anual de 56.7 a 136 t/ha. Los frutos se cosechan por uno a dos años, después las plantas dejan de ser económicamente rentables (Gonsalves, 1998).

2.1.3. Importancia económica del cultivo

El cultivo de papaya muestra gran importancia para las economías de muchos países subdesarrollados. Actualmente México es el quinto productor a nivel mundial, con la aportación del 6.2% de la producción (SIAP, 2017).

La estacionalidad de exportación muestra mayor flujo comercial al extranjero entre marzo y junio (Figura 1).

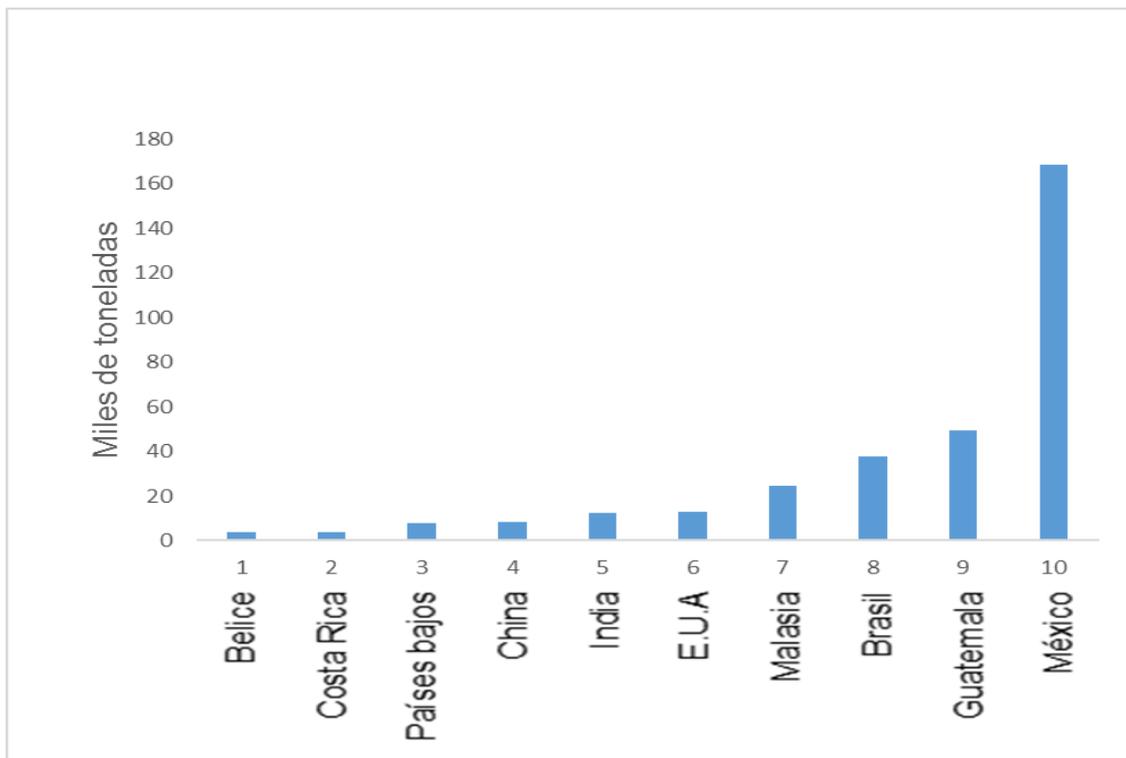


Fuente. SIAP, 2016.

Figura 1. Estacionalidad de exportación de papaya, promedio 2011-2016.

Actualmente se satisface al 100% los requerimientos nacionales con producción interna; asimismo, las importaciones mundiales han aumentado 39.26% en la última década, lo que ha generado un incremento en las exportaciones mexicanas principalmente con destino a Estados Unidos. México tiene una producción de 951.92 Mt, un consumo Nacional de 783.22 Mt, y de exportación un 168.70 Mt (SIAP, 2017).

México es el líder mundial de exportación de papaya (Figura 2), con una elevada brecha respecto de los otros principales proveedores (ITC, 2017).



Fuente. SIAP, 2017.

Figura 2. Principales países exportadores de papaya a nivel mundial en el 2016.

2.1.4. Principal problemática del cultivo

El cultivo de la papaya adquiere muchos problemas fitosanitarios en todas las regiones productoras del país, entre los principales problemas se encuentran los siguientes (Vázquez, 2009).

1. Presencia de enfermedades virosas, debido a la alta incidencia de plantas hospederas de virus e insectos vectores (pulgones y chicharritas).
2. Incidencia de enfermedades del follaje, flor y fruto, como antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) y mancha foliar (*Corynespora cassicola* Berk y Curt.).
3. Presencia de plagas colonizadoras del follaje y fruto como araña roja (*Tetranychus cinnabarinus* Boisd) y piojo harinoso (*Planococcus* sp.).
4. Presencia de hongos en el suelo del complejo *Phytophthora*, *Pythium* y *Rhizoctonia*, que ocasionan marchitez de plántulas y pudrición de raíz y cuello del tallo.
5. Falta de aplicación de la tecnología local disponible, lo que conduce a deficiencias en el uso y manejo adecuado de los insumos.

De acuerdo con la problemática citada, predominan las enfermedades ocasionadas por virus y hongos, por lo cual es muy importante prestar la máxima atención y monitoreo a los organismos causales de tales

enfermedades para su control y optimizar el rendimiento y calidad del cultivo del papayo.

2.2. VIRUS DE LA MANCHA ANULAR DEL PAPAYO

2.2.1. Taxonomía

Orden: *Unassigned*

Familia: *Potyviridae*

Género: *Potyvirus*

Especie: Papaya ringspot virus

El género *Potyvirus* su genoma es un ARN monocatenario de polaridad positiva de alrededor de 10 000 nucleótidos. Fue detectado en México en 1975 como causa de graves daños en los principales estados productores de papaya. Actualmente la familia *Potyviridae* incluye 176 especies diferentes que están clasificadas en 8 géneros: *Potyvirus*, *Brambyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Rymovirus* y *Tritimovirus* (Adams *et al.*, 2011).

Todos los virus de la familia presentan genomas monopartitos, a excepción de los pertenecientes al género *Bymovirus*, los cuales, si bien presentan un genoma bipartito, forman partículas virales filamentosas y

flexuosas al igual que el resto de miembros de la familia (López-Moya *et al.*, 2009).

2.2.2. Etapas de la infección viral de *Potyvirus*

Una infección comienza con la liberación del genoma viral dentro de una célula del huésped. Inmediatamente después el genoma es traducido, replicado y encapsidado, generando la progenie que dará lugar a un nuevo ciclo infeccioso. Después de haber entrado en la célula de la planta se desensambla, el genoma viral es traducido, luego la replicación del genoma y así sucesivamente (Figura 3) (Revers y García, 2015).

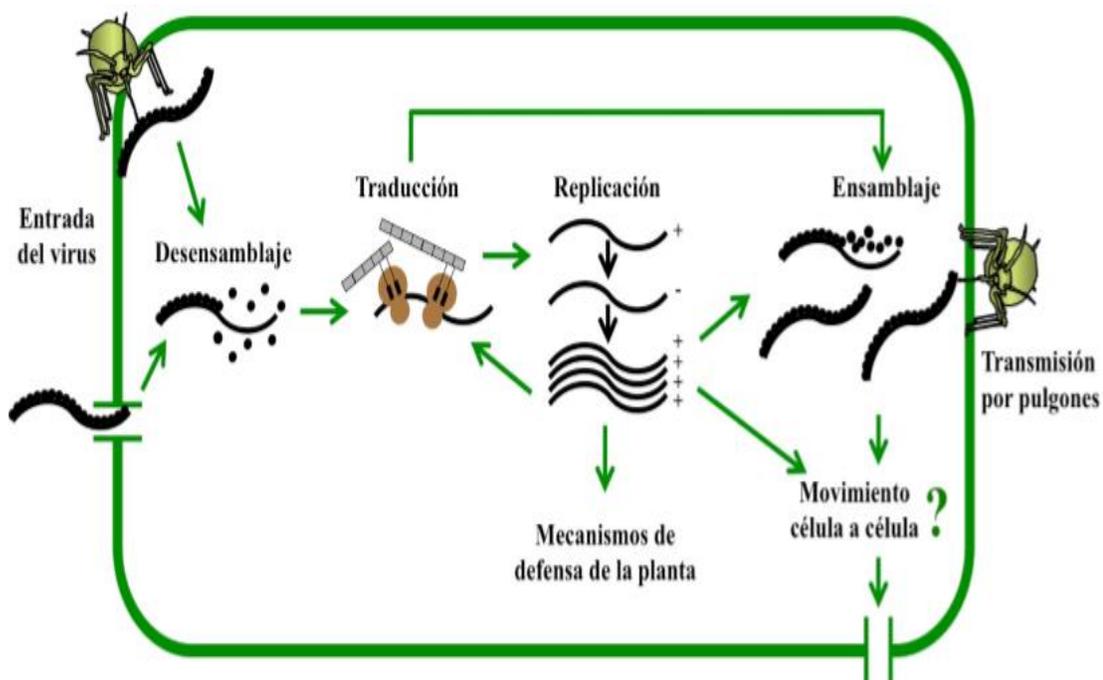


Figura 3. Etapas del virus después de haber entrado en la célula.

El movimiento a nuevas zonas de la planta y la evasión de los mecanismos de defensa del huésped son también etapas vitales que determinarán el éxito o fracaso de la infección.

2.2.3. Multiplicación del virus

Una vez que el virus ha entrado a la célula vegetal comienza un proceso complejo y poco caracterizado de desensamblaje. Como resultado, el genoma viral es liberado al citoplasma para ser posteriormente traducido. Entre los productos generados a partir de esta traducción se encuentra la RNA polimerasa viral (NIb), la cual utiliza el genoma del virus como molde para generar nuevas copias del mismo.

2.2.4. Movimiento

El movimiento de los virus con el objetivo de propagarse dentro del huésped, los virus se mueven primero intracelularmente hasta alcanzar los plasmodesmos, luego de célula a célula hasta alcanzar el tejido vascular, para, finalmente, poder diseminarse por toda la planta.

2.2.5. Sintomatología

La planta presenta síntomas variados de la enfermedad. Inicialmente se observan clorosis y moteados en las hojas más nuevas acompañados de aclaramiento de las nervaduras. Posteriormente se presentan mosaico y bolsas o vejigas en las hojas, lo que le da un aspecto rugoso o encarrujado a la lámina foliar. Cuando el ataque es severo ocurre la deformación de los folíolos y reducción de la lámina quedando restringida a las nervaduras principales (filiformes). Sobre el tallo, pecíolos y pedúnculos se observan manchas en forma de bandas, o irregulares, de color verde oscuro y de apariencia aceitosa. En los frutos estas manchas son en forma de anillos concéntricos. Así mismo pueden deformarse, pierden el aroma y presentan descenso en el contenido de sólidos solubles.

Las plantas afectadas en alto nivel se estancan en su desarrollo, por lo cual su crecimiento se retarda, las hojas formadas son pequeñas y el pecíolo se acorta. Las plantas de papaya son susceptibles en todas las edades y generalmente muestran síntomas 2 a 3 semanas después de la inoculación. Las plantas infectadas tempranamente no producen, pero raramente mueren. Sin embargo, algunos aislamientos causan marchitez y algunas veces muerte de árboles jóvenes (Redondo, 2003).

2.2.6. Trasmisión del virus

Los potyvirus se transmiten de manera no persistente por áfidos (Raccah *et al.*, 2001), pertenecientes al orden *Hemiptera*, familia *Aphididae* (Blackman y Eastop, 2007). La transmisión no persistente se caracteriza por períodos de adquisición e inoculación muy cortos, de segundos a minutos (Pirone y Perry, 2002). La forma de transmisión de los potyvirus favorece su rápida diseminación en zonas productoras con presencia de inóculo. *Aphis gossypii* es la especie con más frecuencia en las plantaciones y los áfidos pueden incidir durante los cinco primeros meses del ciclo del cultivo presentando el mayor índice de peligrosidad en los primeros tres meses.

Los áfidos normalmente no colonizan las plantas de papaya (Mora-Aguilera *et al.*, 1993) y los procesos de adquisición e inoculación del virus ocurren debido a las pruebas para alimentarse, durante el reconocimiento de sus plantas hospedantes, cuando visitan plantas infectadas y luego plantas sanas.

En México, se han informado varias especies de áfidos como potenciales transmisores del PRSV, entre los que sobresalen *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Aphis citricola*, *Aphis nerii* Boyer de Fonscolombe, *Aphis craccivora* Koch, *Uroleucon ambrosiae* Thomas y *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (García *et al.*, 1988; Nieto *et al.*, 1990).

2.3. ÁFIDOS

Los áfidos o pulgones se caracterizan por tener el cuerpo pequeño, globoso y blando. Aunque presentan una amplia diversidad de color, la mayoría de las especies son verdes. En el extremo dorsal de su cuerpo presentan prolongaciones llamadas cornículos y cauda que difieren entre las especies.

En una misma especie pueden existir individuos alados o ápteros, condición que varía de acuerdo al nivel de hacinamiento y probablemente a otros factores ambientales que modifican su comportamiento. Cuando están presentes las alas, son tanto o más largas que su cuerpo. Los áfidos normalmente se localizan en grupos sobre hojas y brotes nuevos, formando en algunos casos densas colonias. Los áfidos succionan savia con un aparato bucal en forma de estilete. Algunas especies de este grupo de insectos inyectan saliva en los tejidos vegetales pudiendo transmitir virosis y/o producir la deformación de hojas y brotes. Como ocurre en otros grupos de insectos que se alimentan de savia, los áfidos también excretan mielecilla que expelen al ambiente (Agropecuarias, 2011).

Esta sustancia tiene una gran diversidad de componentes entre los que destacan carbohidratos como glucosa, fructosa y sacarosa que atrae a numerosos insectos, en especial a hormigas.

Los ciclos de vida de los áfidos son complejos. Por lo general, las hembras son vivíparas y se reproducen por partenogénesis, ocasionalmente algunas especies tienen una fase sexuada y oviponen (Agropecuarias, 2011).

2.4. ANÁLISIS MOLECULAR

En la actualidad las técnicas moleculares desempeñan el papel protagónico en el diagnóstico de los *Potyvirus*. Estas técnicas son superiores a las inmunoquímicas en especificidad y sensibilidad, además de ofrecer mayores posibilidades de detección y brindar una información más completa sobre los patógenos en cuestión. Muchos han sido los métodos empleados hasta el momento, demostrándose su factibilidad y permitiendo aislar e identificar a más de 30 virus que afectan a cultivos de importancia económica. Entre ellas la Hibridación de Ácidos Nucleicos (HAN) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), han sido las de mayor aplicación para lograr estos propósitos (Louro *et al.*, 2000).

Para el análisis molecular de detección del PRSV-p proveniente de la familia *Potyviridae* del género *Potyvirus* con un solo componente de una molécula de RNA como genoma, se realizará extracción de RNA y se realiza la transcripción inversa para detectar el virus PRSV-p.

2.4.1. Extracción de RNA

La información genética de tales virus se encuentra bajo la forma de ADN, pero en este caso la información genética está codificada bajo forma de ARN. Una enzima asociada al virus, la transcriptasa inversa, crea ADN a partir de ARN para asegurar la replicación en una célula huésped.

Posteriormente a la extracción del ácido nucleico de interés es necesario evaluar la cantidad y calidad del mismo. Con una electroforesis en gel de agarosa se puede conocer la calidad de la muestra. Si el DNA no ha sufrido roturas se verá una única banda de alto peso molecular. Para el caso de muestras de RNA la corrida electroforética de preparaciones de buena calidad mostrará claramente los diferentes RNAs ribosomales y de transferencia.

2.4.2. Electroforesis

La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN o ARN según su tamaño.

Las muestras de ADN o ARN se cargan en pozos (ranuras) en un extremo de un gel y se aplica una corriente eléctrica para arrastrarlas a través del gel. Los fragmentos tienen carga negativa, por lo que se mueven hacia el electrodo positivo. Puesto que todos los fragmentos de ADN o ARN tienen la misma cantidad de carga por masa, los fragmentos pequeños

atraviesan el gel más rápido que los grandes. Cuando un gel se tiñe con un pigmento que se une al ADN, los fragmentos de ADN o ARN pueden verse como bandas.

El fundamento de esta técnica es la reorientación de las moléculas cuando cambia la dirección del campo eléctrico; en la electroforesis convencional las moléculas de ADN de gran tamaño quedan “atrapadas” en la malla que forma la agarosa en su avance a través del gel, pero la aplicación de dos campos eléctricos alternantes en ángulo permite una reorientación de las moléculas que de esta forma avanzaran un tramo más, antes de quedar de nuevo atrapadas. Cuanto más grandes son las moléculas mayores debe ser la duración de los campos eléctricos alternos para permitir la reorientación y en última instancia la separación de las mismas.

Además de la duración del tiempo de los pulsos, otros parámetros como la intensidad y el ángulo que forman los campos eléctricos determinan el rango de tamaños que pueden separarse (Peña, 2006).

2.5. TÉCNICA DE PCR

La técnica PCR se basa en el principio de la complementariedad de las bases de los ácidos nucleicos y la capacidad de síntesis del ADN por parte de una polimerasa. La PCR consiste en la síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos, por lo que se puede amplificar específicamente un segmento

determinado de ADN empleando dos cebadores que lo flanquean, para lo que se necesitan ciclos sucesivos de desnaturalización térmica del ADN, hibridación de los cebadores a las secuencias complementarias y extensión de los cebadores anillados mediante la enzima ADN polimerasa termoestable. Los productos de extensión son complementarios a los cebadores, como resultado en cada ciclo se duplica la cantidad de ADN sintetizada en el ciclo anterior, de forma que ocurre una amplificación exponencial del fragmento (González *et al.*, 2001).

En el caso particular de los agentes virales cuyo material genético está constituido por ARN se utiliza una variante de PCR denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc. Este método fue copiado de los retrovirus que usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN en ADN duplicarse en millones de partículas virales. El ADNc se utiliza cuando analizamos la expresión del ARNm de algún gen de interés (Velasquillo, 2013).

2.5.1. Qué es la PCR

PCR son las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa. La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la

bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79 °C a 85 °C), de ahí su nombre comercial más conocido: *taq* polimerasa.

Cuando se hace una reacción de PCR se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN y en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el ADN del organismo que se estudiara –donde se encuentra el fragmento que se desea sintetizar–, los oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleotidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de Mgcl₂, KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa) (Asuar, 2007).

Esta técnica tan ingeniosa tiene muchísimas aplicaciones distintas y se ha convertido en una herramienta muy importante en la biología molecular; sus aplicaciones van desde la genética de poblaciones, evolución molecular y genómica hasta la medicina forense (Asuar, 2007).

2.5.2. Cómo funciona la PCR

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión.

Desnaturalización. En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20 a 30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa estarán las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

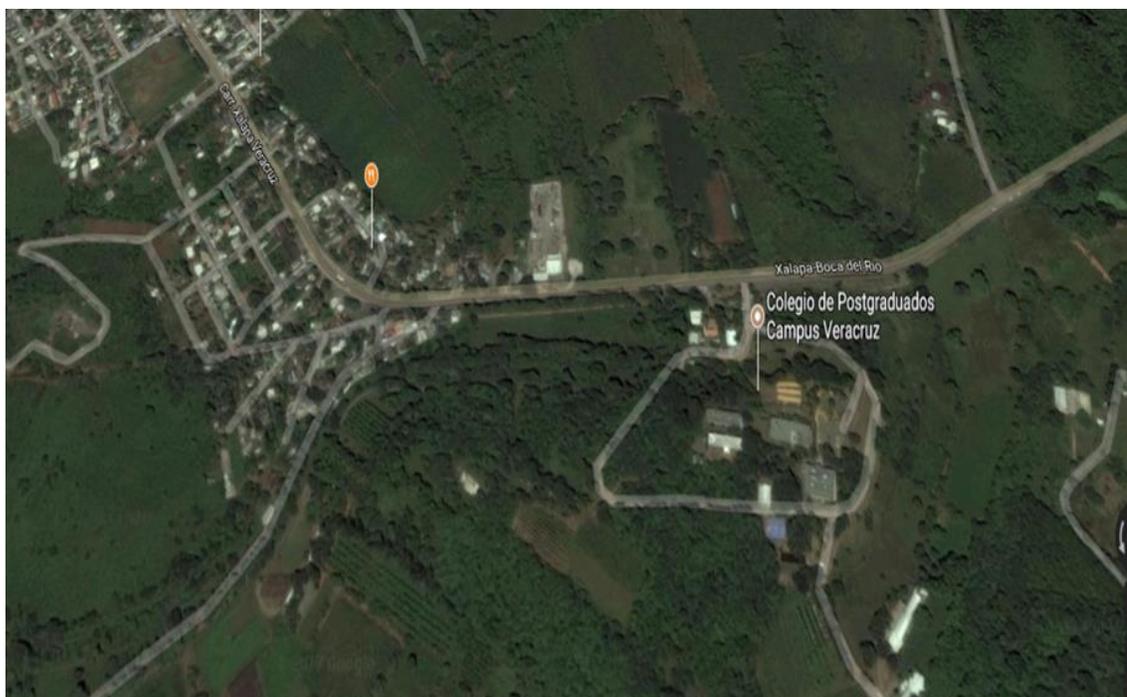
Hibridación. En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50 a 60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

Extensión. En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado las ampliaciones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (Velasquillo, 2013).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El trabajo se realizó en el Colegio de Postgraduados Campus Veracruz, km 88.5 Carretera Xalapa-Veracruz, Predio Tepetates, municipio de Manlio Fabio Altamirano. Sus coordenadas son $18^{\circ} 51'$ - $19^{\circ} 12'$ de latitud norte y $96^{\circ} 16'$ - $27'$ de longitud oeste. Con una altitud que va de los 20 a los 100 metros sobre el nivel del mar. (Figura 4).



Fuente <https://maps.google.com.mx> 2017.

Figura 4. Ubicación del estudio.

3.2. SIEMBRA DE SEMILLAS DE PAPAYO

Para la germinación de semillas, se pusieron a remojar en agua 450 semillas de papaya variedad Maradol por 24 horas para descartar las que quedaran en la parte superior del agua; Asimismo, se desinfectaron charolas con cloro al 5%, posteriormente se llenaron 16 charolas, cada una con 28 cavidades (Figura 5) utilizando sustrato Cosmo Peat ®. En cada cavidad se colocó una semilla de papaya y se regaron periódicamente hasta su germinación.



Figura 5. Siembra de semillas de papayo en charolas.

3.3. AISLAMIENTO DE UNA COLONIA DE ÁFIDOS LIBRE DE VIRUS

Para el aislamiento de una colonia de áfidos libre de virus, primero se recolectaron en campo hembras ápteras de *Aphis nerii* de plantas de *Asclepias curassavica* L. Posteriormente se colocaron 15 hembras adultas en una caja Petri dándole como alimento una hoja de *A. curassavica*, donde se mantuvieron hasta que produjeran ninfas por partenogénesis. Las 11 ninfas fueron tomadas con un pincel y colocadas a la planta sana de *A. curassavica* obtenida de semillas, las plantas se mantuvieron en una jaula forrada con tela de organza para su reproducción de varias colonias libres de virus (Figura 6).

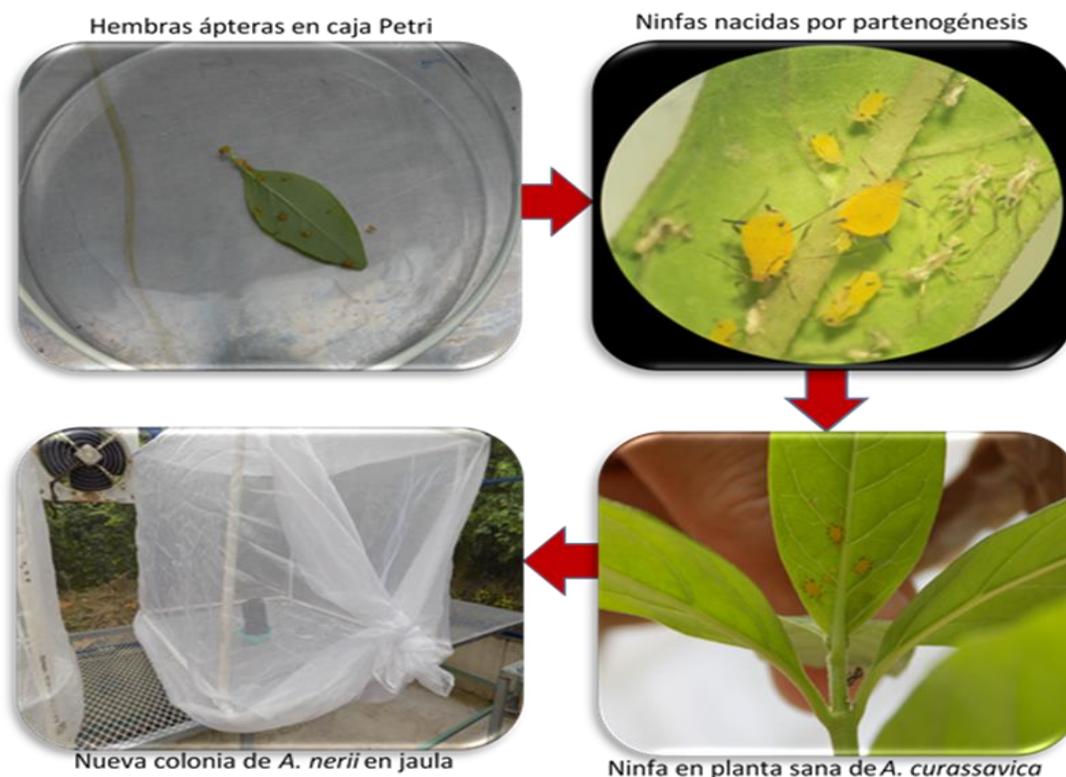


Figura 6. Pasos para aislar una colonia de pulgones libres de virus.

3.3.1.Pruebas de trasmisión viral

Después de tener una colonia de áfidos libres de virus se realizaron pruebas de trasmisión viral con los mismos a plantas de papayo, se colectaron hojas de papayo de tres plantas diferentes que presentaban síntomas típicos del PRSV-p, ubicada en el campus Veracruz. Las hojas se llevaron al laboratorio se desinfestaron en hipoclorito de sodio al 1% y posteriormente se eliminó el exceso de hipoclorito enjuagando dos veces con agua destilada. Se colocaron en una caja Petri hembras adultas ápteras de *Aphis nerii* libres de virus, y se mantuvieron en ayuno por un período de 1 hora. Posteriormente en las hojas recolectadas se colocaron 10 áfidos por un lapso de tiempo de 45 a 60 segundos para el período de adquisición del virus, el tiempo se midió a partir de que los áfidos iniciaron el probado de la hoja.

Después del tiempo de adquisición pasaron los áfidos a una planta sana de papayo para la trasmisión, se verificó que el áfido probara la hoja sana por un lapso de 1 hora. Transcurrido este tiempo los áfidos se eliminaron manualmente, este proceso se realizó con nueve plantas más para tener varias fuentes de inóculo del PRSV-p (Figura 7).

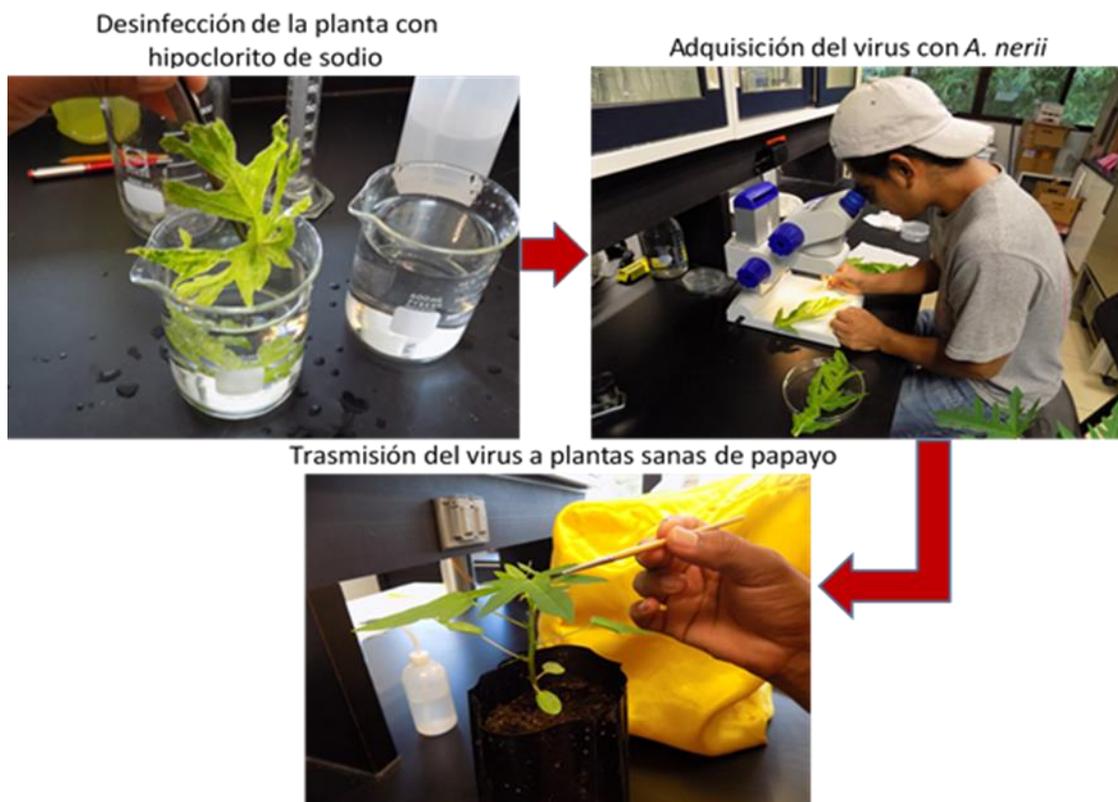


Figura 7. Trasmisión del PRSV-p por medio del vector *Aphis nerii*.

Estas plantas se mantuvieron en jaulas forradas con tela de organza para evitar la contaminación con otros insectos y se utilizaron como fuente de inóculo para infectar 100 plantas de papayo.

3.4. TRASPLANTE DE PAPAYO

Para el trasplante de los papayos se utilizó el sustrato Pindstrup® y tierra negra en una proporción de 50:50 de cada bolsa, se llenaron 150 bolsas negras de vivero de 30x30 cm (Figura 8).



Figura 8. Mezcla de sustrato Pindstrup® y tierra negra.

Se realizó el trasplante y se hicieron aplicaciones con el fertilizante (sulfato de amonio), también se utilizó el fungicida Prontius® para prevenir algunas enfermedades por hongos, las plantas se mantuvieron en el invernadero usando un sistema de riego por goteo por 45 minutos regando 3 veces a la semana. Estas plantas posteriormente se utilizaron para ser inoculadas con PRSV-p a través del vector *Aphis nerii* (Figura 9).



Figura 9. Trasplante de papayo en invernadero con maya antiáfida.

3.5. INFECCIÓN DE PLANTAS DE PAPAYO EN INVERNADERO CON PRSV-p

Después del trasplante se prosiguió a la infección de 100 plantas de papayo mantenidas en invernadero, (plantas de 62 días de edad) y utilizando como vector del PRSV-p la colonia de *Aphis nerii* libre de virus. Para la infección de las plantas se realizaron en dos días consecutivos utilizando 10 áfidos por planta y empleando el mismo procedimiento de transmisión del PRSV-p en las pruebas de transmisión viral. Cabe mencionar que las plantas como fuente de inóculo ocupadas presentaban síntomas iniciales de la enfermedad (Figura 10).



Figura 10. Infección del PRSV-p a plantas de papayo en invernadero.

3.6. MUESTREO DE PLANTAS DE PAPAYO

Después de haber realizado las inoculaciones del PRSV-p se enumeraron las 100 plantas para llevar un registro de cada muestreo, después de haber pasado 8 días de la fecha de transmisión, se llevaron a cabo los muestreos cada 3 días, muestreando solamente 20 plantas y así sucesivamente hasta completar 100 plantas, tomando solo una parte de tejido foliar el cual se depositó en una bolsa y puesta en una nevera con geles refrigerantes y llevadas a un congelador de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su diagnóstico en laboratorio. De la misma manera se tomaron las muestras como fuente de inóculo para confirmar que la planta estuviera

enferma de PRSV-p, se hace mención que las muestras tomadas de invernadero no presentaban ningún síntoma inicial de la enfermedad (Figura 11).



Figura 11. Plantas muestreadas de invernadero.

3.7. DETECCIÓN MOLECULAR DEL PRSV-P

A las plantas como fuente de inóculo y a las muestras de invernadero se les realizó la detección molecular del PRSV-p a través de la técnica de RT-PCR. Cabe mencionar que la PCR amplifica una secuencia específica de DNA miles de veces y lo que en la reacción se utiliza DNA genómico,

en el caso de los virus como PRSV-p se parte de RNA para generar DNA complementario.

De esta manera primero se realizó una extracción de ácidos nucleicos, posteriormente a las muestras obtenidas de RNA se les hizo electroforesis para observar la integridad de la muestra, a continuación, se les realizó la RT-PCR y de igual manera se hizo electroforesis, es ahí donde se observó la presencia o ausencia del virus PRSV-p.

3.7.1. Protocolo de extracción de RNA

Para extracción de ARN se utilizó el Kit Quick-RNA Microprep. con el siguiente protocolo.

Homogenización de muestra y lisis celular

- 1.** Para tejidos, pesar 30 mg de muestra, macerar el tejido con nitrógeno líquido mortero y pistilo. Transferir a un tubo. Agregar 600 µl de ZR RNA Buffer. Centrifugar a 500 x g por 1 minuto.
- 2.** Transferir el sobrenadante a la columna y colocarla en un tubo colector. Centrifugar a 12 000 x g por 1 minuto. Descartar el fluido.
- 3.** Agregar 400 µl de RNA Buffer de Prelavado en la columna y centrifugar a 12 000 x g por un minuto. Descartar el fluido.

4. Agregar 700 μ l de RNA Buffer de lavado a la columna y centrifugar a 12 000 x g por 1 minuto. Descartar el fluido. Repetir el paso 4 con 400 μ l de RNA Buffer de lavado.
5. Centrifugar la columna a 12 000 x g por dos minutos para remover el Buffer de lavado.
6. Colocar la columna en un tubo estéril libre de RNasas. Agregar 10 μ l de agua libre de Dnasas y RNasas,. Dejarlo reposar por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 18 000 x g por 1 minuto. Almacenar el eluido a ≤ -70 °C.

Posteriormente de la extracción del RNA se tomaron lecturas en el espectrofotómetro, la concentración y pureza de un ARN la relación de absorbancias A260/280 con un valor entre 2.0 - 2.2 se considera indicativa de pureza óptima de un ARN. Valores A260/280 > 1.7 se corresponden a una muestra de un ARN con una pureza aceptable. A260/280 < 1.7 seria indicativo de contaminación por la presencia de compuestos aromáticos. Esto se realizó para determinar su integridad a través de la relación de absorbancia de cada una de las muestras.

3.7.2. Electroforesis de RNA

Para determinar la integridad del ARN se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1.3X, se utilizó buffer TAE al 1X al momento de correr el gel. El tiempo de la electroforesis fue por 70 minutos a 90 V en un

tanque pequeño horizontal. Posteriormente se teñido el gel en bromuro de etidio y se visualizó en un fotodocumentador.

3.7.3. Reversa Transcriptasa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Para obtener el diagnóstico de PRSV-p, se utilizó el kit RT-PCR system de Promega, los pasos para preparar la mezcla se realizaron de la misma manera como lo indica el instructivo, la mezcla se hizo con el volumen de los siguientes agentes (Cuadro 1).

Cuadro 1. Agentes utilizados en la mezcla para PCR.

<i>Agentes</i>	<i>Volumen</i>
Agua libre de nucleasas	26 μ l
AMV/Tfl 5X	10 μ l
dNTP MIX	1 μ l
Primer F	50 pmol(3 μ l)
Primer R	50 pmol(3 μ l)
MgSO ₄	2 μ l
AMV RT	1 μ l
Tfl DNA Polimerasa	1 μ l
RNA Templado	3 μ l
Total	50 μ l

3.7.4. Primers utilizados

Los primers utilizados para la detección de PRSV-p fueron diseñados por (Noa-Carrazana et al.,2007).

Primer 3 F- 5´GACCATGGTCCTAGAAATGAAGCTGTGGATG 3´

Primer 11 R.- 3´TTTTTTTTCTCTCATTCTAAGAGGCTC 5´

Estos primers amplifican la región de la proteína de la cápside, la cual permite el diagnóstico del PRSV-p.

3.7.5. Ciclados de la PCR

Una vez realizada la mezcla de los agentes los tubos se llevaron al termociclador, se siguió el ciclado indicado por el Kit RT-PCR system de Promega donde las condiciones de cada ciclo fueron:

Un ciclo de 45 min a 45 °C. (Fase de incubación), 1 ciclo de 2 min a 94 °C. (Inicia con una fase de desnaturalización) seguido de 40 ciclos, de 30 s a 94 °C (fase de desnaturalización), 1 min a 55 °C (Fase de Alineamiento), 2 min a 68 °C (Fase de extensión) y se vuelve a repetir hasta completar los 40 ciclos, y por último se realiza 1 ciclo para terminar la reacción de 7 min a 68 °C (Fase de extensión).

Al termino de los ciclos de la RT-PCR de las reacciones obtenidas se tomaron 5 µl para realizar electroforesis en geles de agarosa al 1.3X, se utilizó buffer TAE al 1X al momento de correr el gel. El tiempo de la

electroforesis fue por 70 minutos a 90 V en un tanque pequeño horizontal. Posteriormente se teñido el gel en bromuro de etidio y se visualizó en un fotodocumentador, el cual si los amplificados se encontraban a los 100 pb se tomaría como positivo del PRSV-p.

4. RESULTADOS

4.1. GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y CRÍA DE PULGONES

De las semillas sembradas se obtuvo un 98% de germinación. La obtención de crías de pulgones *Aphis nerii* nacidas por partenogénesis fue de 1000 pulgones aproximadamente en una semana, los cuales se siguieron reproduciendo y colonizaron 8 plantas de *Asclepias curassavica*.

4.2. DETECCIÓN MOLECULAR DEL PRSV-p

4.2.1. Extracción de RNA de la fuente de inóculo

Cuadro 2. Porcentaje total según el nivel de absorbancia.

Número de plantas	Porcentaje	Nivel de absorbancia 260/280
10	70%	>2.0 Óptimo
3	30%	>1.7 Aceptable
0	0%	< 1.7 Presencia de compuestos aromáticos
0	0%	< 1.5 Contaminación con sales y carbohidratos

En las extracciones de RNA de la fuente de inóculo un 70% alcanza un nivel óptimo, y un 30% alcanza un nivel aceptable, lo que indica que no hubo contaminación y que el 100% de las muestras es viable para la realización de la RT-PCR, el contenido de ácido nucleico de cada muestra se aprecia en el Apéndice (Cuadro 6).

Las extracciones de RNA de cada muestra se visualizó en geles de agarosa.

4.2.2.Extracción de RNA de plantas de invernadero

Se realizaron extracciones de RNA de 100 plantas de papayo mantenidas en invernadero, en el (Cuadro 3) se muestra el nivel de absorbancia del total de las muestras.

Cuadro 3. Nivel de absorbancia de 100 plantas.

N. de plantas	Porcentajes	Nivel de absorbancia 260/280
67	67%	>2.0 Óptimo
33	33%	>1.7 Aceptable
0	0%	< 1.7 Presencia de compuestos aromáticos
0	0%	< 1.5 Contaminación con sales y carbohidratos

De las plantas de invernadero en las extracciones de RNA un 67% resultado con un nivel óptimo, el 33% con pureza aceptable y 0% de contaminación, lo que indica que el 100 % de las muestras es viable para la realización de la RT-PCR, el contenido de ácido nucleico de cada muestra se aprecia en el Apéndice (Cuadro 7). Posteriormente de las extracciones de RNA se prosiguió a realizar la RT-PCR para identificar las plantas infectadas con el PRSV-p.

4.2.3. RT-PCR de fuente de inóculo e invernadero

Para el diagnóstico de PRSV-p de la fuente de inóculo, se siguió el protocolo de RT-PCR System, el amplificado del virus se puede ver a los 1000 bp (Figura 12).

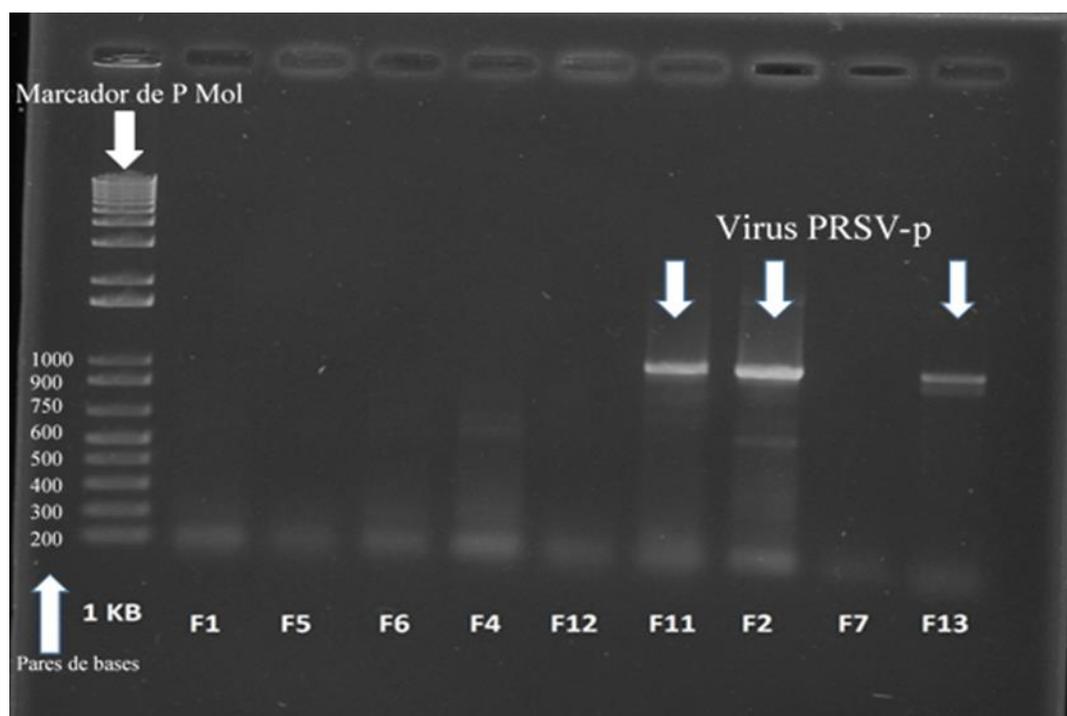


Figura 12. Virus del PRSV-p se muestra en el gel de agarosa.

El resultado obtenido de la fuente de inóculo analizadas con RT-PCR, para el diagnóstico del PRSV-p de las pruebas de trasmisión, un 30% resultaron positivas. Todas las muestras con resultado positivo y negativo se observan en el (Cuadro 4).

Cuadro 4. Pruebas moleculares RT-PCR de la fuente de inóculo.

Fuente de inóculo	Virus PRSV-p.	
	Positivo(+)	negativo (-)
F1		-
F2		+
F3		-
F4		-
F5		-
F6		-
F7		-
F8		-
F9		+
F10		-
F11		+
F12		-
F13		+

El resto de las muestras presentaron algunos síntomas similares, sin embargo, resulto no ser el virus del PRSV-p, posteriormente se analizaron 100 muestras de invernadero (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de 100 plantas en cinco muestreos diferentes después de su inoculación.

N. de plantas	Virus PRSV-p				
	Positivo (+)		Negativo (-)		
	Día 8	Día 11	Día 14	Día 17	Día 20
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	+	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	+
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	+
17	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	+
19	-	-	+	-	-
20	-	-	-	-	+

De 100 plantas analizadas de invernadero que se infectaron con las plantas positivas de la fuente de inóculo, solo el 6% resultaron positivas con el PRSV-p y el 94% resulto negativo. Posteriormente un 25% de las plantas de invernadero presentaron los síntomas 4 semanas después de su inoculación. Fue posible detectar el virus a los 14 días en una planta esto es un indicativo que es viable detectar el virus en la mitad del tiempo con relación a la observación de los síntomas. Los geles de la RT-PCR de electroforesis para el diagnóstico del PRSV-p de las plantas de invernadero se muestran en el Apéndice (Figura 13-17).

5. CONCLUSIONES

Las plantas de papayo al ser inoculadas con el PRSV-p presenta síntomas iniciales de la enfermedad hasta los 30 días después de su inoculación.

Las plantas de papayo con edad de 62 días y ser inoculadas con el PRSV-p usando como vector *Aphis nerii*, se presenta el virus en la segunda y tercera semana después de su inoculación.

Al transcurrir mayor tiempo desde su inoculación, aumenta el porcentaje de plantas enfermas, de igual manera la presencia de síntomas.

La detección del PRSV-p se obtiene a los 14 días, esto es 15 días antes de que se observen los síntomas de la enfermedad.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adams M. J., Zerbini F., French R., Rabenstein F., Stenger D., Valkonen J. (2011). 9 th report of the international committee for taxonomy of viruses. San diego, USA: Elsevier Academic Press: 1069 – 1089.

Agropecuarias, I. D. (2011). Manejo de Plagas en Paltos y Cítricos. Gobierno de Chile: Renato Ripa, Pilar Larral.

Asuar, L. E. (2007). Guia práctica sobre la técnica de PCR. Mexico: Raúl Marcó del Pont Lalli.

Badillo, V M (2000) Carica L vs Vasconcella St Hil (Caricaceae) con la rehabilitación de este último Ernstia 10: 74-79

Blackman, R. L. y V. Eastop (2007): Taxonomic Issues. En: Van Emden, HF, Harrington R (Eds.). Aphids as crop pests. pp. 1-30. CAB International.

Velasquillo, T. d. (2013). fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Clinica Corporativa*, pp 70-78.

Chia, C. L.; Nishina, M.S.; Evans, D.O. (1989). Papaya. Commodity Fact Sheet PA-3(A) Fruit. Hawaii Cooperative Extension Service, CTAHR, University of Hawaii. URL:<http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/crops/papaya.htm>

Fuente,ITC,2017.<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257083/Potencial-Papaya.pdf> (Consultado en Noviembre 2017).

García, B., J. Villanueva y N. Becerra (1988): Pruebas de transmisión por áfidos. Reunión Científica Forestal y Agropecuaria del Estado de Veracruz. Memoria. Veracruz, MX, SARH-INIFAP-CIFAP-VER. pp. 88-89.

Gonsalves, D. (1998) Control of Papaya ringspot virus in papaya: a case study. Annual Review of Phytopathology 36: 415-437.

González L, Soto M, Ortiz MI, Peralta EL (2001). Determinación de parámetros analíticos de las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos para la detección del viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTVd). *Fitopatología*;36(1):24-33.

López-Moya J.J., Valli A., García J. A., (2009). Potyviridae. *Enciclopedia of life Sciences*.

Louro D, Accotto GP, Vaira AM. Occurrence and diagnosis of Tomato chlorosis virus in Portugal. *Eur J Plant Pathol*. (2000) ;106:589-592.

Mishra, M, Chandra R, Saxena S (2007) Papaya. En: Kole, C (Ed) *Genome mapping and molecular breeding in plants*, pp. 343-351. Springer-Verlag, Heidelberg.

Mora-Aguilera, G., D. Nieto, D. Téliz y C. L. Campbell (1993): Development of a prediction model for papaya ringspot in Veracruz, Mexico. *Plant Dis*. 77: 12051211.

Nieto, A. D., O. D. Téliz, M. R. Rodríguez y G. Rodríguez (1990): Epidemiología del Virus de la mancha anular del papayo bajo diferentes fechas de siembra, densidades de plantación y localidades de Veracruz. *Congreso de Fitopatología*. Culiacán, Sinaloa, México, pp. 40.

Noa-Carrazana J.C. and Silva-Rosales L., (2007). Molecular characterization of a severe isolate of papaya ringspot virus in Mexico and its relationship with other isolates. *Virus Genes* 35:109 -117.

Peña, C. A. (2006). Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, 1-3.

Pereira de Araújo, J. (1987). Reunión Técnica de la Red Latinoamericana de Agroindustria de Frutas Tropicales: Producción, Manejo y Exportación de Frutas Tropicales. Bogotá, Colombia, Editorial Presencia Ltda. P. 264.

Pirone, T. P. y K. L. Perry (2002): Aphids-nonpersistent transmission. *Adv. Bot. Res*. 36: 1-19.

Racchah, B., H. Huet y S. Blanc (2001) : Potyviruses. En: Harris, K. F, Smith O. P, Duffus J. E (eds.) Virus-insect-plant interactions. pp. 181-232. Academic Press, EE.UU.

Redondo, A. R. (2003). Manejo del virus de la mancha anular del papayo en la región caribe colombiana. Valledupar: PRODUMEDIOS.

Revers F., y García J. A., (2015). Molecular Biology of Potyviruses. *Advances in virus Research*, 92: 101 – 166.

Rieger, M (2006) Introduction to Fruit Crops. The Haworth Press, New York

SIAP,2017.<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257083/Potencial-Papaya.pdf> (Consultado en Noviembre 2017).

Vázquez G. E. (2009). Identificación, evaluación y manejo postcosecha de nuevas especies de frutales tropicales para el sur de Tamaulipas. Informe Final de Proyecto. INIFAP. México. 56 p.

Villegas, VN (1997) Edible fruits and nuts-Carica papaya L. Wageningen University. Wageningen.

Wei, F, Wing RA (2008) A fruitful outcome to the papaya genome project. *Genome Biology* 9: 227.

Yeh, SD, Bau HJ, Kung YJ y Yu TA (2007) Papaya. En: Pua, EC, Davey MR (Eds) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, pp. 73-96. Springer-Verlag, Heidelberg.

APÉNDICE

Cuadro 6. Extracción de ácidos nucleicos de la fuente de inóculo

Muestra	Acidos nucleicos extraídos ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
agua	-0.1	-0.003	0.001	-2.24	-5.11
1	26.6	0.665	0.264	2.52	0.08
2	36.7	0.917	0.465	1.97	0.16
3	24.3	0.608	0.207	2.94	0.07
4	50.6	1.266	0.551	2.3	0.11
5	28.1	0.703	0.314	2.24	0.05
6	59.1	1.478	0.651	2.27	0.24
7	36	0.9	0.384	2.34	0.07
8	47.1	1.178	0.635	1.85	0.15
9	60.4	1.51	0.585	2.58	0.51
10	35.4	0.886	0.372	2.38	0.29
11	60.1	1.503	0.64	2.35	0.3
12	46.7	1.167	0.532	2.2	0.21
13	32.8	0.819	0.426	1.92	0.15

Cuadro 7. Extracción de ácidos nucleicos de 100 plantas de papayo

Muestra	Acidos nucleicos extraídos ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
1	52.2	1.306	0.664	1.97	0.57
2	42.5	1.062	0.561	1.89	1.12
3	80.3	2.008	0.969	2.07	0.35

Continuación del Cuadro 7.

Muestra	Acidos nucleicos ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
4	91.5	2.288	1.294	1.77	1.33
5	27.8	0.696	0.353	1.97	0.51
6	39.2	0.98	0.482	2.03	0.09
7	39.1	0.977	0.487	2.01	0.47
8	99.2	2.481	1.177	2.11	0.75
9	31.1	0.777	0.393	1.98	0.19
10	48.5	1.212	0.61	1.99	0.62
11	29	0.726	0.399	1.82	0.99
12	39.2	0.981	0.517	1.9	0.45
13	37.5	0.939	0.424	2.22	0.07
14	47.2	1.18	0.546	2.16	0.08
15	39.5	0.987	0.458	2.16	0.11
16	23.6	0.59	0.254	2.33	0.04
17	60.7	1.519	0.888	1.71	1.03
18	23	0.576	0.289	1.99	0.18
19	23.9	0.599	0.281	2.13	0.04
20	33	0.826	0.43	1.92	0.13
21	26.5	0.662	0.334	1.98	0.62
22	129.5	3.239	1.535	2.11	1.47
23	37.5	0.937	0.515	1.82	0.66
24	50	1.25	0.61	2.05	0.37
25	82.1	2.052	0.99	2.07	1.41
26	15.3	0.381	0.2	1.91	0.13
27	58.5	1.464	0.705	2.08	1.31
28	79.3	1.983	0.948	2.09	1.65
29	24.7	0.618	0.321	1.93	0.85
30	29.3	0.733	0.362	2.03	0.39
31	104.7	2.616	1.404	1.86	0.88
32	107.6	2.689	1.248	2.16	0.17
33	82.6	2.066	1.185	1.74	0.93
34	82.5	2.063	1.039	1.99	0.58
35	55.2	1.379	0.664	2.08	0.14
36	52.3	1.307	0.636	2.06	0.14
37	20.5	0.513	0.267	1.92	0.04
38	35.9	0.897	0.456	1.97	0.15
39	21	0.524	0.265	1.98	0.05

Continuación del Cuadro 7.

Muestra	Acidos nucleicos ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
40	21.9	0.548	0.299	1.84	0.69
41	42.6	1.064	0.48	2.22	0.1
42	35.7	0.892	0.355	2.51	0.15
43	25.6	0.641	0.283	2.27	0.04
44	20.2	0.505	0.208	2.42	0.03
45	30.5	0.763	0.338	2.26	0.07
46	43.4	1.084	0.493	2.2	0.08
47	56.2	1.405	0.603	2.33	0.17
48	70.9	1.772	0.788	2.25	0.21
49	35	0.875	0.275	3.18	0.38
50	35.2	0.88	0.376	2.34	0.06
51	36.4	0.911	0.401	2.27	0.1
52	80.2	2.005	0.951	2.11	0.25
53	31.9	0.797	0.345	2.31	0.08
54	59.5	1.486	0.605	2.46	0.26
55	55.1	1.376	0.537	2.56	0.43
56	60.6	1.516	0.67	2.26	0.24
57	62	1.55	0.744	2.08	0.11
58	37.8	0.946	0.397	2.38	0.09
59	45.4	1.135	0.496	2.29	0.11
60	27.3	0.682	0.276	2.48	0.07
61	21.5	0.539	0.175	3.07	0.06
62	50.5	1.264	0.604	2.09	0.11
63	18.6	0.465	0.247	1.88	0.75
64	337.1	8.427	4.037	2.09	0.53
65	63.8	1.595	0.819	1.95	0.1
66	43	1.075	0.562	1.91	0.54
67	39.1	0.978	0.488	2	0.92
68	46.6	1.166	0.685	1.7	0.88
69	71.5	1.788	0.862	2.07	1.7
70	21.9	0.547	0.212	2.59	0.17
71	45.8	1.146	0.592	1.93	0.22
72	104.3	2.609	1.289	2.02	0.55
73	42.7	1.067	0.397	2.69	0.22
74	58.1	1.451	0.754	1.92	1.24
75	33.4	0.836	0.426	1.96	0.11
76	19.9	0.498	0.282	1.77	0.66

Continuación del Cuadro 7.

Muestra	Acidos nucleicos ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
77	32.3	0.808	0.38	2.13	0.05
78	55.5	1.388	0.657	2.11	0.13
79	42.7	1.066	0.424	2.51	0.39
80	71.4	1.785	0.867	2.06	0.17
81	54.3	1.359	0.612	2.22	0.09
82	78.4	1.961	0.943	2.08	0.15
83	35.4	0.886	0.428	2.07	0.06
84	48.4	1.209	0.561	2.15	0.11
85	345.2	8.629	4.111	2.1	1.67
86	161	4.025	1.877	2.14	0.33
87	68	1.7	0.776	2.19	0.12
88	65.8	1.644	0.763	2.15	0.12
89	74.8	1.87	0.882	2.12	0.13
90	30.1	0.753	0.346	2.18	0.05
91	53.3	1.333	0.659	2.02	0.6
92	148.9	3.723	1.763	2.11	0.37
93	365.2	9.129	4.28	2.13	0.51
94	371.1	9.279	4.377	2.12	0.67
95	78.6	1.965	1.013	1.94	0.17
96	72.3	1.808	0.954	1.9	0.15
97	18.4	0.46	0.216	2.13	0.03
98	62.3	1.557	0.753	2.07	0.11
99	64.7	1.617	0.841	1.92	0.29
100	44.7	1.117	0.511	2.18	0.21

Geles de la RT-PCR para el diagnóstico del PRSV-p en plantas de invernadero, se utilizó un CP (Control Positivo) de PRSV-p en cada gel para confirmar la presencia de la enfermedad, en cada círculo de la Figura se muestra como planta positiva con PRSV-p.

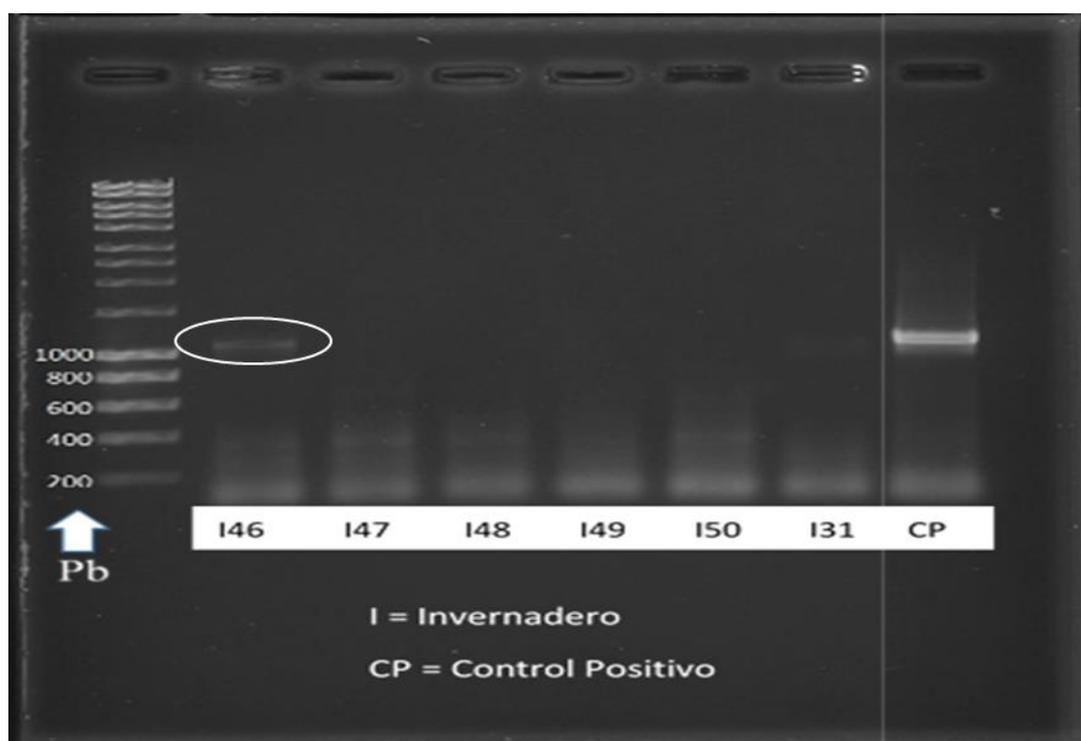


Figura 13. Planta 46 con PRSV-p.

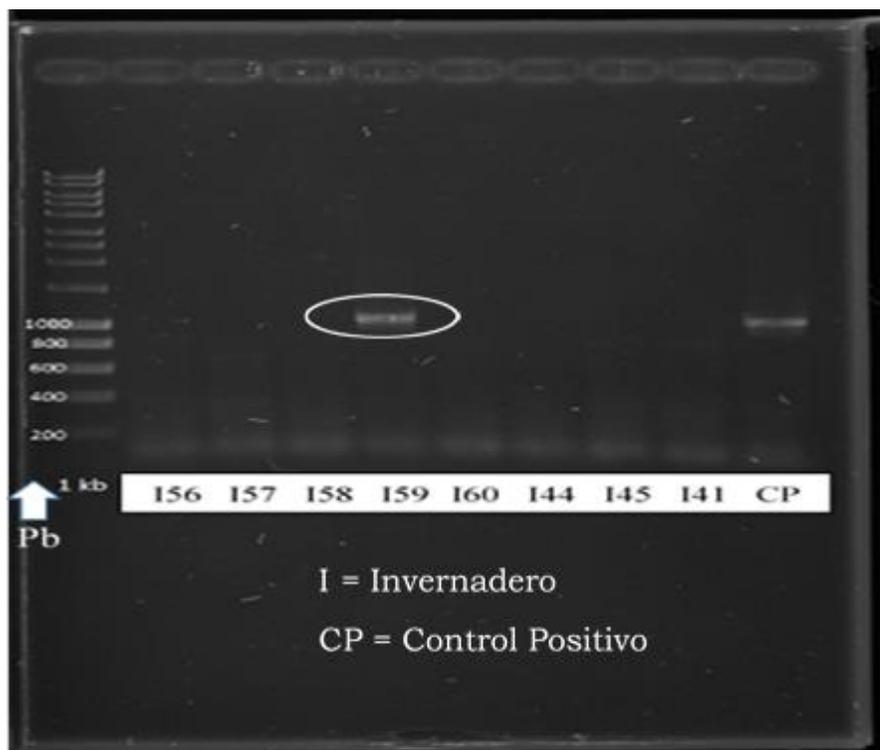


Figura 14. Planta 59 con PRSV-p.

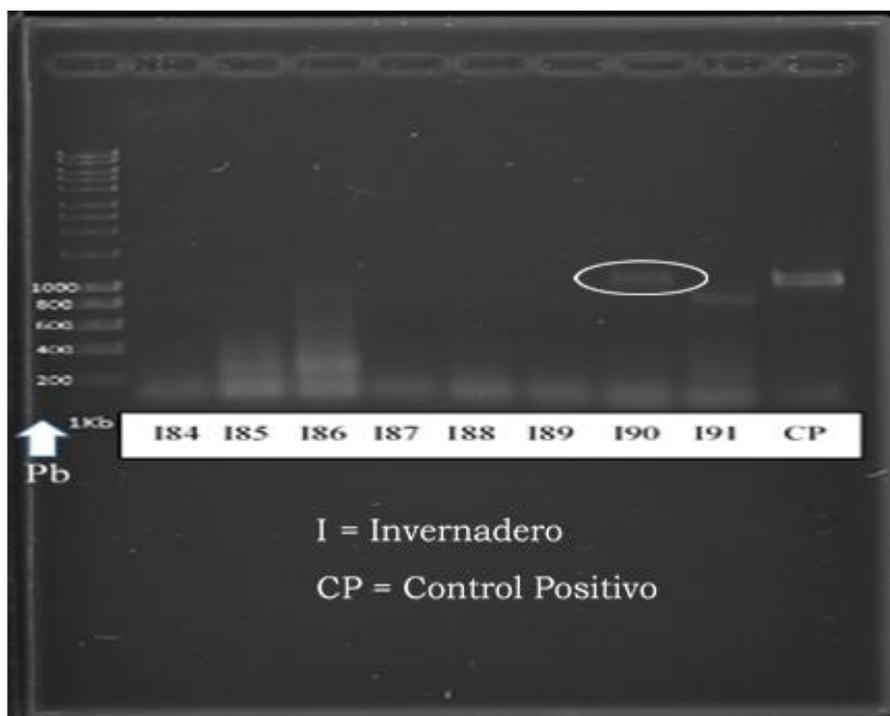


Figura 15. Planta 90 con PRSV-p.

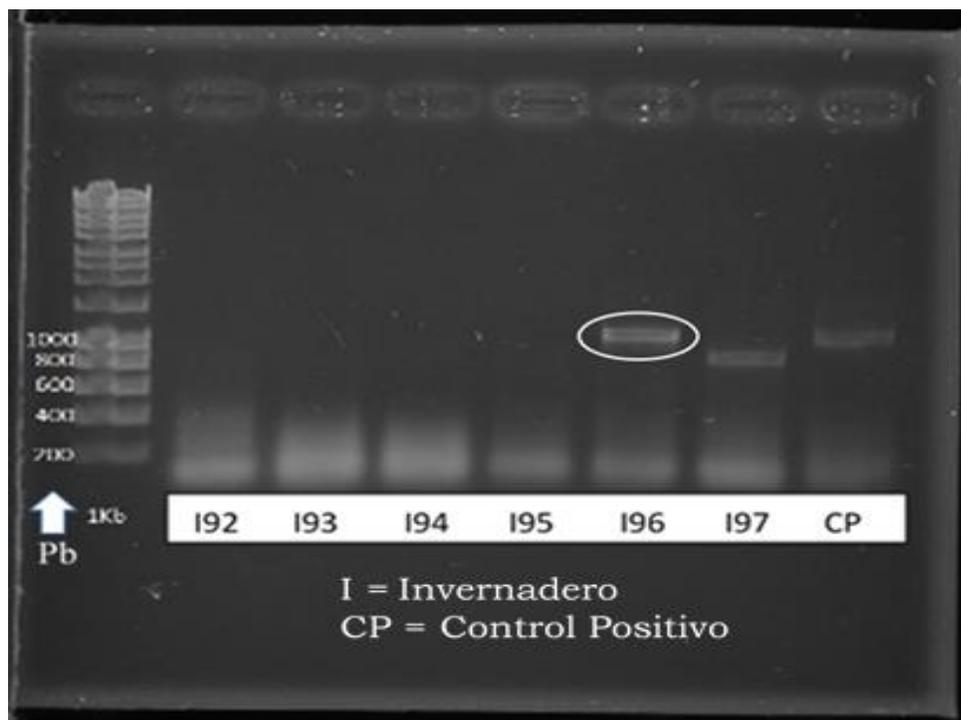


Figura 16. Planta 96 con PRSV-p.

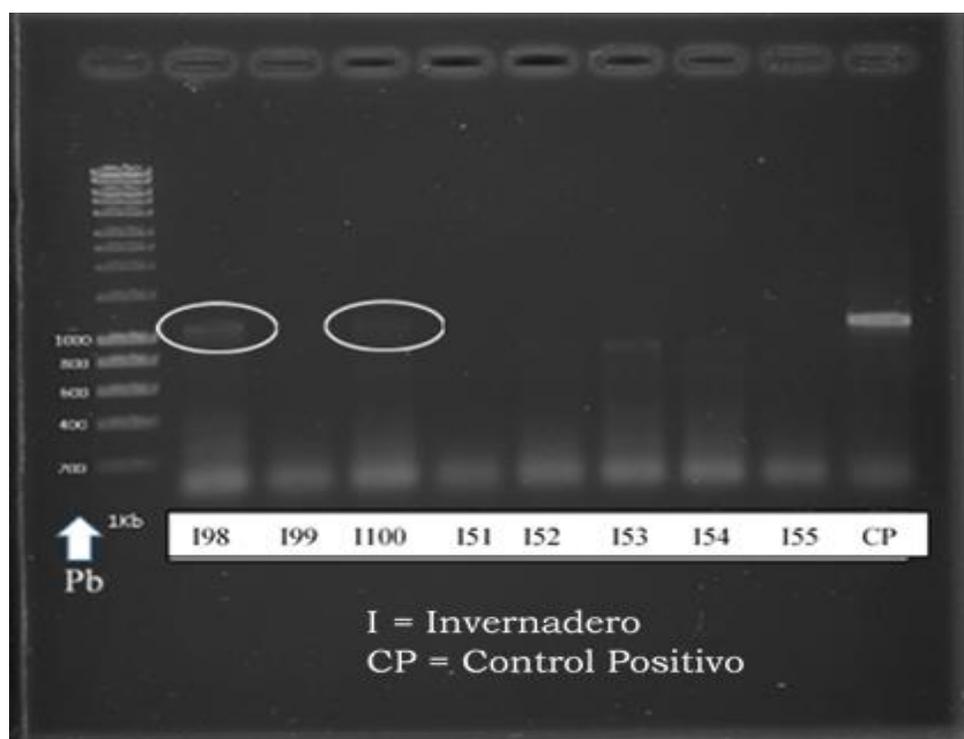


Figura 17. Planta 98 y 100 con PRSV-p.