

Selección de una cepa atenuada del virus de la mancha anillada de la lechosa con capacidad protectora bajo condiciones de manejo integrado

Selection of an attenuated strain of Papaya ringspot virus with protective capacity in integrated an manegement conditions

A. González¹, G. Trujillo² y A. Vegas³

Resumen

En experimentos de reto de 25 aislamientos del virus de la mancha anillada de la lechosa (PRSV-P) provenientes de mutagénesis *in-vitro* ante una cepa severa del PRSV-P en condiciones de cobertizo protegido de insectos, se preseleccionaron las cepas atenuadas T6-2, T6-4, T6-6, T6-10 y T6-13, en función de la ausencia de síntomas en plantas sanas inoculadas (en comparación al control inoculado con la cepa severa del PRSV-P) y al retardo de síntomas típicos de la enfermedad en plantas protegidas retadas con la cepa severa. A los 30 días de la bioprotección con las cepas atenuadas se realizaron los retos, observándose a los 15 días que el testigo no protegido mostraba un 53% de infección, mientras que las plantas inoculadas con las cepas atenuadas no presentaban síntomas; demostrándose el efecto protector de las mismas. A los 22 días, el testigo no protegido mostraba un 100% de infección y las plantas protegidas con las cepas T6-2 y T6-10 evidenciaron el 10% de infección, mientras que las plantas protegidas con el resto de las cepas presentaron un promedio de 56,6% de infección. A los 30 días, se destacó por su efecto protector la cepa T6-10 con el 70 % de infección y las plantas bioprotegidas con el resto de las cepas presentaron el 95% de infección promedio. Estas pruebas nos permitieron seleccionar el aislamiento T6-10 como una cepa atenuada con capacidad protectora, demostrado por el menor porcentaje de infección en las evaluaciones hechas en condiciones de cobertizo. Se sembraron 50 plantas de *C. papaya* cv Cartagena Amarilla inoculadas con la cepa T6-10 en condiciones de campo, con una densidad de 3x3m, protegidas con aceite blanco al 1% cada 15 a 21 días y se hizo un descarte de hasta un 10% de plantas infectadas con el virus

Recibido el 1-3-2001 ● Aceptado el 15-1-2002

1. Fundación DANAC. Apdo 182. San Felipe. Yaracuy. E-mail: gonzalexda@yahoo.com.

2. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. Instituto de Botánica, sección de Fitopatología. Apdo. 4579. Maracay 2101. E-mail: gus202@cantv.net.

3 Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas INIA, Laboratorio de Biotecnología, Apdo. 588. Maracay 2101. E-mail: vegaslux@yahoo.com

como práctica para disminuir la presión de inóculo. A los 5 meses de mantenerse el cultivo en el campo la cepa ofrecía una protección total, mientras que el control de referencia ya había alcanzado el 100% de infección para esta fecha. A los 6 meses se contabilizó el 2,2% de infección por virus. A los 6,5 meses las plantas protegidas presentaron 4,4% de infección. A los 7 meses se registró un 11,1% de infección por virus. A los 7,5 meses se notó un incremento rápido de la infección de 28,8%. A los 8 meses la plantación alcanzó el 50% de infección. La cepa atenuada T6-10 demostró su alta capacidad protectora en condiciones de cobertizo y campo recomendándose su uso a escala semicomercial.

Palabras clave: *Carica papaya*, protección cruzada, cepas atenuadas, virus de la mancha anillada de la lechosa.

Abstract

Twenty five *Papaya ringspot virus* (PRSV-P) isolates coming from mutagenesis *in vitro* were preselected as attenuated strains T6-2, T6-4, T6-6, T6-10 and T6-13, in insect protected shed conditions, taking into account absence of symptoms and delay of the typical symptoms of disease in plants protected and challenged with severe strains. After 30 days protected plants were challenged and 15 days later non protected controls showed 53 % infection rates, while protected plants exhibited no symptoms; demonstrating the protective effect of attenuated strains. After 22 days, non protected controls showed 100 % infection rates and the protected plants with T6-2 and T6-10 presented 10 % infection rates, while the rest had an average 56,6 % infection rate. After 30 days, protected plants with promisory T6-10 strain showed 70% of infection rates and other protected plants exhibited an average of 85%. Isolate T6-10 was selected as attenuated strain due to its protector capacity shown by the lowest infection percentage in challenged plants under shed conditions. Fifty *C. papaya* cv Cartagena Amarilla plants protected by the T6-10 strain were planted in the field at a density of 3x3m, spraying with 1% mineral oil every 15 to 21 days and 10% of infected plants were eliminated to diminish the pressure of inoculum. After 5 months the strain T6-10 offered total protection to plants, while the reference control had already reached 100 % of infection. The protected plants showed 2.2%, 4.4 %, 11.1%, 28.8%, 50% infection rates after 6, 6.5, 7, 7.5 and 8 months, respectively. The high protective capacity of strain T6-10 was demonstrated in shed and field conditions and is recommended for use in semi-commercial operations.

Key words: *Carica papaya*, cross protection, attenuated strain, *Papaya ringspot virus*.

Introducción

El lechoso (*Carica papaya* L.), es uno de los frutales más importantes y ampliamente distribuido en los trópicos y subtropicos, cultivado por su incalculable valor como fruta fresca y para su uso industrial, además de ser una fruta exportable (2, 11). Sin embargo, la producción mundial está afectada por una enfermedad causada por el virus de la mancha anillada de la lechosa (*Papaya ringspot virus*, PRSV-P) que constituye el mayor obstáculo en la siembra a gran escala de este importante rubro (2, 10). Este virus se disemina rápidamente por áfidos (2, 5, 8) y los cultivos alcanzan altos grados de infección en periodos cortos de tiempo (meses), produciendo fuertes síntomas de mosaico, distorsión en las hojas, manchas grasientas en tallos y pecíolos, manchas en forma de anillo en los frutos lo que afecta la calidad, causando una merma de los rendimientos y en muchos casos la pérdida total de la producción (2, 7, 8).

La protección cruzada como medida de control al PRSV-P ha sido utilizada con éxito a escala comercial en países como China (11) y USA (10). En Venezuela, esta tecnología se ha usado en ensayos semicomerciales en plantas de lechosa tratadas con cepas atenuadas del virus, donde se observó

un retardo en la aparición de los síntomas de la enfermedad, prolongación de la vida productiva de las plantaciones, obtención de frutos de mejor calidad y un incremento de los rendimientos (7). No obstante, esta técnica debe ir asociada a prácticas culturales que incluyen el aislamiento físico mediante barreras rompe viento, siembras distantes, erradicación de plantas enfermas, control de malezas, siembra en épocas con poblaciones relativamente bajas de áfidos y aspersión periódica con aceite blanco (2, 3, 10). En resumen, un manejo integrado de la enfermedad asegura la producción de lechosa lo que se traduce en mayores ganancias para los agricultores.

Con la finalidad de aumentar el número de cepas atenuadas disponibles para la protección cruzada en lechosa contra el PRSV-P local, las cuales podrían ser usadas en otras regiones del país, se planificó esta investigación cuyos objetivos fueron: 1) Estudiar cepas provenientes de mutagénesis en condiciones de cobertizo protegido de insectos, 2) Seleccionar la(s) de mejor comportamiento o potencialidad protectora en el ensayo de cobertizo y 3) Probarla(s) en condiciones de campo.

Materiales y métodos

Los ensayos se realizaron en la Sección de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de La universidad Central de Venezuela .

Siembra y mantenimiento de

plantas. En todo el experimento se uso lechosa del cv Cartagena Amarilla proveniente de fruta fresca, las semillas fueron sembradas directamente a bolsas de polietileno de

0,5 l de capacidad, conteniendo una mezcla esterilizada de arena, tierra y abono orgánico en proporción 1:1:1 v/v. Las plántulas (1 por bolsa), se mantuvieron en un cobertizo protegido de insectos, hasta 2 meses de edad. Fueron regadas, fertilizadas, y se asperjaron con insecticidas y fungicidas cada 15 días como medida preventiva.

Aislamientos virales. En 1997, se realizaron experimentos preliminares de reto con 25 aislamientos del tratamiento T6 del PRSV-P severo de Venezuela obtenidos por mutagénesis química. De este primer tamizado, se estudió aparte el comportamiento de las cepas identificadas como T6-2, T6-4, T6-6, T6-10 y T6-13, este grupo fue escogido por ser estable, no ocasionar reversión de síntomas en plantas de lechosa o permanecer asintomáticas y como cepa severa se usó el PRSV-P local. Estas cepas fueron multiplicadas sobre lechosa como hospedante natural del virus.

Bioprotección de las plantas. Se inocularon 80 plantas sanas de 2 meses de edad (5-6 hojas expandidas) por cada cepa o tratamiento y 10 plantas como testigo inoculado con la cepa severa del PRSV-P local. La inoculación mecánica se hizo tomando 2 g de tejido, se maceró en un mortero esterilizado y frío con tampón fosfato de potasio 0,01 M con pH 7 en una proporción 1:10 p/v, se frotó suavemente en cuatro hojas expandidas de la parte apical, antes espolvoreadas con carborundo 600, luego las hojas inoculadas se lavaron. Todo el material fue identificado y mantenido en un cobertizo para

plantas enfermas (protegido de insectos), con una temperatura promedio de 25 °C y 75 %HR, durante los meses junio y agosto de 1998.

Reto con PRSV-P severo. A los 30 días de la bioprotección, 10 plantas de cada tratamiento fueron retadas con la cepa severa del PRSV-P local; de la misma manera se inocularon 10 plantas no protegidas de la misma edad, como testigo. El procedimiento de inoculación durante el reto fue similar a la de bioprotección, con la diferencia que el jugo fue frotado en las hojas totalmente expandidas, comenzando de las basales hacia las apicales, evitando inocular los primordios y hojas no expandidas del ápice. Las plantas retadas fueron mantenidas en el cobertizo de plantas enfermas bajo condiciones controladas ya descritas.

Siembra en campo. El 22 del mes de diciembre de 1998 se sembraron 50 plantas de lechosa cv Cartagena Amarilla bioprotegidas con la cepa T6-10 seleccionada en una parcela de 0.04 ha ubicada en la Sección de Fitopatología. La distancia de siembra fue de 3x3 m sobre camellón, a razón de una planta por punto. Se realizaron prácticas agronómicas convencionales como fertilización, riego y control de malezas. Además, las plantas protegidas fueron asperjadas con aceite mineral al 1 % más surfactante cada 15 días y se erradicó hasta un 10 % de las plantas que mostraron síntomas del PRSV-P al comienzo de la infección. A manera de comparación se consideró un testigo de referencia (control R), que fue sembrado en condiciones agroecológicas similares en el campo

del Instituto de genética de la Facultad de Agronomía de la UCV. El mismo se encontraba situado a 500 m del ensayo de bioprotección para evitar el aumento de inóculo que pudiera romper la protección a corto plazo. Estas plantas de lechosa tuvieron un origen y manejo parecido, no se protegieron con las cepas atenuadas, ni con las aspersiones regulares de aceite blanco.

Medición de las condiciones ambientales. A) En el cobertizo, la temperatura y la humedad relativa fueron medidos diariamente por un termohigrógrafo marca Wilh. Lambrecht KG. Göttingen. Typ. 252. B) Para el análisis de los resultados de la prueba de campo, se utilizaron los datos climatológicos de la estación Maracay (C1), la cual se encuentra ubicada en los predios de la Facultad de Agronomía UCV, a una altitud de 443 msnm, con latitud 10° 16' 20" y longitud 67° 36' 35". El ensayo de campo se ubicó a 300 m de la estación

mencionada.

Análisis de la variable % de infección. En ensayo completamente aleatorizado se realizó la bioprotección con las cepas atenuadas, constituyendo cinco tratamientos con las cepas atenuadas (T6-2; T6-4; T6-6; T6-10; T6-13), con 10 repeticiones, más un testigo inoculado con la cepa severa del PRSV-P local. Se registraron porcentajes de plantas enfermas en los diferentes tratamientos y el testigo no protegido en intervalos diarios a partir de los 12-15 días de la bioprotección o reto, periodo en el cual se inician los síntomas de la enfermedad. Para el análisis estadístico del porcentaje de plantas enfermas con PRSV-P se empleó el paquete Statistix. En condiciones de campo se determinó el porcentaje de plantas enfermas en las plantas protegidas con la cepa atenuada como en el testigo de referencia en intervalos de 7 días.

Resultados y discusión

Bioprotección con las cepas atenuadas y reto con PRSV-P severo. En plantas de lechosa inoculadas con T6-2, T6-4, T6-6, T6-10 y T6-13, no se observaron síntomas típicos de la enfermedad durante 30 días. Mientras que el testigo inoculado con la cepa severa del PRSV-P local mostró un 50 % de infección a los 15 días y alcanzó un 100 % de infección a los 22 días. En la figura 1 se muestran los resultados del reto, el testigo no protegido mostró síntomas a los 15 días del reto en 53 %, mientras que las plantas protegidas no manifestaron ningún síntoma; evidenciándose un

retardo en la expresión de la enfermedad, lo que indica un efecto protector de las cepas. A los 22 días del reto, el testigo no protegido presentó el 100 % de infección, mientras que las plantas protegidas con la cepa T6-2 mostraban el 10 %, las plantas con la cepa T6-4 el 50 %, las plantas con la cepa T6-6 el 100 %; las plantas protegidas con la cepa T6-10 el 10 % y las plantas protegidas con la cepa T6-13 el 20 % de infección, hasta aquí el comportamiento de las cepas mostraron diferentes grados de protección. A los 30 días del reto, el testigo no protegido mostraba el 100

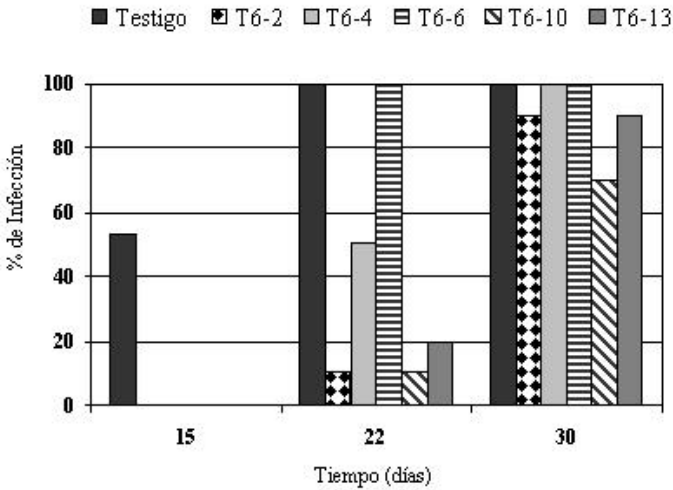


Figura 1. Comportamiento de las cepas atenuadas inoculadas en *C. papaya* durante el reto con el PRSV-P severo local, en condiciones de cobertizo protegido de insectos.

% de infección con síntomas severos. Las plantas protegidas con las cepas T6-2 y T6-13 mostraron el 90 % de infección, las plantas protegidas con las cepas T6-4 y T6-6 el 100%, mientras que las plantas protegidas por la cepa T6-10 el 70%. Esta última cepa fue seleccionada por mostrar mayor capacidad protectora contra el PRSV-P severo que las restantes. Al inicio, la sintomatología observada fueron manchas grasientas conspicuas en el tallo, acompañadas de mosaico, ampollamiento y leves deformaciones en las hojas. Al final de la evaluación las plantas no protegidas mostraban abundantes manchas grasientas en el tallo, mosaico prominente y distorsión de las hojas.

Análisis de la variable % de infección. Utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis, los resultados indicaron diferencia

significativa cuando $p = 0,05$. En la comparación del porcentaje de infección promedio de las plantas de lechosa protegidas con las cepas atenuadas a los 30 días del reto, quedaron separados tres grupos homogéneos. Mostrando que el comportamiento durante el reto de la cepa T6-6 (44,1%) es similar al testigo con PRSV-P severo (48,0%) manifestando sintomatología en menor tiempo, pero es diferente al comportamiento de la cepa T6-10 (17,9%) donde la aparición de síntomas ocurrió en mayor tiempo, considerándose esta última la mejor cepa. La cepa atenuada T6-4 (30,4%) tuvo un comportamiento intermedio con relación al tiempo, pero mostrando un grado de infección parecido al testigo. Las cepas T6-13 y T6-2 (23,0%) se comportaron de manera similar con respecto al grado de infección en el tiempo.

La infección de las cepas atenuadas fue confirmada a través del reto con el PRSV-P severo local, evidenciándose la capacidad de protección de las cepas, los resultados demostraron que la cepa atenuada T6-10 tuvo mejor comportamiento en condiciones de cobertizo, por lo tanto fue seleccionada para los ensayos de campo. El tiempo de reto y la medición de las variables difieren un poco con respecto a las usadas por otros investigadores (11, 12), los cuales probaron diferentes intervalos de tiempo de reto para medir la aparición de la sintomatología; concluyendo que una alta proporción (79-93%) de las plantas no mostró síntomas aún después de 60 a 90 días del reto, cuando se incrementó el intervalo de tiempo para el reto de 26, 35 y 56 días, lo contrario ocurrió cuando se reto a intervalos de 11 y 15 días donde no hubo protección. En otro trabajo (9) se obtienen resultados parecidos usando intervalos de 15, 20, 25, 30 y 40 días, con la diferencia que las plantas protegidas con las cepas (HA 5-1 y HA 6-1) de Hawai son retadas con diferentes cepas severas del PRSV-P de Taiwán. No obstante, en este trabajo el reto se hizo a los 30 días basados en resultados favorables obtenidos en ensayos de selección de cepas efectuados anteriormente (6).

Se ha comprobado que mientras las cepas sean más homologas mayor será la protección (2, 4, 10). En Venezuela en años recientes (6, 7) se corroboró lo anterior, en ensayos de cobertizo protegido de insectos, se demostró que las cepas atenuadas nacionales V-17 Y V-37 protegen mejor en los experimentos de reto con la cepa

severa del PRSV-P que la cepa atenuada HA 5-1 procedente de Hawai y usada con éxito en Taiwán y Hawai (2, 3, 9, 10).

Ensayo de campo. La figura 2A muestra que después de dos meses del trasplante a campo, el control de referencia comenzó a mostrar infección severa en 20,4 %. La incidencia de la enfermedad avanzó rápidamente hasta alcanzar el 100 % de infección a los seis meses. Durante este tiempo no se observó sintomatología alguna en las plantas protegidas con la cepa T6-10, evidenciando que las prácticas agronómicas fueron adecuadas, que la cepa protegía y era estable en condiciones de campo. Pasados los seis meses del trasplante se observaron el 2,2 % de infección. A los siete meses las plantas protegidas mostraron el 11,1 %. A partir de este mes se hizo un descarte del 10 % de las plantas enfermas para prevenir el incremento de inóculo del PRSV-P severo. A los ocho meses las plantas mostraron el 50 % de infección desarrollando síntomas, este contraste indica claramente la capacidad protectora de T6-10 contra el PRSV-P de la zona.

Medición de las condiciones ambientales. En la estación Maracay, se observó que en el periodo enero-agosto 99, la temperatura máxima fue de 33,5°C, registrada en el mes de marzo. En un análisis climatológico de la misma zona (1), fue de 35,3°C en febrero del año 98 y de 33,8°C en la década 87-97, registrada en el mes de abril (figura 2B). La temperatura mínima se registró en el mes de enero con 17,6°C, mientras que en el análisis mencionado fue de 15,8°C en el año 98 y de 14,9°C para la década 87-97,

correspondiente al mismo mes en ambos periodos (figura 2C). Con respecto a la precipitación (figura 2D), en la estación Maracay, para el periodo enero-agosto 1999 se registraron 1113,6 mm, mientras que para el año 1998 fue de 739,5 mm y en la década 87-97 fue de 633,2 mm.

En el análisis de las condiciones realizado se observó un incremento de aproximadamente 2 °C con respecto al mismo periodo de la década 87-97 (1), pero con la diferencia que la variación se obtiene en la temperatura mínima. Estas consideraciones nos permiten concluir que el año 1999 fue atípico en cuanto a las condiciones agroclimáticas,

caracterizado por un aumento de la temperatura y de la precipitación. Se han hecho experimentos sobre el uso de temperatura para la obtención de cepas atenuadas y en algunas partes del mundo con clima cálido, cepas de virus que sobreviven a esas temperaturas son seleccionadas naturalmente (2, 4). Comparando los resultados de este trabajo, con los obtenidos en el experimento de campo anterior (7), descartamos la posibilidad que la cepa T6-10 pueda ser inestable a los cambios de temperatura, desventaja atribuible a las cepas probadas en condiciones de alta temperatura presente en las zonas tropicales (5).

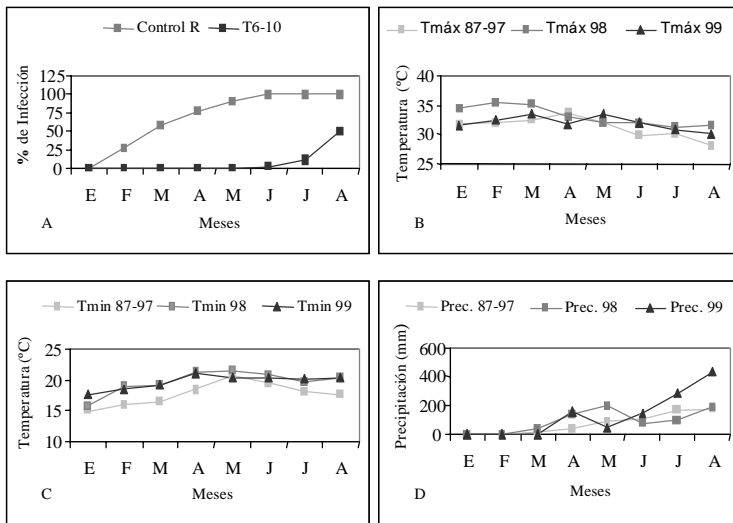


Figura 2. Ensayo de bioprotección de plantas de *Carica papaya* cv Cartagena amarilla durante el periodo enero- agosto de 1999 en condiciones de campo (FAGRO-UCV). A) Comportamiento de la cepa T6-10, más prácticas agronómicas (aspersión de aceite blanco, erradicación, etc.) comparada con el control de referencia. B) Variación de la temperatura máxima año 99; C) Variación de la temperatura mínima año 99 y D) Distribución de la precipitación total mensual año 99, comparadas con la década 87-97 y año 98 (Est. CENIAP), respectivamente.

Conclusiones

Se puede concluir que la cepa T6-10 con capacidad protectora contra el PRSV-P severo local en condiciones de cobertizo y campo, demostró ser comparable con las cepas V1-17 y V1-37 (6, 7). No obstante, las prácticas agronómicas complementarias como la aplicación de aceite blanco y la erradicación de plantas enfermas, junto al empleo de la cepa atenuada

fueron los factores principales en el control de la enfermedad en este estudio. Además, recomendamos el manejo integral de la enfermedad donde se incluyan las prácticas culturales aplicadas en este referencial tecnológico y planificar un estudio de la población de áfidos en trabajos futuros.

Literatura citada

1. Azkue, M. y A. Cortez. 1999. Análisis comparativo de la variación climática en el año 98 y el periodo 1987-97 de la estación CENIAP, Maracay Venezuela. Memorias IX Congreso Nacional de Meteorología. p. 17-19. En: Variabilidad Climática en México. Universidad de Guadalajara, México.
2. Gonsalves, D. 1998. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:415-431.
3. Lecoq, H. 1998. Control of plant virus diseases by cross protection. p. 33-40. En: A. Hadidi, R. Khetarpal and H. Koganezawa (Eds.). *Plant Virus Disease Control*. APS Press. St. Paul, Minnesota.
4. Matthews, R.E.F. 1991. *Plant Virology*. Thirht edition. Academic Press. San Diego.
5. Shukla, D., C. Ward y A. Brunt. 1994. *The Potyviridae*. CAB. International. UK, Wallingford.
6. Vegas, A., A. González, G. Trujillo e I. Pino. 1998. Dificultades en el diagnóstico serológico de cepas atenuadas del virus de la mancha anillada de la lechosa. *Fitopatol. Venez.* 11:40-44
7. Vegas, A., I. Pino, G. Trujillo, A. González, J. Mata y E. Monteverde. 2000. Avances sobre el control integrado del virus de la mancha anillada del lechoso, mediante la implementación de la inoculación de cepas atenuadas y prácticas culturales. *Agron. Trop (Maracay)*. 50(2):303-309
8. Vegas, A., M. Cermeli y G. Trujillo. 1985. Importancia, distribución e incidencia de los virus que afectan a la lechosa (*Carica papaya*, L.) en algunas zonas productoras del país. *Agron. Trop (Maracay)*. 14:213-237
9. Wang, H., S. Yeh, R. Chiu y D. Gonsalves. 1987. Effectiveness of cross-protection by mild mutants of papaya ringspot virus for control of ringspot disease of papaya in Taiwan. *Plant Dis.* 71:491-497
10. Yeh, S. y D. Gonsalves. 1994. Practices and perspective of control of papaya ringspot virus by cross protection. p. 237-257. En: *Advances in Disease Vector Research*. Springer Verlag, Inc. New York.
11. Yeh, S., D. Gonsalves, H. Wang, R. Namba y R. Chiu. 1988. Control of papaya ringspot virus by cross protection. *Plant Dis.* 72:375-380
12. Yeh, S. y D. Gonsalves. 1984. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. *Phytopathology* 74:1086-1091