

Performance of native accessions of *Carica papaya* inoculated with PRSV-p using *Aphis nerii*

Comportamiento de accesiones nativas de *Carica papaya* inoculadas con PRSV-p mediante *Aphis nerii*

Rodrigo Flores-Bautista, Catarino Ávila-Reséndiz[†], Juan A. Villanueva-Jiménez*, Programa de Agroecosistemas Tropicales, Campus Veracruz, Colegio de Postgraduados, Km 88.5 Carretera Federal Xalapa-Veracruz, Manlio F. Altamirano, Veracruz, CP 91690, México; Cristian Nava-Díaz, Programa de Fitosanidad-Fitopatología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP. 56230, México; Enrique Noé Becerra Leor, Campo Experimental Cotaxtla, CIRGOC, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km 34 Carretera Federal Veracruz-Córdoba, Municipio Medellín, Veracruz, C.P. 94274, México. *Autor para correspondencia: javj@colpos.mx.

Recibido: 23 de Agosto 2018.

Aceptado: 14 de Diciembre, 2018.

Flores-Bautista R, Ávila-Reséndiz C, Villanueva-Jiménez JA, Nava-Díaz C and Becerra-Leor EN. 2018. Performance of native accessions of *Carica papaya* inoculated with PRSV-p using *Aphis nerii*. Revista Mexicana de Fitopatología 37(1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1808-5

Primera publicación DOI: 28 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 28, 2018.

Resumen. Es posible que exista tolerancia al virus de la mancha anular del papayo (PRSV-p) en plantas nativas de *Carica papaya*. Se evaluó la respuesta de 13 accesiones (Acc) de papayo nativo y la variedad Maradol roja respecto a la incidencia y severidad del PRSV-p, inoculado con el insecto vector *Aphis nerii*, y su relación con el manejo de la planta observado durante su colecta. Las Acc se colectaron en estado silvestre, en traspatio o cultivadas. A los tres meses de edad se inocularon las

Abstract. Tolerance to the papaya ring spot virus (PRSV-p) may exist in native *Carica papaya* plants. The response of 13 native papaya accessions (Acc) and the commercial variety Red Maradol to the incidence and severity of the PRSV-p, inoculated with the vector insect *Aphis nerii*, and their relation with the observed plant management during their collection were evaluated. Acc were collected in the wild, in backyards or in production fields. Three months old-plants were infected with the virus. Disease incidence and severity were measured nine times weekly. Acc 203 and 205 showed the lowest disease severity index (1.0), followed by 147a and 60 (both with 1.7), 94a (2.0) and 197a (2.2); Acc 64a (2.5) and 150 (2.8) reached intermediate severity, followed by 65 and 210b (with 3.3), and by 80, 169 and 188a (with 4.3). Red Maradol variety showed the highest severity index (4.8). In relation to the management in which plants were collected, mean severity in Acc coming from the wild was significantly lower ($P=0.032$) than in Red Maradol,

plantas con el virus. Se evaluó semanalmente la incidencia y severidad en nueve ocasiones. Las Acc 203 y 205 mostraron el menor índice de severidad (1.0), seguidas de 147a y 60 (con 1.7), 94a (2.0) y 197a (2.2); las Acc 64a (2.5) y 150 (2.8) alcanzaron una severidad intermedia, seguidas de la 65 y 210b (con 3.3), y de 80, 169 y 188a (con 4.3). La var. Maradol roja presentó el mayor índice de severidad (4.8). La severidad promedio en las Acc colectadas en manejo silvestre fue significativamente menor ($P = 0.032$) que en Maradol roja, aunque no fue diferente en las Acc que provenían de manejo de plantaciones cultivadas o de traspatio. Es posible que entre las Acc silvestres se encuentren genes de tolerancia al PRSV-p.

Palabras clave: incidencia, severidad, tolerancia, áfidos.

El papayo (*Carica papaya* L.) es un frutal originario de Centroamérica y del Sur de México, aunque su área de domesticación no se ha definido completamente (Fuentes y Santamaría, 2014). La introducción de la variedad (var) Maradol en México desplazó y puso en riesgo de extinción a los genotipos nativos que carecen de propiedades adecuadas para el mercado, pero que presentan diversidad de caracteres, entre los que se encuentran el cera, mamey y coco, comercializados en mercados locales (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2015); en estado silvestre se puede colectar al papayo de monte o pajarito (Romero, 2013). El germoplasma de papayo nativo no se ha evaluado a profundidad, especialmente la susceptibilidad al virus de la mancha anular (PRSV-p), Potyvirus que reduce entre 5 y 100% el rendimiento, impide el crecimiento de la planta y afecta drásticamente el tamaño y calidad del fruto. Este virus es transmitido de manera no

although they were not different from Acc coming from cultivated orchards or from backyards. It is possible that PRSV-p tolerance genes might be found in wild Acc.

Key words: incidence, severity, tolerance, aphids.

Papaya (*Carica papaya* L.) is originally from Central America and southern Mexico, although its area of domestication has not been entirely defined (Fuentes and Santamaría, 2014). Introduction of Maradol variety (var) in Mexico displaced and put at risk of extinction those native genotypes that lack adequate properties for the market, but displaying character diversity, including “cera”, “mamey” and “coco”, sold in local markets (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2015); in the wild is still possible to find “papaya de monte” or “pajarito” (Romero, 2013). Native papaya germplasm has not been evaluated in depth, especially their susceptibility to the papaya ring spot virus (PRSV-p), Potyvirus that reduces yield between 5 and 100%, hinders plant growth and drastically affects fruit size and quality. This virus is transmitted in a non-persistent manner by aphids (Hemiptera: Aphididae), being *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* and *A. nerii* some of the most important (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2015; Hernández-Castro *et al.*, 2015). The Papaya Network of the National System for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (SINAREFI, 2017) rescues native Mexican germplasm in which material tolerant to PRSV-p may exist. Therefore, the objective posed was to evaluate the response of 13 accessions (Acc) of native papaya trees and the red Maradol var regarding the incidence and severity of the PRSV-p, inoculated with the vector insect *A. nerii*, and its relation to plant management during its collection.

persistente por áfidos (Hemiptera: Aphididae), entre los que resaltan *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* y *A. nerii*. (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2015; Hernández-Castro *et al.*, 2015). La Red Papaya del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI (2017) rescata el germoplasma nativo de México, en el que pudiera existir material tolerante al PRSV-p. Por tanto, se planteó como objetivo evaluar la respuesta de 13 accesiones (Acc) de papayo nativo y la var Maradol roja respecto a la incidencia y severidad del PRSV-p, inoculado con el insecto vector *A. nerii*, y su relación con el manejo de la planta durante su colecta.

Material utilizado. Las Acc originales las colectó el Dr. Catarino Ávila Reséndiz (†), ex coordinador de la Red Papaya del SINAREFI (2017). El Centro de Conservación de Semillas Ortodoxas Sur Sureste de la Red proveyó un número limitado de semillas de estas colectas. Por ser recalcitrantes, estas semillas presentan problemas de germinación después de periodos prolongados de conservación. Se obtuvo un bajo número de individuos por accesión, por lo que se utilizaron las Acc que produjeron al menos tres plantas. El Cuadro 1 presenta las características de cada accesión y el tipo de manejo en que fueron colectadas. Además, se utilizó la var Maradol roja de Semillas del Caribe®, por ser la más cultivada en México. La semilla se remojó por 48 h con cambios de agua cada 8 h, y en ácido giberélico 0.1% por 12 h; se colocaron sobre una franela húmeda estéril (15 x 20 cm) doblada, a 35 °C y 80 % de humedad relativa. Las que germinaron, se sembraron en charolas con mezcla (1:1) de Peat Moss® y suelo rico en materia orgánica. Las plántulas se mantuvieron en malla sombra (75%), se regaron y trasplantaron a macetas (20 x 15 cm); al desarrollar entre 8 y 10 hojas verdaderas se pasaron al invernadero del Campus Veracruz, Colegio

Material used. The original Acc were collected by Dr. Catarino Ávila Reséndiz (†), ex coordinator of the Papaya Network of SINAREFI (2017). Network's South Southeast Orthodox Seed Conservation Center provided a limited number of seeds from these collections. Being recalcitrant, these seeds face germination problems after extended periods of conservation. We obtained a low number of individuals per accession, and therefore used the Acc that produced at least three plants. Table 1 presents the characteristics of each accession and the type of management in which they were collected. In addition, the var Red Maradol by Semillas del Caribe® was used, since it is the most widely grown in Mexico. Seeds were soaked for 48 h, replacing water every 8 h, and in gibberellic acid 0.1% for 12 h; they were placed on a folded sterilized moist cloth (15 x 20 cm) at 35 °C and 80 % relative humidity. Those that germinated were grown in trays with a mixture (1:1) of Peat Moss® and soil rich in organic matter. Seedlings were kept under a shade screen (75 %), irrigated and transplanted into pots (20 x 15 cm); after growing 8 to 10 true leaves, they were taken to a greenhouse at the Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. PRSV-p was obtained from papaya leaves gathered in a commercial orchard in Jamapa, Veracruz, Mexico. The presence of the pathogen was confirmed with RT-PCR, technique for the extraction of RNA from PRSV-p, with retrotranscription to generate complementary DNA and PCR with reverse transcriptase, performed using the Zymo Research® RNA extraction kit, as indicated by the manufacturer. RT-PCR was carried out in a Multigene and Labnet® thermocycler with the Promega RT-PCR System ®: PRSV-p CP region was amplified with 3F and 11R primers described by Noa-Carranza *et al.* (2006). Aphids (*A. nerii*) from a virus-free culture were placed on leaves with PRSV-p for an acquisition period of 45

de Postgraduados. El PRSV-p se obtuvo de hojas de papayo colectadas en una huerta comercial en Jamapa, Veracruz, México. La presencia del patógeno se confirmó mediante la técnica RT-PCR para extracción del RNA del PRSV-p, con retrotranscripción para generar DNA complementario y PCR con transcriptasa reversa, el cual se realizó con el kit de extracción de RNA Zymo Research®, según indicaciones del fabricante. La RT-PCR se realizó en un termociclador Multigene y Labnet® con el producto de Promega RT-PCR System®: se amplificó la región CP del PRSV-p con primer 3F y 11R descrito por Noa-Carranza *et al.* (2006). Se colocaron áfidos (*A. nerii*) provenientes de una colonia libres de virus en hojas con PRSV-p por un período de adquisición de 45 a 55 s (Gonsalves *et al.*, 2010; Osorio-Acosta *et al.*, 2010). Se pasaron 10 áfidos a cada una de 13 plantas sanas de papayo Maradol, se mantuvieron durante 2 h, y se eliminaron manualmente. Veinte días después se confirmó la eficiencia de la transmisión mediante RT-PCR, en muestras de hoja de cada planta. Se utilizaron diez plantas positivas al PRSV-p como fuente de inóculo.

Ensayo de invernadero. El ensayo se estableció con tres plantas por Acc o var, las que se inocularon tres veces con áfidos infectivos con la metodología de Osorio-Acosta *et al.* (2010). 1ª inoculación: 31/10/2017; 2ª 21/11/2017; 3ª 22/01/2018. La planta con los áfidos infectivos se confinó en una jaula entomológica de 20 a 30 min. En seguida, se retiraron los insectos.

Las plantas se mantuvieron a 24 ± 3 °C en un invernadero con malla antiáfido durante 63 días después de la inoculación. Se realizaron evaluaciones semanales de la incidencia y severidad de síntomas del PRSV-p en hojas, tallo y peciolo (Cuadro 2).

Incidencia. La incidencia final evaluada por síntomas se confirmó con el kit para PRSV-p de

to 55 s (Gonsalves *et al.*, 2010; Osorio-Acosta *et al.*, 2010). Ten aphids were moved to each of 13 healthy Maradol papaya plants, kept there for 2 h, and then eliminated manually. Twenty days later, the transmission efficiency was confirmed via RT-PCR in leaves samples from each plant. Ten native plants PRSV-p positive were used as a source of inoculum.

Greenhouse test. It was established with three plants per Acc or var, which were inoculated three times with infective aphids with the methodology by Osorio-Acosta *et al.* (2010). 1st inoculation: 31/10/2017; 2nd 21/11/2017; 3rd 22/01/2018. A plant with infective aphids was confined 20 to 30 min in an entomological cage. Immediately afterwards, insects were removed.

Plants were kept at 24 ± 3 °C in a greenhouse with an anti-aphid mesh for 63 days after inoculation. Weekly evaluations of PRSV-p incidence and severity of symptoms were carried out on leaves, stems and petioles (Table 2).

Incidence. The final incidence evaluated by symptoms was confirmed using the PRSV-p AGDIA® kit. Tissue was taken from 42 plants of the 13 Acc and the Red Maradol var; it was placed in bags and taken cold to the Virology Laboratory (Plant Health Program, Colegio de Postgraduados). Each sample was processed in a grinding mill (Dayton Electric®, Mod: 4Z522); the extract was gathered with 100 µl of the extraction buffer. Two replications were added per sample in a 96-well plate along with positive and negative controls. For the incubations, the enzyme-substrate mixture and the buffer washings were carried out following indications according to the manufacturer. Wells were read at 405 nm (Thermo Scientific®, Multiskan FC). $A\geq 2.0$ nm value was considered positive for PRSV-p. The percentage of incidence ($I\%$) of the disease was determined using the formula:

**Cuadro 1. Accesoión o variedad, ubicación geográfica, tipo de fruto y grado de manejo de la colecta de *Carica papaya*.
Table 1. Accession or variety, geographic location, type of fruit and degree of management of *Carica papaya* collected.**

Fecha	Accesión/ Variedad	Localidad- Municipio, Estado	Latitud N Longitud O (°)	Altitud (m)	Tipo	Manejo	Peso fruto (g)	Color pulpa	°Brix	Grosor pulpa (cm)
07/2010	60	Ahuateno- Chicontepec, Veracruz	20.97-98.17	642	Mamey	Traspatio	2020	Amarilla- anaranjada	11	3.7
08/2011	64a	Chilpancingo- Acapulco, Guerrero	17.22-99.53	646	Papaya	Traspatio	650	Amarilla- anaranjada	9	3.1
08/2011	65	Col. San José- Tierra Colorada, Guerrero	17.16-99.53	273	Criolla colorada	Traspatio	800	Amarilla- anaranjada	8	3.0
09/2011	80	El Pericón- Tecanapa, Guerrero	16.98-99.32	627	Papayo	Traspatio	78	Amarilla	13	2.1
09/2011	94a	Cariedad- San Marcos, Guerrero	16.75-99.31	56	Pico de pajarito	Silvestre	7.1	Amarilla	21	0.6
07/2012	147a	Col. José María Pino Suarez- Huimanguillo, Tabasco	17.78-93.64	25	Papayitas	Silvestre	8.5	Amarilla- anaranjada	18	0.9
07/2012	150	Miguel Hidalgo- Huimanguillo, Tabasco	17.67-93.74	24	Papaya	Cultivada	457	Amarilla- anaranjada	10	2.6
07/2012	169a	La Venta- Huimanguillo, Tabasco	18.1-94.04	15	Papaya	Cultivada	834	Amarilla	11	3.4
07/2012	188a	San Carlos- Tenosique, Tabasco	17.43-91.49	42	P. Zapote	Cultivada	2004	Amarilla	11	2.8
07/2012	197a	Tamulté de las Sabana-Centro, Tabasco	18.16-92.79	8	P. Zapote	Cultivada	1980	Amarilla	9	2.9
11/2012	203	Becan- Calakmul, Campeche	18.51-89.46	277	-	Silvestre	7.2	Amarilla	17	0.6
11/2012	205	El Plan de San Luis-Calakmul, Campeche	18.53-89.56	255	-	Silvestre	11.5	Amarilla	14	1.3
12/2012	210b	Conguas- Calakmul, Campeche	18.54-89.92	176	-	Silvestre	8.0	Amarilla	18	1.1
08/2017	Maradol roja	Cuba	-	-	Variedad	Comercial	1800	Rojizo-anaranjada	12	4.0

Cuadro 2. Escala de severidad y descripción de síntomas para la evaluación de plantas de papayo (*C. papaya*) infectadas por el virus del PRSV-p. Ajustado de Rodríguez *et al.* (2013).

Table 2. Scale of severity and description of symptoms for the evaluation of papaya trees (*C. papaya*) infected by the PRSV-p virus. Adjusted from Rodríguez *et al.* (2013).

Severidad	Descripción de síntomas	Rango promedio para calcular severidad
0	Ausencia de síntomas (0%)	0
1	Síntoma inicial del virus, aún sin estar bien definido (1-9%)	5
2	Síntoma evidente, pero puntual en un órgano (10-24%)	17
3	Síntoma que no se encuentra generalizado en todos los órganos y que abarca el 25-50% del órgano afectado	38
4	Síntoma severo y generalizado en el órgano, aunque sólo en 51-75% del órgano	63
5	Síntoma severo y generalizado en todos los órganos (76-100%).	88

AGDIA®. Se colectó tejido vegetal de 42 plantas de las 13 Acc y la var Maradol roja; se etiquetó en bolsas y transportó en frío al Lab. de Virus, Programa de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Cada muestra se maceró en un molino de rodillos (Dayton Electric®, Mod: 4Z522); el extracto se recolectó con 100 µl del buffer de extracción. Se adicionaron dos repeticiones por muestra en una placa de 96 pozos junto a controles positivos y negativos. Para las incubaciones, el conjugado enzima-sustrato y los lavados con buffer se siguieron las indicaciones del fabricante. Los pozos se leyeron a 405 nm (Thermo Scientific®, Multiskan FC). El valor ≥ 2.0 nm se consideró positivo a PRSV-p. El porcentaje de incidencia ($I\%$) de la enfermedad se determinó mediante la fórmula: $1\% = (n_i/N_j)*100$, donde: n_i = Número de plantas enfermas por parcela experimental en el momento de la observación; y N_j = Número total de plantas evaluadas por parcela experimental. Las plantas de las Acc y la var Maradol inoculadas mostraron síntomas visuales del PRSV-p en 64.29 %, confirmado mediante DAS-ELISA. El número de plantas enfermas en las 13 Acc y la var Maradol roja aumentó en el tiempo, con incidencias final del PRSV-p inoculado con *A. nerii* de entre 33.3 y 100 %. Es decir, todas las Acc fueron susceptibles al PRSV-p en condiciones de

$1\% = (n_i/N_j)*100$, where: n_i = number of diseased plants per experimental plot during observation, and N_j = total number of plants evaluated per experimental plot. Visual symptoms of the PRSV-p were displayed in 64.29% of inoculated plants from the Acc and Maradol var, confirmed by DAS-ELISA. Number of diseased plants in the 13 Acc and Red Maradol var increased with time, with final incidences of the PRSV-p inoculated with *A. nerii* between 33.3 and 100%. In other words, all Acc were susceptible to PRSV-p under greenhouse conditions, with clear differences in the proportion of infected plants (Table 3). Acc 65, 94a, 205 were the first to show symptoms of PRSV-p in a plant, on the 3rd week after inoculation (WAI), while red Maradol began with symptoms in two plants; Acc 80a, 210b, 147a, 60 and 203 displayed a plant with symptoms on the 4th WAI, and Acc 188a and 169a displayed two plants with symptoms; Acc 64, 150 and 197a were the last to show the first symptoms of PRSV-p, both in two plants up to the 5th WAI.

The proportion of plants affected in red Maradol and in Acc 188a and 80 increased gradually until they reached a final incidence of 100 %, while in Acc 169, 65, 210b, 94a, 64a, 150 and 197a, incidence increased slowly until it reached 67 %. Acc 147a, 60, 203 and 205 maintained the same proportion

invernadero, con claras diferencias en la proporción de plantas infectadas (Cuadro 3). Las Acc 65, 94a, 205 fueron las primeras en mostrar síntomas del PRSV-p en una planta durante la 3ª semana después de la inoculación (SDI), mientras que Maradol roja inició con síntomas en dos plantas; las Acc 80a, 210b, 147a, 60 y 203 mostraron una planta con síntomas a la 4ª SDI, y las Acc 188a y 169a mostraron dos plantas con síntomas; las Acc 64, 150 y 197a fueron las últimas en manifestar los primeros síntomas del PRSV-p, ambas en dos plantas hasta la 5ª SDI.

La proporción de plantas afectadas en Maradol roja y en las Acc 188a y 80 aumentaron gradualmente hasta alcanzar 100% en incidencia final, mientras que en las Acc 169, 65, 210b, 94a, 64a, 150 y 197a incrementaron más lento su incidencia hasta alcanzar 67%. Las Acc 147a, 60, 203 y 205 se mantuvieron con la misma proporción de plantas afectadas durante todo el periodo (33%), y resultaron menos afectadas por el virus. Esto pudo deberse

of affected plants during the entire period (33%), and they were less affected by the virus. This might be due to a lower susceptibility to transmission by *A. nerii* on these accessions. Selecting Acc with transmission indices of less than 100% might guarantee the production of fruit in the orchard; this factor, although it is not the strongest, might provide tolerance to the virus. Rodríguez *et al.* (2013) also mentioned that all Acc of papaya plants evaluated in the field were sensitive to PRSV-p, with differences in time of infection between them. It is therefore likely that the differences in tolerance of the Acc to the PRSV-p have a genetic origin. Gonsalves *et al.* (2010) indicate that no natural resistance to this virus has been found in *C. papaya*, although tolerant lines have been found in the Philippines, Taiwan, Thailand, and Florida, USA, which, once are diseased, do not produce adequate fruits for the market, either. However, delaying the beginning of the infection allows for a production of quality fruits (Hernández-Castro *et*

Cuadro 3. Incremento temporal de la incidencia del PRSV-p en 13 accesiones de papayo nativo y var Maradol roja en condiciones de invernadero.

Table 3. Temporary increase of the incidence of PRSV-p in 13 accessions of native papaya and the var red Maradol under greenhouse conditions.

Accesiones	Inicio de la incidencia (Semana)	Incidencia inicial (%)	Incidencia final (%)	Área bajo la curva de incidencia vs. severidad
Maradol	3	67	100	242
188a	4	67	100	201
80	4	33	100	139
169	4	67	67	155
65	3	33	67	155
210b	4	33	67	132
64a	5	67	67	107
94a	3	33	67	101
150	5	67	67	92
197a	5	67	67	57
147a	4	33	33	77
60	4	33	33	57
203	4	33	33	41
205	3	33	33	39

a que estas accesiones son menos susceptibles a ser transmitidas por *A. nerii*. Al seleccionar Acc con índices de transmisión menores a 100% se podría garantizar la producción de fruta en la huerta; este factor, aunque no es el más fuerte, podría aportar tolerancia al virus. Rodríguez *et al.* (2013) también mencionaron que todas las Acc de papayo que evaluaron en campo resultaron sensibles al PRSV-p, con diferencias en tiempo de infección entre ellas. Por tanto, es probable que las diferencias de tolerancia de las Acc al PRSV-p sean de origen genético. Gonsalves *et al.* (2010) indican que no se ha identificado resistencia natural a este virus en *C. papaya*, pero se conocen líneas tolerantes en Filipinas, Taiwán, Tailandia y Florida, EUA, las que al enfermarse, tampoco producen frutos aptos para su venta en el mercado. Sin embargo, el retraso del inicio de la infección permite que se produzcan frutos con calidad (Hernández-Castro *et al.*, 2015); por ello se deben reconocer las Acc con un periodo largo de incubación que permitan obtener los primeros frutos sanos. En Taiwán la incidencia de la enfermedad en líneas no transgénicas de papayo en campo se presentó a los 29 días del trasplante, mientras que las líneas transgénicas enfermaron cinco meses después (Bau *et al.*, 2004).

Severidad. La estimación visual del valor de severidad por planta se transformó al promedio del rango porcentual indicado en la descripción de síntomas (Cuadro 2); esto constituyó el nivel de daño en el momento de la evaluación (X_{ki}), que se utilizó para calcular el índice de severidad promedio (IS) por accesión, mediante la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{\sum_{i=1}^k X_{ki} * N_{ki}}{N_j}, \text{ donde además, } N_{ki} = \text{Número de plantas con el nivel del daño en el momento de la evaluación; y } N_j = \text{Número total de plantas evaluadas. Todas las Acc y la var Maradol roja mostraron un incremento en la proporción de síntomas evaluados durante las nueve semanas después de}$$

al., 2015), which is why it is crucial to recognize the Acc with a long incubation period to help obtain the first healthy fruits. In the fields of Taiwan, the incidence of the disease in non-transgenic papaya lines appeared 29 days after transplanting, while transgenic lines acquired the disease five months later (Bau *et al.*, 2004).

Severity. The visual estimation of the severity value per plant was transformed into the mean percentage rank indicated in the description of symptoms (Table 2); this constituted the level of damage during the evaluation (X_{ki}), which was used to calculate the mean severity index (IS) per accession, using the formula $IS = \frac{\sum_{i=1}^k X_{ki} * N_{ki}}{N_j}$, where, in addition, N_{ki} = number of plants with the level of damage at the moment of evaluation; and N_j = total number of plants evaluated. All Acc and the var red Maradol displayed an increase in the proportion of symptoms evaluated in the nine weeks after inoculation (WAI), although there were differences between them. The highest PRSV-p severity was observed in the Red Maradol var (with a mean severity index of 4.8), followed by Acc 88, 169 and 188a (4.3), Acc 210b and 65 (3.3), Acc 150 (2.8) and 64a (2.5), and were therefore considered the most susceptible to the disease (Figure 1, Right). The high susceptibility of red Maradol to the PRSV-p is probably caused by not been selected for tolerance to the virus. From those Acc that presented the latest incidence, 205 and 203 displayed the lowest mean severity index (1.0) on week nine. Acc 60 and 147a displayed a mean severity index of 1.7, followed by 94a with a value of 2.0, and by 197a with 2.2 (Figure 1, Left). These genotypes have the potential of being used as a source of tolerance in genetic breeding programs for papaya. In Cuba, Rodríguez *et al.* (2013) evaluated four promising accessions for seven months under field conditions; in three of them they obtained a low mean final

la inoculación (SDI), aunque se presentaron diferencias entre ellas. La severidad más alta por el PRSV-p se pudo observar en la var Maradol roja (con un índice de severidad promedio de 4.8), seguida de las Acc 88, 169 y 188a (4.3), las 210b y 65 (3.3), la 150 (2.8) y la 64a (2.5), por lo que se consideraron las de mayor susceptibilidad a la enfermedad (Figura 1, Derecha). Probablemente, la alta susceptibilidad de Maradol roja al PRSV-p se deba a que esta var comercial no fue seleccionada por tolerancia a este virus. De las Acc que presentaron la incidencia más tardía, la 205 y la 203 exhibieron el menor índice de severidad promedio (1.0) a la semana nueve. Las Acc 60 y 147a mostraron un índice de severidad promedio de 1.7, seguidas de la 94a con un valor de 2.0 y la 197a con 2.2 (Figura 1, Izquierda). Estos genotipos tienen el potencial para ser usados como fuente de tolerancia en programas de mejoramiento genético del papayo. En Cuba, Rodríguez *et al.* (2013) evaluaron cuatro accesiones prometedoras durante siete meses bajo

severity of the symptoms reported for stem, petiole, foliage and fruit: “Sapote de Pílon en Cuba” (2.3), “Amarilla de Duaba” (2.4) and “Amarilla de Nava” (2.5); the Acc “Tallo Morado de Nava” was the most effective in the trial (3.1), yet in none of the four was the final severity in fruit above 2.5; the authors considered these materials as tolerant and with potential to be used as base material in genetic breeding programs for papaya in that country. The level of tolerance by severity in this investigation is comparable with that of 10 transgenic lines that Bau *et al.* (2003) classified as resistant, since they kept symptoms moderate five WAI. Because the present test was carried out during nine WAI, it is possible for the severity to increase during the lifetime of the plants. However, a delay in the infection of at least 5 weeks at the beginning of the development of the plant may produce differences in yield of over 50%, even in susceptible materials such as Red Maradol (Hernández-Castro *et al.*, 2010). On the other hand, advanced intergenetic

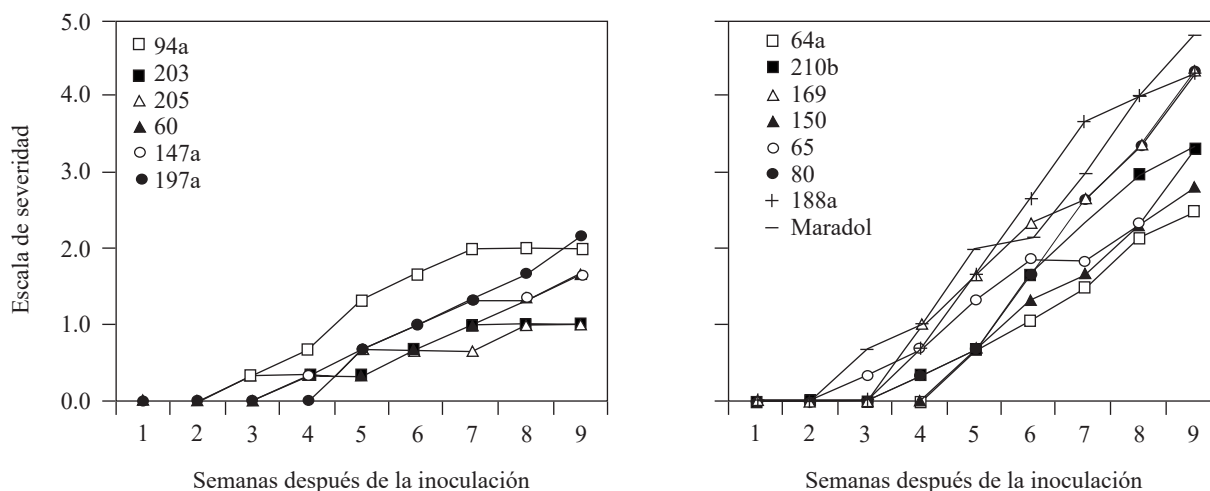


Figura 1. Dinámica del índice de severidad promedio del PRSV-p inoculado con *A. nerii*, durante nueve semanas después de la inoculación. Izquierda: Las seis accesiones de menor índice de severidad. Derecha: Variedad Maradol roja y las siete accesiones de mayor índice de severidad.

Figure 1. Dynamics of the mean severity index PRSV-p inoculated with *A. nerii* for nine weeks after inoculation. Left: six accessions with the lowest severity index. Right: Red Maradol variety and seven accessions with the highest severity index.

condiciones de campo; en tres de ellas obtuvieron baja severidad final promedio de los síntomas reportados en tallo, peciolo, follaje y fruto: Sapote de Pilon en Cuba (2.3), Amarilla de Duaba (2.4) y Amarilla de Nava (2.5); la Acc Tallo Morado de Nava resultó ser la más afectada en el ensayo (3.1); sin embargo, en ninguna de las cuatro, la severidad final en fruto fue mayor a 2.5; los autores consideraron estos materiales como tolerantes y con potencial para ser utilizados como material base en programas de mejoramiento genético de papayo en ese país. El nivel de tolerancia por severidad en esta investigación es comparable con el de 10 líneas transgénicas que Bau *et al.* (2003) clasificaron como resistentes, al mantener síntomas atenuados cinco SDI. Debido a que el presente ensayo se llevó a cabo durante nueve SDI, es posible que la severidad aumente durante la vida de las plantas. Sin embargo, un retraso de la infección de al menos 5 semanas, al inicio de desarrollo vegetal, puede lograr diferencias en rendimiento superiores al 50%, incluso en materiales susceptibles como Maradol roja (Hernández-Castro *et al.*, 2010). Por otro lado, cruza intergenéricas avanzadas (F6) de *C. papaya* (var Arka Surya) con *Vasconcellea cauliflora* realizadas por Yanthan *et al.* (2017) generaron siete progenies tolerantes al PRSV-p bajo condiciones de campo. En años anteriores, el grupo de Gonsalves *et al.* (2010) introdujo la cápside del PRSV-p cepa HA 5-1 a var transgénicas comerciales del grupo Solo y desarrolló resistencia al PRSV-p. Sin embargo, en México aún no ha permitido el cultivo de var de papayo transgénicas.

Manejo de accesiones durante la colecta. Los datos del IS se analizaron por Kruskal y Wallis para separar los grupos de Acc respecto al manejo observado durante la colecta del material. El análisis mostró diferencias ($P=0.032$) entre el porcentaje de síntomas de las Acc asociados a los manejos.

crosses (F6) of *C. papaya* (var Arka Surya) with *Vasconcellea cauliflora* carried out by Yanthan *et al.* (2017) produced seven progenies tolerant to PRSV-p under field conditions. In previous years, the group of Gonsalves *et al.* (2010) introduced the capsid of the PRSV-p strain HA 5-1 to transgenic varieties of the Solo group and developed PRSV-p resistance. However, Mexico has still not allowed the production of transgenic varieties of papaya.

Management of accessions during collections. IS data were analyzed by Kruskal and Wallis to separate the groups of Acc regarding the management observed during the collection of the material. The analysis showed differences ($P=0.032$) between the percentage of symptoms of the Acc related to management. Acc found in the wild with no management presented the lowest severity, in comparison with the commercial var Red Maradol, while Acc with backyard management and planted in orchards did not present different percentage of severity between them (Figure 2). This confirms that it is in wild genotypes where the largest gene bank may lie for tolerance to the infection of the virus, since these are genotypes that have not yet been selected by man. In this regard, d'Eeckenbrugge *et al.* (2014) mention that within Caricaceae there are 21 wild species of the genus *Vasconcellea*, which have a potential to resist the virus PRSV-p, and could be used to generate resistance in commercial populations. In the Philippines, Alviar *et al.* (2012) indicate that Sinta is a papaya hybrid with a parent line of the genus *Cariflora* that inherits to the hybrid a high PRSV-p tolerance, therefore infected plants do not reduce their yields. This highlights the importance of evaluating a var or accession regarding the infection of the virus as a strategy for the development of resistant varieties.

Despite its preliminary connotation, we suggest to replicate this investigation with more

Las Acc encontradas en estado silvestre sin manejo presentaron la menor severidad respecto a la var comercial Maradol roja, mientras que las Acc con manejo de traspatio y cultivadas no presentaron un porcentaje de severidad diferente entre sí (Figura 2). Esto corrobora que es en los genotipos silvestres donde podría estar el mayor banco de genes para tolerar la infección al virus, por ser genotipos que aún no han sido seleccionados por el hombre.

Al respecto, d'Eeckenbrugge *et al.* (2014) mencionan que dentro de Caricaceae existen 21 especies silvestres del género *Vasconcellea*, que cuentan con un potencial de resistencia al virus PRSV-p, que podrían ser usadas en la generación de poblaciones comerciales resistentes. En Filipinas, Alviar *et al.* (2012) indican que Sinta es un híbrido de papayo con una línea parental del género *Cariflora* que le hereda alta tolerancia al PRSV-p, con lo que las plantas infectadas no reducen sus rendimientos. Esto resalta la importancia de evaluar el comportamiento de una var o accesión con respecto a la infección del virus como una estrategia para el desarrollo de var resistentes.

A pesar de su carácter preliminar, se sugiere replicar esta investigación con más accesiones y evaluarlas hasta la etapa de fructificación. Debido a las limitaciones para el uso de transgénicos, los esfuerzos mexicanos para mantener bancos de accesiones de material silvestre de papayo deberán aprovechar la disponibilidad del genoma completo del papayo para identificar marcadores genéticos e identificar los genes de tolerancia o resistencia en materiales sobresalientes de *C. papaya* (Porter *et al.* 2013), con lo que se podrá sistematizar rápida y eficientemente el avance de programas de desarrollo de genotipos resistencia a este y otros virus.

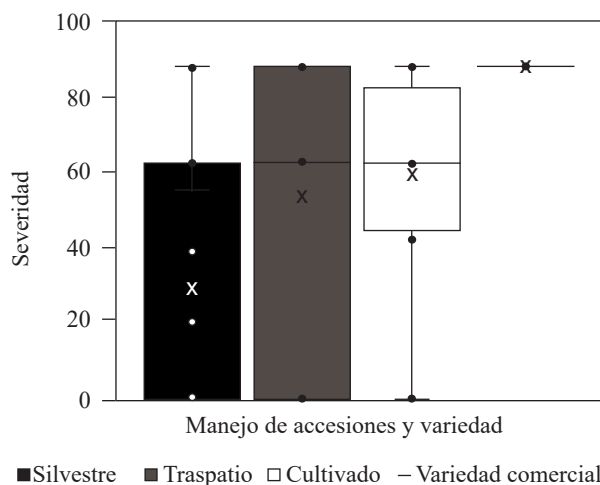


Figura 2. Distribución de severidad entre grupos de accesiones de papayo (*Carica papaya* L.), según su manejo.

Figure 2. Distribution of severity in groups of accessions of papaya (*Carica papaya* L.), according to their management.

accessions, evaluating them until fruit set. Due to the limitations for the use of transgenics, Mexican efforts to maintain accession banks of wild papaya material should take advantage of the papaya complete genome availability to identify genetic markers and identify the tolerance or resistance genes in outstanding *C. papaya* materials (Porter *et al.* 2013), so the advancement of development programs for resistance genotypes to this and other viruses can be systematized in a quick and efficient manner.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## LITERATURA CITADA

- Alviar NA, Sta Cruz FC and Hautea DM. 2012. Assessing the responses of tolerant papaya (*Carica papaya* L.) varieties to *papaya ringspot virus* (PRSV) infection and establishment of symptom severity rating scale for resistance screening. *Philippine Journal of Crop Science* 37:20-28. <http://www.cssp.org.ph/pjcs/abstracts/volume-37-issue-no-2-august-2012/>
- Bau HJ, Ying-Huey C, Tesong-Ann Y, Jiu-Sherng Y and Shyi-Dong Y. 2003. Broad-spectrum resistance to different geographic strains of *papaya ringspot virus* in coat protein gene transgenic papaya. *Phytopathology* 93:112-120. <https://ap-sjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.2003.93.1.112>
- Bau HJ, Ying-Huey C, Tesong-Ann Y, Jiu-Sherng Y, Chi-Hsiung H, Chien-Yih L and Shyi-Dong Y. 2004. Field evaluation of transgenic papaya lines carrying the coat protein gene of *papaya ringspot virus* in Taiwan. *Plant Disease* 88:594-599. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.6.594>
- d'Eeckenbrugge G, Drew R, Kyndt T and Scheldeman X. 2014. *Vasconcellea* for papaya improvement. In: Ming R and Moore PH. (eds.) *Genetics and Genomics of Papaya*. Springer, New York. pp. 47-79. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-8087-7\\_4](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-8087-7_4)
- Fuentes G and Santamaría JM. 2014. Papaya (*Carica papaya* L.): Origin, domestication, and production. In: R Ming and Moore PH (eds.). *Genetics and Genomics of Papaya*. Springer, New York. pp. 3-15. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7_1)
- Gonsalves D, Tripathi S, Carr JB and Suzuki JY. 2010. Papaya ringspot virus. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2010-1004-01>
- Hernández-Castro E, Villanueva-Jiménez JA, Mora-Aguilera JA y Nava-Díaz C. 2010. Barreras de maíz en una estrategia de manejo integral para controlar epidemias del virus mancha anular del papayo (PRSV-P). *Agrociencia* 44:339-349. <http://www.redalyc.org/pdf/302/30215552008.pdf>
- Hernández-Castro E, Nava DA, Mora AJA, Villanueva-Jiménez JA, Vargas AD and Palemón FA. 2015. Incidence of the *papaya ringspot virus* (PRSV-p) and management in the state of Guerrero, Mexico. In: Dimitrov TS and Vitanova II. *Tropical Fruits*. Nova Science Publishers Inc. pp. 119-127. [https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=54114](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=54114)
- Noa-Carrazana J, González LD, Ruiz-Castro B, Piñero D and Silva-Rosales L. 2006. Distribution of *papaya ringspot virus* and *papaya mosaic virus* in papaya plants (*Carica papaya* L.) in Mexico. *Plant Disease* 90:1004-1011. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1004>
- Osorio-Acosta F, Villanueva-Jiménez JA, Celis-León B, Morales-Rodríguez A y José-Pablo R. 2016. Insecticidas en la transmisión del virus de la mancha anular de *Carica papaya* L., mediante *Aphis nerii* (Boyer de Fonscolombe). *Agroproductividad* 9(10):68-74 <http://www.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/834>
- Porter BW, Christopher DA and Zhu YJ. 2013. The phylogeny of Caricaceae. In: Ming R and Moore PH (eds.). *Genetics and Genomics of Papaya*. Springer, New York. pp. 277-307. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7_15)
- Rodríguez D, Alonso M, Tornet Y, Valero L, Lorenzetti, ER and Pérez R. 2013. Assessment of Cuban papaya (*Carica papaya* L.) accessions against ringspot. *Summa Phytopathologica* 39:24-27. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052013000100004>
- Romero RJA. 2013. Manejo y conservación de germoplasma de la familia Caricaceae. Tesis de Doctorado. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 145 p. <http://www.secheresse.info/spip.php?article35498>
- SINAREFI, Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. 2017. MacroRed Frutales. SNICS, SAGARPA, México. 62 p. <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/macro-red-frutales> (consulta: mayo 2018).
- Villanueva-Jiménez JA, Abato-Zárate M y Reyes-Pérez N. 2015. Plagas del papayo en México. In: Otero-Colina G, Abato-Zárate M y Villanueva-Jiménez JA. (eds.). *Ácaros Asociados al Cultivo de Papayo en México*. Editorial Colegio de Postgraduados. México. pp. 29-40. <https://www.researchgate.net/publication/294893439>
- Yanthan LJ, Vasugi C, Dinesh MR, Reddy K and Das R. 2017. Evaluation of F6 intergeneric population of papaya (*Carica papaya* L.) for resistance to *papaya ring spot virus* (PRSV). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6:289-298. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.033>