



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

**“PAPAYA VIRUS Q (PpVQ): TRANSMISIÓN Y SU POSIBLE
ASOCIACIÓN CON PRSV Y PMeV”**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Magister en
Investigación en Biotecnología Agrícola**

Presentado por:

Juan Francisco Cornejo Franco

Guayaquil – Ecuador

2018

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), a Robert Álvarez y Jhonny España quienes aportaron en la realización de este estudio, al equipo de trabajo de la empresa Terrasol dirigido por Jorge Cueva y por último al tutor de esta tesis Diego Quito por su invaluable dedicación a esta investigación.

DEDICATORIA

A Dios, a mis queridos padres Lourdes y Juan, a mis
hermanas y a mi compañera de vida Gabriela.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Diego Quito Avila, Ph.D.
DIRECTOR DE TESIS

Jonathan Coronel León, Ph.D.
CO-DIRECTOR DE TESIS

Efrén Santos Ordóñez, Ph.D.
VOCAL

Luis Galarza Romero, Ph.D.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Juan Francisco Cornejo Franco

GLOSARIO

Agarosa: Producto natural que forma una matriz inerte, que constituye una herramienta indispensable en gran cantidad de técnicas de biología molecular.

Concomitante: Dícese del síntoma o de la enfermedad que ocurre durante el mismo tiempo que otra.

Electroforesis: Técnica que permite separar ácidos nucleicos o proteínas a lo largo de un campo eléctrico en función de su tamaño y de su carga eléctrica.

Filogenia: Es el campo de la Biología que se dedica de forma exclusiva a estudiar y conocer el origen de los seres vivos.

Genoma: Totalidad del material genético que posee un organismo o una especie en particular.

Gen putativo: Es un gen donado, un gen que no es original de la cadena de ADN donde está ubicado, pero es de utilidad.

Hibridación: Es un proceso en el cual se combinan dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y con secuencias de bases complementarias en una única molécula de doble cadena.

Homología: Es la relación que existe entre dos partes orgánicas diferentes cuando sus determinantes genéticos tienen el mismo origen evolutivo.

Inoculación: Transmisión por medios artificiales de una enfermedad contagiosa.

Polimerasa: Enzima capaz de transcribir o replicar ácidos nucleicos.

Primers: Un cebador, iniciador o primer es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

INDICE GENERAL

	<i>Página</i>
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tablas.....	ix
Resumen.....	1
Capítulo I: Introducción y Objetivos.....	3
Antecedentes y justificación.....	3
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
Marco Teórico.....	4
Capítulo II: Metodología.....	8
Identificación de la(s) forma(s) de transmisión de PpVQ.....	8
Recolección de muestras.....	8
Detección de virus.....	8
Ensayo de transmisión mediante artrópodos.....	10
Ensayo de transmisión mecánica.....	10
Ensayo de transmisión por semilla.....	11
Determinación de estatus de meleira y su asociación con PpVQ y PRSV.....	11
Detección simultánea de PpVQ, PMeV y PRSV mediante RT - PCR.....	11
Prospección de meleira y su posible asociación con PpVQ.....	12
Capítulo III: Resultados y Discusión.....	13
Prospección e identificación de la(s) forma(s) de transmisión de PpVQ.....	13
Ensayo de transmisión mediante artrópodos.....	14
Ensayo de transmisión mecánica.....	14
Ensayo de transmisión por semilla.....	15
Determinación del estatus de meleira y su asociación con PpVQ y PRSV.....	15
Detección de meleira en plantas de babaco.....	17
Conclusiones y Recomendaciones.....	21
Bibliografía.....	23
Anexos.....	26
Anexo A.....	26
Anexo B.....	26
Anexo C.....	27
Anexo D.....	27

INDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1. Detección mediante RT-PCR (dúplex) de la presencia de Papaya virus Q (PpVQ) y Papaya ringspot virus (PRSV) en plantas de papaya	13
Figura 2. Detección de Papaya virus Q (PpVQ) en plantas inoculadas con mosca blanca	14
Figura 3. Productos de amplificación de PCR para la detección de Papaya virus Q (PpVQ), Papaya ringspot virus (PRSV) y Papaya meleira virus (PMeV)	17
Figura 4. Comparación, a nivel de nucleótidos, de la secuencia parcial del gen de la polimerasa de Papaya meleira virus (PMeV)	18
Figura 5. Relaciones filogenéticas entre PpVQ, umbra-like virus asociados con meleira, y miembros establecidos del género <i>Umbravirus</i> y <i>Tombusviridae</i>	19

INDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla I. <i>Primers</i> de detección utilizados en el ensayo de RT-PCR triplex	16

ABREVIATURAS

PCR:	Polymerase chain reaction.
dds:	Días después de la siembra.
PpVQ:	Papaya virus Q.
PRSV:	Papaya ringspot virus.
DEPC:	Diethyl pirocarbonato
pb:	Pares de bases.
kpb:	Kilo pares de bases.
ARN:	Ácido ribonucleico.
RT-PCR:	Reverse transcription polymerase chain reaction
°C:	Grados Celsius.
PMeV:	Papaya Meleira virus.
PMeV-Mx:	Papaya Meleira virus México.
nm:	Nanómetro
rpm:	Revoluciones por minuto.
M:	Molar.
mg:	Miligramo.
ml:	Mililitro.
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
µl:	Microlitro.

Resumen

A nivel mundial, uno de los principales problemas fitosanitarios que los productores de papaya deben enfrentar son aquellos de origen viral, esto debido a la devastación que producen sobre los cultivos y a la falta de medidas de protección efectivas a nivel de campo. En el 2015, un nuevo virus fue reportado en cultivos comerciales de papaya en Ecuador. El virus (provisionalmente llamado Papaya virus Q, PpVQ) ha sido parcialmente caracterizado y tiene un genoma cuya secuencia muestra homología (con identidades de hasta 40% a nivel de amino ácidos) con miembros del género *Umbravirus* y otros de la familia *Tombusviridae*. En el 2016, un virus genéticamente cercano a PpVQ fue encontrado en Brasil y atribuido como uno de los causantes de la principal enfermedad de ese país conocida como meleira. Dichos hallazgos elevaron el interés de estudiar aspectos epidemiológicos de PpVQ tales como su forma de transmisión y su posible asociación e interacción con otros virus como Papaya ringspot virus (PRSV) y Papaya meleira virus (PMeV) en cultivos comerciales de Ecuador. Considerando lo antes expuesto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar tres posibles formas de transmisión de PpVQ: i) transmisión mediante artrópodos; ii) transmisión mecánica y iii) transmisión por semilla. Además, en este trabajo se realizó la detección simultánea de PRSV, PpVQ y PMeV mediante RT-PCR múltiplex. Debido al potencial daño que podría originarse por las diferentes asociaciones entre estos virus o por sí mismos, se demanda un sistema de detección simultáneo efectivo. La identificación del vector de PpVQ involucró análisis a nivel de laboratorio y experimentos de inoculaciones controladas a nivel de invernadero, usando artrópodos comúnmente presentes en cultivos de papaya con alta incidencia de PpVQ. En cuanto a la transmisión mecánica, se establecieron experimentos de inoculación usando extractos de ARN de plantas portadoras de PpVQ y macerados de hojas infectadas en soluciones de fosfato. Diferentes investigaciones demuestran que son pocos los virus con porcentajes altos de transmisión por semilla, aun así, dicho modo de transmisión es muy importante en la epidemiología del virus, por lo cual, se analizaron plántulas obtenidas a partir de semillas de plantas infectadas y mantenidas bajo condiciones de invernadero.

Los ensayos de transmisión demostraron que PpVQ es transmitido por mosca blanca (*Bemisia tabaci*), presumiblemente en forma semi-persistente, ya que no se observó transmisión mecánica. No se observó transmisión por semilla. Finalmente, los resultados obtenidos a partir de prospecciones en plantaciones comerciales de papaya pertenecientes a tres provincias descartaron la presencia de PMeV e incluso una

posible interacción entre PpVQ y PRSV. Sin embargo, prospecciones realizadas en plantas de babaco (*Vasconcellea × heilbornii*; *syn. Carica pentagona*) revelaron la presencia de dos virus con homología (con altos porcentajes de identidad) a PpVQ y PMeV, respectivamente. Lo cual sugiere la potencial presencia de un aislado de PMeV que ha eludido su detección en plantas de papaya.

Capítulo 1

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En Ecuador, la papaya se cultiva comercialmente por más de 40 años. Las exportaciones de papaya desde nuestro país empezaron en el año 2002 siendo Europa el principal mercado (ProEcuador, 2015). La variedad hawaiana, introducida al país en 1985, es la más vendida internacionalmente. Sin embargo, variedades como la maradol, tainung y criolla son las más cotizadas a nivel local (ProEcuador, 2015).

Muchos son los problemas fitosanitarios que los productores de papaya, a nivel mundial, deben enfrentar para obtener ganancias en este negocio. Los desórdenes de naturaleza viral, sin embargo, son los más devastadores debido a que no existe forma de control a nivel de campo.

En Ecuador, Papaya ringspot virus (PRSV) es, sin duda, el principal problema responsable de cuantiosas pérdidas económicas. Recientemente, un nuevo virus, provisionalmente llamado Papaya Virus Q, (PpVQ, “Q” por Quevedo, lugar en donde fue originalmente encontrado), ha despertado especial interés de los investigadores debido a su potencial asociación con PRSV u otros virus que podría resultar en nuevas enfermedades (Quito-Avila et al. 2015).

1.1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Investigaciones realizadas en Ecuador han determinado que PpVQ se encuentra presente en al menos tres provincias productoras de papaya (Guayas, Los Ríos y Santo Domingo), y dependiendo de las condiciones, la incidencia del virus puede llegar al 80 % en periodos de hasta tres meses, lo cual sugiere la existencia de un vector aéreo (Quito-Avila et al. 2015). Hasta el momento, el virus no ha sido asociado a ningún síntoma visual en provincias ecuatorianas en donde se lo ha encontrado (Quito-Avila et al. 2015). Sin embargo, recientes estudios realizados en Brasil y México revelaron la presencia de un virus asociado a la enfermedad conocida como meleira causada por el virus del mismo nombre (Papaya meleira virus,

PMeV). El virus llamado PMeV-2 en Brasil (Sa Antunes et al. 2016) y PMeV-Mx en México (Zamudio-Moreno et al. 2015) muestra homología a PpVQ, con identidades superiores a 70% a nivel de nucleótidos. En Brasil, se determinó que los síntomas de meleira son producidos cuando PMeV y PMeV-2 están presentes en la misma planta, indicando la existencia de una interacción entre estos dos virus (Sa Antunes et al. 2016). En Ecuador, sin embargo, la principal enfermedad que afecta al cultivo de papaya es la mancha anular, producida por PRSV. Si bien la enfermedad de meleira no ha sido reportada en nuestro país, su agente causal (PMeV) no ha sido incluido en pruebas formales de detección. Estos antecedentes hacen necesario el estudio de aspectos epidemiológicos de PpVQ, como su forma(s) de transmisión, su posible asociación con PRSV y la potencial presencia de PMeV en Ecuador.

1.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar la(s) vía(s) de transmisión del Papaya virus Q (PpVQ), y su relación con Papaya ringspot virus (PRSV) y Papaya meleira virus (PMeV).

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la(s) forma(s) de transmisión de PpVQ, bajo condiciones controladas.
- Determinar el estatus de la enfermedad de meleira en cultivos comerciales de papaya en tres provincias ecuatorianas y su asociación con la presencia de PpVQ y PRSV.

1.4. MARCO TEÓRICO

- Papaya virus Q (PpVQ)

Papaya virus Q, nombrado así por la localidad (Quevedo, cantón de la provincia de Los Ríos; Ecuador) en donde fue detectado por primera vez, posee un genoma de ARN de cadena simple con un tamaño aproximado de

4.5 kpb (Quito-Avila et al. 2015). Análisis filogenéticos han demostrado que PpVQ comparte un ancestro común con especies del género *Umbravirus* y otros de la familia *Tombusviridae* (Talianky y Robinson 2003). Prospecciones realizadas en Ecuador han evidenciado la presencia del virus en zonas productoras de al menos tres provincias. Hasta ahora, sin embargo, el virus no ha sido asociado a ningún tipo de síntoma ya sea en frutos o en hojas. Además, estudios preliminares revelaron que bajo condiciones de alta presión de inóculo PpVQ se disemina en forma rápida, sugiriendo que su transmisión se da mediante un artrópodo vector. Sin embargo, experimentos controlados de transmisión usando áfidos (el principal vector de PRSV en papaya) no lograron inocular PpVQ en plántulas de papaya (Quito-Avila et al. 2015). Al igual que con los umbravirus, los análisis de los marcos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés) en el genoma de PpVQ no han identificado un gen que codifique la proteína putativa de la cápside, sugiriendo la presencia de un virus adicional que “asista” en la protección del genoma y transmisión de PpVQ. En los umbravirus, el virus “asistente” es típicamente un miembro de la familia *Luteoviridae*. Hasta ahora, sin embargo, no se ha evidenciado la presencia de ningún luteovirus en plantas de papaya infectadas con PpVQ. Al contrario, Quito-Avila et al. (2015) reportaron a PRSV (descrito más adelante) como el único virus adicional detectado en co-infecciones con PpVQ. Ante la aparente ausencia de un luteovirus, los autores hipotetizaron el involucramiento de PRSV en la encapsidación y posterior transmisión del genoma de PpVQ.

Estudios recientes realizados en Brasil y México, determinaron la presencia de PMeV-2 y PMeV-Mx, respectivamente, con características similares al genoma de PpVQ (ambos de cadena simple y un tamaño cercano). Análisis de las secuencias del gen putativo de la polimerasa entre estos virus y PpVQ mostraron identidades superiores al 70% a nivel de nucleótidos (Sa Antunes et al. 2016; Zamudio-Moreno et al. 2015, Perez-Brito et al. 2012). El análisis filogenético, además, muestra a los tres virus en un clado que comparte un ancestro común más reciente con el grupo de los *Umbravirus*. Sin embargo, al tratarse de virus no clasificados —sin un grupo taxonómico asignado— dicha identidad deja abierta la posibilidad de que las tres secuencias pertenezcan a tres especies diferentes con un ancestro común más reciente y no a aislados del mismo virus. Lo importante de los recientes hallazgos en Brasil y México

es la asociación directa existente entre P_{MeV}-2 y P_{MeV}-Mx con síntomas de una enfermedad conocida como meleira, un desorden devastador observado y reportado solo en esos dos países. Información sobre meleira, su agente causal y su relación con el nuevo virus tipo umbra se presenta en el siguiente apartado.

- Papaya meleira virus (P_{MeV})

Papaya meleira virus (P_{MeV}) es el agente causal de la enfermedad conocida en Brasil como meleira, término usado para referirse a la enfermedad “pegajosa” de la papaya. Esta enfermedad fue reportada por primera vez en 1980 en Brasil (Kitajima et al. 1989). En 2008, síntomas de meleira fueron por primera vez observados y reportados en México (Perez-Brito et al. 2012). En la actualidad, no existe reporte de la presencia de la enfermedad en un país diferente a los ya mencionados. El síntoma más notorio de meleira es la exudación espontánea de látex de consistencia acuosa, que al secarse en la superficie de los frutos los oscurece dándoles un aspecto desagradable, dificultando su comercialización (Perez-Brito et al. 2012). A P_{MeV} se lo describe como una partícula viral de tipo isométrica con un tamaño aproximado de 50 nm de diámetro y un genoma que consiste en una molécula de ARN de doble cadena de 8.8 kpb (Kitajima et al. 1993; Abreu et al. 2015; Sa Antunes et al. 2016). Estudios filogenéticos, utilizando el gen de la polimerasa, mostraron homología, con bajo porcentaje de identidad, entre P_{MeV} y especies pertenecientes a los géneros *Totivirus*, *Luteovirus* y *Rotavirus* (Araujo et al. 2007; Sa Antunes et al. 2016). Hasta el momento, sin embargo, no existe una clasificación taxonómica para P_{MeV} por parte del Comité Internacional en Taxonomía de Virus. Investigaciones recientes en plantas con síntomas de meleira demostraron la presencia de un virus adicional cuyo genoma es homólogo a PpVQ (70% identidad a nivel de nucleótidos). Debido a su asociación con meleira, el virus ha sido denominado P_{MeV}-2 en Brasil y P_{MeV}-Mx en México (Sa Antunes et al. 2016; Zamudio-Moreno et al. 2015). Estudios complementarios de microscopía electrónica y secuenciación de la siguiente generación, determinaron que solo las plantas que contenían infecciones mixtas de P_{MeV} y P_{MeV}-2/P_{MeV}-Mx mostraban síntomas característicos de la enfermedad; mientras que aquellas con infecciones simples, es decir sólo con P_{MeV}, resultaron asintomáticas. El estudio evidenció, además, que al carecer de un gen que codifique para la proteína de

la cápside, PMeV-2 encapsida su genoma en la cápside proteica de PMeV (Sa Antunes et al. 2016).

- Papaya ringspot virus (PRSV)

Papaya ringspot virus es el agente causal de la enfermedad conocida como el manchado anular de la papaya, esto debido a los anillos concéntricos que se forman en los frutos de plantas infectadas. PRSV posee un genoma de ARN de cadena simple con un tamaño de aproximadamente 10 kpb y se encuentra clasificado en el género *Potyvirus* (Shukla, 1994). Además de los síntomas característicos producidos en los frutos, se puede observar puntos cloróticos a manera de mosaico en hojas y manchas tipo aceitosas sobre los peciolo de las hojas y, a medida que la infección avanza, suele presentarse deformaciones en las hojas (Gonsalves, 1994; Purcifull, 1984). La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en la mayoría de países productores de la fruta y constituye un serio problema fitosanitario (Jensen, 1949).

La transmisión del virus se produce con gran facilidad, debido a la gran cantidad de vectores (más de 20 especies de áfidos) que diseminan el virus de manera no persistente, por lo que el control de la enfermedad a nivel de campo resulta una tarea casi imposible (Gonsalves, 1998; Martins et al. 2016). El desarrollo de plantas transgénicas resistentes a este virus se ha convertido en la única estrategia efectiva de control en países en donde el uso de transgénicos es permitido (Tripathi et al. 2006).

En Ecuador, PRSV ha sido reportado desde hace varios años, causando considerables pérdidas económicas a los productores. El manejo en campo de la enfermedad ha consistido principalmente en la erradicación de plantas con síntomas iniciales (puntos cloróticos), reduciendo de esta manera el potencial del inóculo y evitando la propagación masiva de la enfermedad.

En la actualidad se conoce que PRSV puede interactuar con otros patógenos (algunos de tipo no viral) y resultar en infecciones concomitantes, las cuales pueden desencadenar síntomas más severos o incluso producir nuevas enfermedades (Peña, 2008).

Capítulo 2

2. METODOLOGÍA

2.1. Identificación de la(s) forma(s) de transmisión de PpVQ.

El presente estudio evaluó tres posibles formas de transmisión del virus: i) transmisión mediante artrópodos vectores; ii) transmisión mecánica y iii) transmisión por semilla. Todos los ensayos de transmisión fueron desarrollados bajo condiciones controladas en el área de invernaderos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, ubicado en la ciudad de Guayaquil.

2.1.1. Recolección de muestras

La prospección de virus se realizó en un total de 225 muestras colectadas entre el 2015 y 2016 en tres provincias: El Guayas, Los Ríos y Santo Domingo (Anexo A). En el Guayas, las muestras provinieron de papaya variedad 'Maradol'; mientras que en las dos provincias restantes las plantas fueron de la variedad 'Sunrise' conocida comúnmente como Hawaiana. Para el muestreo se tomaron hojas jóvenes completamente desarrolladas, las cuales son más propensas a expresar síntomas característicos de infección viral.

Las muestras fueron transportadas en hielo y almacenadas a -80 C hasta su procesamiento.

2.1.2. Detección de virus

- Extracción de ARN

Todos los análisis de detección que comprenden esta investigación fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Para la extracción de ARN total se siguió el protocolo descrito por Halgren et al. (2007), el cual es descrito brevemente a continuación. Aproximadamente 100 mg de tejido foliar fue triturado en nitrógeno líquido. Una vez

pulverizado, el tejido fue homogenizado en 1.5 ml de buffer de extracción conteniendo 1% de 2-mercaptoetanol (añadido antes de ser usado). Luego de un paso de centrifugación a 3.000 rpm, 650 μ l del sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo el cual se homogenizó con un volumen igual de acetato de potasio 6M y se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos. Se transfirió 750 μ l del sobrenadante a un tubo con un volumen igual de isopropanol, luego de homogenizada la mezcla, el ARN fue precipitado mediante centrifugación. El pellet fue re-suspendido en 750 μ l de buffer de lavado en presencia de 25 μ l de óxido de silicio (SiO₂). Luego de dos lavados, el pellet fue secado al vacío y el ARN eluído en 150 μ l de agua (grado biología molecular). Para el caso de ARN de artrópodos, el protocolo fue ligeramente modificado tal como lo describe Quito-Avila et al. (2012).

La calidad del ARN fue verificada mediante Nanodrop y amplificación (RT-PCR) de genes constitutivos como el *ndhB* de plantas y actina en el caso de artrópodos.

- Reverse transcription (RT)-PCR

Para la reacción de RT se usó RevertAid® *reverse transcriptase* (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante en un volumen total de 15 μ l, usando 2 μ l de ARN y 0,6 μ l de *primers* aleatorios a 40 μ M. Para la detección inicial de PpVQ y PRSV, la PCR se llevó a cabo en formato dúplex usando Green Taq-*polymerase* (GenScript) siguiendo las instrucciones del fabricante en un volumen total de 10 μ l. Los parámetros de la PCR fueron 94°C durante 4 min, 40 ciclos de 94°C durante 45 s, 57°C durante 30 s, 72°C durante 45 s, y una etapa de extensión final de 10 min a 72°C usando los *primers* descritos por Quito-Avila et al (2015).

- Electroforesis y visualización de resultados

Los productos de PCR fueron cargados en un en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe® (Life Technologies) y sometidos a electroforesis (90V, 35 min). Se corrieron en paralelo marcadores con un peso molecular de 100 pb (GeneScript, USA) para verificar el tamaño

de las bandas amplificadas. La visualización se la hizo utilizando un transiluminador UV (Gel Doc XR+ System, BIO RAD).

2.1.3. Ensayos de transmisión mediante artrópodos

Para la identificación del artrópodo vector de PpVQ se realizó análisis de laboratorio y ensayos de inoculaciones controladas, usando artrópodos comúnmente asociados al cultivo de papaya en zonas con alta prevalencia del virus. Basado en los resultados de prospección, las plantas identificadas como positivas para PpVQ fueron marcadas como fuentes de inóculo viral en campo, desde las cuales se colectaron diferentes especies de artrópodos. Los artrópodos fueron conservados en etanol hasta su posterior análisis para determinar si son portadores del virus. Los ensayos de inoculación se realizaron con artrópodos en los cuales se detectó el virus. Un total de 10 plantas libres de PpVQ fueron empleadas para cada especie, usando 10 especímenes por planta, exceptuando el caso de mosca blanca que debido a su capacidad para volar, el número de especímenes por planta no pudo ser controlado. Todos los experimentos de transmisión con artrópodos fueron realizados dentro de una jaula de aluminio forrada con plástico transparente y malla antiáfido (Anexo B). El análisis de detección de virus en las plantas fue realizado a los 180 días de la exposición a los artrópodos.

2.1.4. Ensayos de transmisión mecánica

Para determinar si PpVQ es transmitido mecánicamente, se realizaron dos experimentos; el primero usando extractos de ARN (ver metodología de extracción en la sección 2.1.2.), reportado anteriormente para *Umbravirus* (Talianky et al. 2003) y el segundo con extractos producto de la maceración de hojas en solución fosfato (0.05 M, pH 7). Como fuente de inóculo, se utilizó una planta infectada con PpVQ y PRSV, la misma que fue mantenida bajo condiciones de invernadero. Cada ensayo fue realizado en cuatro plantas (Anexo C). Los extractos fueron inoculados sobre las tres hojas más jóvenes de las plantas receptoras, luego de haber sido sometidas a microheridas

con carborundum (material abrasivo) y estas fueron evaluadas a los 180 días después de la inoculación (ddi) (Alconero, 1973).

2.1.5. Ensayos de transmisión por semilla

A pesar de no ser muy comunes los virus transmitidos por semilla, dicha vía de transmisión es muy importante en la epidemiología del virus (Johansen et al. 1994). Por ello, para este ensayo se tomaron 2 frutos de cada una de tres plantas infectadas con PpVQ. De cada fruto se tomaron 50 semillas y las plántulas provenientes de estas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero (Anexo D) y evaluadas a los 180 días después de la siembra (dds).

2.2. Determinación del estatus de meleira y su asociación con PpVQ y PRSV

En esta sección se describen los métodos utilizados en este estudio para la detección oportuna de meleira en Ecuador.

2.2.1. Detección simultánea de PpVQ, PMeV y PRSV mediante RT-PCR

Para determinar la presencia de PMeV en plantas de papaya co-infectadas con PpVQ fue necesaria la implementación de un sistema de detección simultánea (RT-PCR dúplex) para los dos virus. Más aún, considerando la importancia y prevalencia de PRSV en nuestro país, se desarrolló un sistema que permitiera la detección simultánea (RT-PCR triplex) de PpVQ, PMeV y PRSV. Se evaluó la efectividad de varios sets de *primers* para cada virus tanto en forma individual como en multiplex, así como los parámetros óptimos para la PCR. Para la validación de los ensayos se utilizó controles positivos locales para el caso de PRSV – PpVQ (ARN total), mientras que los controles positivos para PMeV (ARN total) fueron amablemente donados por la Dra. Patricia Fernandes, directora del Núcleo de Biotecnología de la Universidad Federal de Espírito Santo, Vitória, Brasil.

2.2.2. Prospección de meleira y su posible asociación con PpVQ

La presencia de PMeV fue evaluada en un total de 30 plantas provenientes de fincas ubicadas en la provincia de Santo Domingo con síntomas similares a los reportados para meleira. Entre los síntomas se encontraban el escurrimiento de látex de consistencia acuosa sobre el fruto y el manchado aceitoso de los peciolo. Además, la presencia del virus (PMeV) fue analizada en plantas infectadas con PpVQ para determinar una posible asociación entre los virus. El análisis de detección de PMeV fue realizado a partir de ARN total extraído de hojas y de látex de frutos como describe Antunes et al (2016).

Adicionalmente, la prospección de meleira fue realizada mediante secuenciación de productos de RT-PCR generados con *primers* aleatorios (hexámeros) a partir de ARN de doble cadena (ARNdc) siguiendo las metodologías descritas por Morris & Dodds (1979) y Froussard (1992). El ARNdc fue extraído de plantas de papaya y de babaco (*Vasconcellea x heilbornii*, syn. *Carica pentagona*), una caricácea nativa de Ecuador que es cultivada en zonas con climas sub-tropicales de Santo Domingo, provincia que también se caracteriza por sembrar grandes extensiones de papaya.

Las secuencias fueron analizadas usando la versión 8.1.2 de Geneious® y herramientas bioinformáticas del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) como Blastx y Blastn.

Capítulo 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Prospección e identificación de la(s) forma(s) de transmisión de PpVQ

De la prospección se determinó que PpVQ estuvo presente en 10%, 25% y 30% de las muestras en las localidades de Guayas, Santo Domingo y Los Ríos, respectivamente. Mientras que PRSV estuvo presente en más del 80% de las muestras en cada una de las provincias. Estos resultados evidenciaron que la diseminación de PpVQ es considerablemente más lenta que la de PRSV. La diferencia en la prevalencia de PpVQ entre Guayas (10%) y Santo Domingo (25%) o Los Ríos (30%) pudo deberse a la presión de inóculo del virus, ya que el área de producción de papaya en las últimas dos provincias es mucho mayor. Es importante destacar que no se encontraron diferencias en la expresión de síntomas en plantas infectadas solo con PRSV frente a aquellas infectadas con PRSV + PpVQ.

Una vez conocidos los sitios (lotes de finca) en donde PpVQ fue más prevalente, se iniciaron los estudios de transmisión del virus, para lo cual se muestrearon (y marcaron) 27 plantas adicionales y se verificó la presencia de PpVQ en 22% de las muestras (Fig. 1). De dichas plantas, se colectaron las especies más comunes de artrópodos como mosca blanca, cochinillas y ácaros rojo, estos fueron identificados, por el laboratorio de Entomología de Agrocalidad (Av. Juan Tanca Marengo Km 1.5, Guayaquil), como *Bemisia tabaci* (mosca blanca), familia Pseudococcidae (cochinilla), *Polyphagotarsonemus latus* (ácaro blanco) y *Tetranychus urticae* (ácaro rojo).



Figura 1. Detección mediante RT-PCR (dúplex) de la presencia de Papaya virus Q (PpVQ) y Papaya ringspot virus (PRSV) en plantas de papaya. Gel de agarosa al 2%. Carriles 2, 20, 25, 26 y 27 muestran la banda esperada para ambos virus; el resto, exceptuando el 21, muestra solo la presencia de PRSV. El control positivo validó la detección. Las flechas indican el tamaño esperado para los productos amplificados: PpVQ (698 pb) y PRSV (263 pb). M: marcador de 100pb (GeneScript, USA).

3.1.1. Ensayos de transmisión mediante artrópodos

PpVQ fue detectado en muestras de artrópodos de todas las especies colectadas antes de ser transferidos a plantas libres del virus bajo condiciones de invernadero. Sin embargo, solo 3 de 10 plantas inoculadas con mosca blanca resultaron positivas para PpVQ a los 180 días después de la inoculación (Fig. 2). La detección fue repetida para verificar los resultados. Los productos amplificados de PCR fueron secuenciados (Macrogen Inc.) y la identidad de PpVQ fue confirmada (98% de identidad a nivel de nucleótidos con el aislado original disponible en la base de datos del NCBI número de accesión: KP165407). PpVQ no fue detectado en ninguna de las plantas inoculadas con ácaros o cochinillas hasta 180 días después de la inoculación.

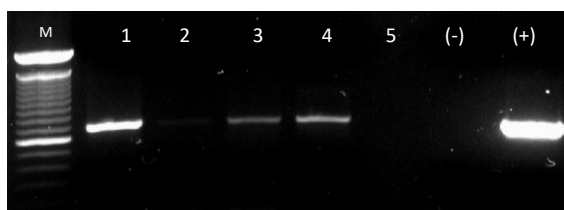


Figura 2. Detección de Papaya virus Q (PpVQ) en plantas inoculadas con mosca blanca. Gel de agarosa al 2%. Controles negativo (-) y positivo (+) fueron usados en los últimos carriles. Tamaño esperado del producto amplificado (698 pb) se observan en los carriles 1, 3 y 4. M: marcador de 100pb (GeneScript, USA)

3.1.2. Ensayo de transmisión mecánica

El análisis de detección fue realizado a los 180 días. PpVQ no fue detectado en ninguna de las plantas inoculadas ya sea con el macerado de hoja en buffer fosfato o con extractos de ARN de tejido foliar. Es importante destacar que las plantas usadas como fuente de inóculo de PpVQ, contenían también PRSV, el cual fue inoculado exitosamente al utilizar los macerados con buffer de fosfato.

Los resultados obtenidos de estos ensayos sugieren que la transmisión de PpVQ mediante mosca blanca es del tipo semipersistente,

requiriéndose periodos de inoculación de entre 12 h a 48 h (Whitfield et al. 2015).

3.1.3. Ensayo de transmisión por semilla

Concluidos los 180 dds se evaluaron muestras foliares de aquellas plántulas provenientes de semillas tomadas de frutos de plantas positivas para PpVQ, ninguna de las muestras resultó positiva para el virus. Estos resultados concuerdan con lo observado a nivel de campo, en donde la incidencia de PpVQ se incrementa en relación a la presión de inóculo y las altas poblaciones de mosca blanca. Para verificar estas observaciones, se realizó un experimento adicional en donde se utilizó 150 plantas obtenidas de semilla (previamente evaluadas negativas para PpVQ), como plantas “trampa” en un lote comercial de papaya con alta prevalencia tanto del virus como de mosca blanca. Dos de las 150 plantas resultaron positivas para PpVQ luego de 120 días de exposición al campo. Debido a complicaciones de clima y presencia de otros patógenos del suelo, las plantas “trampa” no pudieron ser evaluadas por un periodo más largo. Cabe mencionar que el porcentaje de plantas “trampa” que resultaron positivas para PRSV fue del 100%; este virus pudo ser detectado a partir de los 30 días de exposición al campo, soportando una vez más observaciones anteriores y datos de la prospección realizada en este estudio, que indican que la transmisión de PRSV ocurre de forma más rápida y consecuentemente es más prevalente que PpVQ.

3.2. Determinación del estatus de meleira y su asociación con PpVQ y PRSV

El ensayo de RT-PCR triplex fue desarrollado y validado exitosamente en un grupo de 10 muestras de ARN previamente identificadas como positivas para PpVQ y PRSV, en donde PMeV no fue detectado (Fig. 3).

Los *primers* recomendados y usados en este ensayo se encuentran en la Tabla 1. Los parámetros usados y recomendados para la PCR fueron 94°C durante 4 min, 40 ciclos de 94°C durante 45 s, 57°C durante 30 s, 72°C durante 45 s, y una etapa de extensión final de 10 min a 72°C usando los *primers* descritos por Quito-Avila et al (2015) y Antunes et al (2016).

Debido a que se desconoce la presencia de meleira en plantaciones de papaya en Ecuador, un total de 30 plantas de papaya con síntomas similares a los reportados para meleira fueron muestreados y sometidos a análisis mediante la metodología de RT-PCR triplex. Las muestras provinieron de plantaciones de 2 años de producción y resultaron negativas para la presencia de PMeV en análisis realizados tanto en hojas como en látex. PpVQ y PRSV fueron ocasionalmente detectados en dichas muestras sin una asociación consistente entre la presencia de estos virus (PpVQ y/o PRSV) y los síntomas similares a meleira observados.

Tabla 1. *Primers* de detección utilizados en el ensayo de RT-PCR triplex. El tamaño de los productos esperados (pares de bases) para cada set de *primers* se muestran en la columna de la derecha.

<i>Primer</i>	Secuencia	Tamaño (pb)
¹ PpVQ – F	5' CCTGTCTACTCTTGTTTGGCTCG 3'	698
¹ PpVQ – R	5' GCTAGACCACATTGCCCAATAGC 3'	
¹ PRSV Ec – F	5' GAGARGTAYATGCCGCGGTATGG 3'	263
¹ PRSV Ec - R	5' CGCATACCCAGGAGAGAGTGC 3'	
² PMeV A11 F	5' CTTGGTTAGGCATAACTGTAGGT 3'	394
² PMeV A11 R	5' CACGGACTCTTAGAAACGTCTATC 3'	

¹ Quito-Avila et al. (2015), ² Antunes et al. (2016)

Así mismo, resultados de las prospecciones mostraron que aproximadamente 8% de plantas asintomáticas resultaron positivas solo para PpVQ. Estos resultados rechazan la hipótesis de que PRSV tenga un rol en la encapsidación y posterior transmisión del genoma de PpVQ. En cuanto a

la detección fallida de PMeV, no se puede descartar la existencia de un aislado Ecuatoriano de PMeV, el cual escape la detección debido a variabilidad en los sitios de anillamiento de los *primers* usados. Cabe notar que los sitios para los *primers* reportados por Abreu et al. (2007) son altamente variables, por lo cual la detección de los dos aislados Brasileños secuenciados posteriormente han sido inefectivos usando dichos *primers* (Abreu et al. 2015; Antunes et al. 2016).

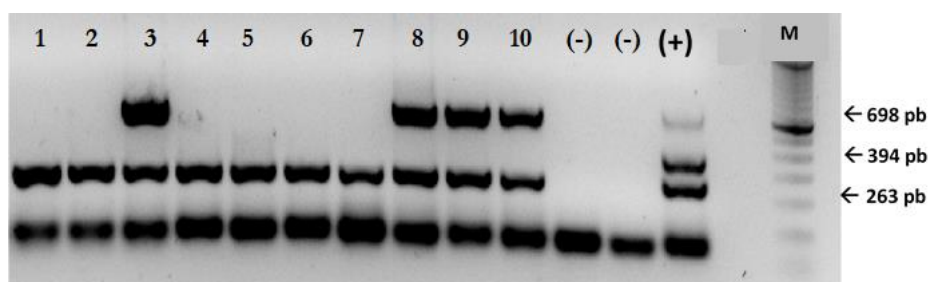


Figura 3. Productos de amplificación de PCR para la detección de Papaya virus Q (PpVQ), Papaya ringspot virus (PRSV) y Papaya meleira virus (PMeV). Agarosa al 2%. Carriles 3, 8, 9 y 10 muestran la banda esperada para PpVQ y PRSV, el resto de carriles sólo para PRSV. Controles negativo (-) y positivo (+) donde además de las bandas de PpVQ (698 pb) y PRSV (263 pb) aparece la banda esperada para PMeV (394 pb). Marcador de 100pb (M) (GeneScript, USA) se muestran en últimos carriles.

3.2.1. Detección de meleira en plantas de babaco (*Vasconcellea x heilbornii* syn. *Carica pentagona*)

Los análisis de las secuencias obtenidas a partir de librerías de ARNdc de plantas de babaco revelaron la presencia de dos virus con homología a PMeV y PpVQ, denominados provisionalmente PMeV-like-babaco (PMeV-like-Bb) y PpVQ-like-babaco (PpVQ-like-Bb), respectivamente. Los porcentajes de identidad observados entre la secuencia parcial del gen de la polimerasa de PMeV-like-Bb y sus homólogos de Brasil (PMeV aislado de Baraúnas, PMeV-Bz-NR y aislado de Espiritu Santo, PMeV-Bz-ES) se muestran en la Figura 4.

	PMeV-Bz-NR	PMeV-Bz-ES
PMeV-Bz-NR		74%
PMeV-Bz-ES	74%	
PMeV-like-Bb	63.2%	62.6%

Figura 4. Comparación, a nivel de nucleótidos, de la secuencia parcial del gen de la polimerasa de Papaya meleira virus (PMeV). Porcentajes de identidad entre la secuencia homóloga a PMeV obtenida de babaco (PMeV-like-Bb) y las pertenecientes a los dos aislados brasileños (PMeV-Bz-NR y PMeV-Bz-ES) disponibles en bases de datos públicas.

Como se puede observar, las identidades existentes entre PMeV-like-Bb y los dos aislados brasileños, no superan el 63%. Al tratarse de un grupo de virus sin una asignación taxonómica formal, no se cuenta con un criterio mínimo (en base a identidad de secuencias) para el delineamiento ya sea de nuevas especies o aislados del mismo virus. Considerando que entre los dos aislados brasileños— obtenidos de dos zonas geográficas distintas— la identidad es de apenas 74%, la posibilidad de que las secuencias obtenidas de plantas de babaco pertenezcan al mismo virus no se descarta por el momento.

Para PpVQ-like-Bb y sus homólogos, se realizó un alineamiento múltiple con miembros del género *Umbravirus* y *Tombusviridae*. El posterior análisis filogenético usando el método Neighbour-Joining incluido en Geneous® 8.1.2 evidenció la existencia de un clado conformado por PpVQ (aislados de papaya y babaco) y aquellos asociados con meleira en México (PMeV-Mx) y Brasil (PMeV-2); además de un virus, provisionalmente denominado Citrus yellow vein associated virus, detectado en plantas de cítricos en California (Fig. 5). Estos resultados sugieren que PpVQ y especies más cercanas podrían constituirse en un grupo distinto al de los *Umbravirus*, a pesar de compartir un ancestro común más reciente.

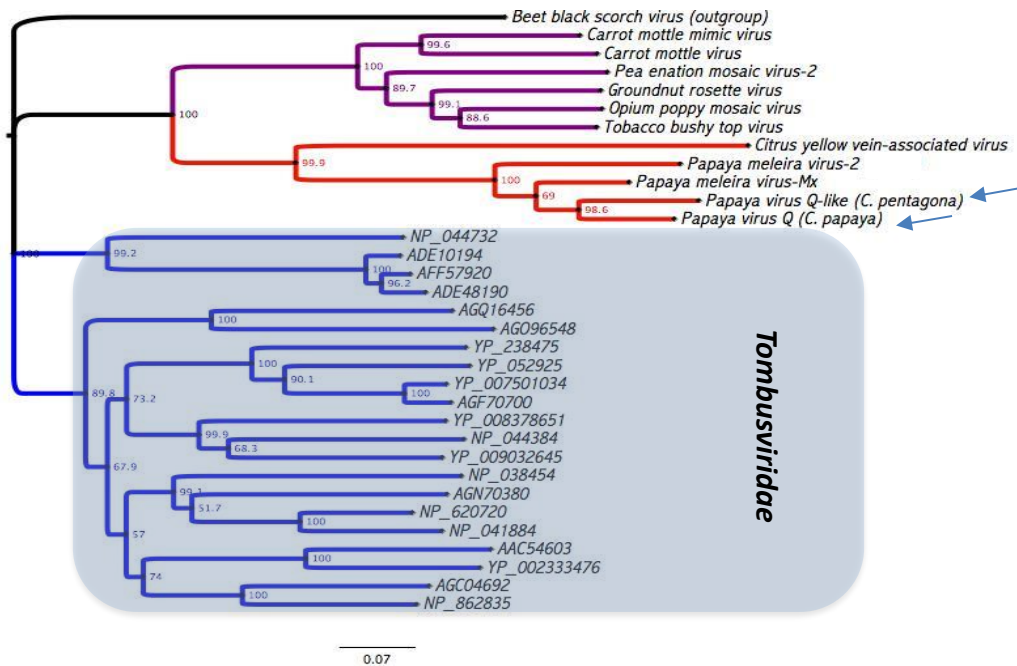


Figura 5. Relaciones filogenéticas entre Papaya virus Q (PpVQ), umbravirus-like virus asociados con meleira y miembros establecidos del género *Umbravirus* y *Tombusviridae*. Clado en rojo denota el grupo formado por PpVQ (*C. papaya*), PpVQ (*C. pentagona*) y aquellos asociados con meleira en Brasil y México. Clado en púrpura muestra miembros establecidos del género *Umbravirus*. Miembros de la familia *Tombusviridae* se muestran en el clado sombreado. Los valores de *bootstrap* que soportan la topología del árbol se encuentran en cada uno de los nodos.

Es importante notar que los *primers* utilizados para la detección de los aislados brasileños de PMeV no lograron amplificar el producto esperado en plantas de babaco, sugiriendo una alta variabilidad genética en las regiones correspondientes a los *primers* como se ha mencionado anteriormente. De la misma forma, *primers* diseñados en base a la secuencia obtenida en plantas de babaco, no amplificaron el producto esperado en plantas de papaya infectadas con PpVQ. Al momento, sin embargo, no se puede descartar la presencia de un aislado “elusivo” de PMeV en plantas de papaya en nuestro país. Estudios complementarios destinados a obtener más pruebas que rechacen la hipótesis de la presencia de PMeV en papaya en Ecuador necesitan ser implementadas en proyectos futuros. La aparente ausencia de un gen que codifique la proteína de la cápsida en PpVQ, soportado por resultados obtenidos por Sa Antunes et al. (2016), deja abierta la posibilidad de que PMeV se

encuentre en co-infecciones con PpVQ en plantas de papaya en Ecuador. Una posible asociación entre PpVQ y PRSV como su virus “asistente” (que provea de la cápside) no pudo ser verificada debido a la existencia de plantas infectadas con PpVQ en las que no se detectó la presencia de PRSV.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La transmisión es uno de los aspectos más importantes dentro de la epidemiología de las enfermedades virales en plantas de cultivo. Durante este estudio, se realizaron diferentes ensayos para determinar el modo de transmisión de PpVQ. Los resultados obtenidos de cada uno de estos ensayos demostraron que el virus no se transmite en forma mecánica o por semilla. Sin embargo, se observó que 3 de 10 plantas expuestas a mosca blanca (*Bemisia tabaci*), previamente capturadas de plantas infectadas con PpVQ, resultaron positivas para el virus. No se encontró resultado similar en ensayos realizados con cochinillas y ácaro rojo, a pesar de que el virus pudo ser detectado en dichos especímenes, demostrando así que un artrópodo portador no necesariamente puede transmitir el virus. La existencia de procesos moleculares con alta especificidad entre el virus y su artrópodo vector ha sido demostrado en varios estudios. Los resultados de transmisión con mosca blanca concuerdan con lo que se observa a nivel de campo, ya que este artrópodo es muy común en el cultivo de papaya y su habilidad de volar lo convierte en un vector eficaz, potencializando la diseminación del virus por toda la plantación y a plantaciones vecinas. Sin embargo, detalles adicionales sobre el mecanismo de transmisión, como por ejemplo el tiempo de adquisición e inoculación necesarios para que el artrópodo pueda transmitir el virus aún son desconocidos.

En este estudio se evaluó también la posible asociación de PpVQ con la enfermedad de meleira, esto debido a hallazgos recientes en donde se reporta el virus PMeV-2 — genéticamente cercano a PpVQ— como un componente clave del complejo viral responsable de la enfermedad de meleira en Brasil. Análisis realizados en muestras provenientes de plantas con síntomas similares a meleira (frutos con leves exudaciones espontáneas de látex) resultaron negativos para la presencia de PpVQ y también para PMeV. Basado en estos resultados, no se pudo verificar la presencia de la enfermedad en Ecuador, así como su relación directa con PpVQ. Sin embargo, se recomienda continuar con un sistema de monitoreo y vigilancia tanto visual como de laboratorio para evitar la diseminación masiva de la enfermedad, en caso de que apareciera. El sistema de detección simultánea para los tres virus PpVQ, PMeV y

PRSV, desarrollado en este estudio, fue validado de forma exitosa y debería ser utilizado en diagnóstico rutinario de virus en papaya.

Es importante resaltar que los *primers* moleculares para la detección de PMeV han sido diseñados basado en las dos únicas secuencias genómicas del virus hasta ahora disponibles en la base de datos del NCBI. Por lo tanto, la posibilidad de la existencia de un aislado de PMeV genéticamente diverso al brasileño, que escape a la detección mediante RT-PCR, queda abierta y deberá ser considerada a la hora de realizar los monitoreos; más aún cuando dos virus homólogos (con altos porcentajes de identidad a nivel de nucleótidos) a PpVQ y PMeV, respectivamente, fueron encontrados en plantas de babaco, una especie relacionada a papaya. A pesar de que no se observaron síntomas de meleira en babaco, la presencia de los dos virus concuerda con los hallazgos reportados en Brasil, en donde se ha demostrado su directo involucramiento con la enfermedad de meleira.

Finalmente, la presencia de PpVQ en plantas libres de PRSV demuestra una independencia entre estos dos virus al momento de la transmisión, lo cual concuerda con el tipo de vector para cada virus, siendo áfidos para PRSV y mosca blanca para PpVQ. Plantas infectadas con PpVQ no mostraron síntomas a nivel foliar durante el tiempo que fueron mantenidas en el invernadero. Adicionalmente, no se observó diferencias en la expresión de síntomas entre plantas infectadas únicamente con PRSV y aquellas infectadas con PRSV y PpVQ.

BIBLIOGRAFÍA

Abreu, P., Antunes, T.F., Magaña-Álvarez, A., Pérez-Brito, D., Tapia-Tussell, R., Ventura, J.A., et al. (2015). A Current Overview of the Papaya meleira virus, an Unusual Plant Virus. *Viruses*. 7:1853–70.

Abreu, E.F., Daltro, C.B., Nogueira, E.O., Andrade, E.C., Aragao, F.J. (2015). Sequence and genome organization of Papaya meleira virus infecting papaya in Brazil. *Archives of Virology*. 160:3143–7.

Alconero, R. (1973). Mechanical transmission of viruses from sweet potato. *Phyt* 63, 377-380.

Araújo, M.M.M., Tavares, É.T., Silva, F.R., Marinho, V.L. dA, Júnior MTS. (2007). Molecular detection of Papaya meleira virus in the latex of *Carica papaya* by RT-PCR. *Journal of virological methods*. 146:305–10.

Froussard, P. (1992). A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. *Nucleic Acids Research*, 20, 2900.

Gonsalves D. (1994). Papaya ringspot virus. See Ref. 39a, pp. 67–68.

Halgren, I.E. Tzanetakis, R.R. Martin (2007). Identification, characterization, and detection of Black raspberry necrosis virus. *Phytopathology*, 97: 44–50.

Jensen, D.D. (1949). Papaya virus diseases with special reference to papaya ring-spot. *Phytopathology* 39, 191-211.

Johansen, E., Edwards, M., Hampton, R. (1994). Seed transmission of viruses: current perspectives. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:363-386.

Kitajima, E.W., Rodrigues, C.H., Silveira, J.S., Alves, F., Ventura, J.A., Aragao, F.J.L., et al. (1993). Association of isometric viruslike particles, restricted to laticifers, with "meleira" ("Sticky disease") of papaya (*Carica papaya*). *Fitopatologia Brasileira*, 18:118–22.

Martins, D. dos S., Ventura, J. A., Paula, R. de C. A. L., Fornazier, M. J., Rezende, J. A. M., Culik, M. P., ... Sousa-Silva, C. R. (2016). Aphid vectors of Papaya ringspot virus and their weed hosts in orchards in the major papaya producing

and exporting region of Brazil. *Crop Protection*, 90, 191–196.

Morris, T. J., & Dodds, J. A. (1979). Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, 69, 854–858.

Perez-Brito, D., Tapia-Tussell, R., Cortes-Velazquez, A., Quijano-Ramayo, A., Nexticapan-Garcez, A., Martín-Mex, R. (2012). First report of Papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. *African Journal of Biotechnology*. 11:13564–70.

Peña, I. (2008). Enfermedades virales en el cultivo de papaya (*Carica papaya*) Revista CitriFrut. 2 5:13-23.

ProEcuador (2015). https://www.proecuador.gob.ec/wpcontent/uploads/2015/07/PROEC_AS2015_PAPAYA1.pdf

Purcifull, D., Edwardson, J., Hiebert, E., Gonsalves, D. (1984). Papaya ringspot virus. CMI/AAB Descr. Plant Viruses, No. 292. (No. 84 Revis., July 1984) 8 pp.

Quito-Avila, D.F., Alvarez, R.A., Ibarra, M.A., and Martin, R.R. (2015). Detection and partial genome sequence of a new umbra-like virus of papaya discovered in Ecuador. *Eur. J. Plant Pathology*. 143: 199-204.

Rodrigues, C.H., Ventura, J.A., Maffia, L.A. (1989). Distribuição e transmissão da meleira em pomares de mamão no Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, 14:118.

Sá Antunes, T.F., Amaral, R.J.V., Ventura, J.A., Godinho, M.T., Amaral, J.G., Souza, F.O. et al. (2016). The dsRNA Virus Papaya Meleira Virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease. PLoS ONE 11(5): e0155240. doi:10.1371/journal.pone.0155240.

Sint, D., Raso, L., Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods Ecol. Evol.* 3(5): 898–905.

Shukla DD, Ward CW, Brunt AA. (1994). The Potyviridae. Wallingford, UK: CAB Int. 516 pp.

Tripathi, S, Suzuki J, Gonsalves D. (2006). Development of genetically engineered resistant papaya for Papaya ringspot virus in a timely manner – a comprehensive and successful approach. In: Ronald P (Ed) *Plant-pathogen Interactions: Methods and Protocols*, The Humana Press, Inc., Totowa, New Jersey, pp 187-239.

Whitfield, A.E.; Falk, B.W.; Rotenberg, D. (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*, 479, 278–289.

Zamudio-Moreno E, Ramírez-Prado J, Moreno-Valenzuela O, López-Ochoa L. (2015). Early diagnosis of a Mexican variant of Papaya meaira virus (PMeV-Mx) by RT-PCR. *Genetics and Molecular Research*. 14:1145–54.

ANEXOS

ANEXO A: Toma de muestras en plantaciones ubicadas en la provincia de Los Ríos.



ANEXO B: Jaula con malla antiáfidos para ensayos de transmisión.



ANEXO C: Plantas inoculadas mecánicamente.



ANEXO D: Ensayo de transmisión por semilla.

