

# Diseño de tres pares de oligonucleótidos específicos para la detección del virus de la mancha anular de la papaya (PRSV)

Cruz, J.K.<sup>1</sup>; Ochoa, J.<sup>2</sup>; Ortega, V.<sup>3</sup>; Ruiz, F.G.<sup>4</sup>

## RESUMEN

Por un lado, en México, el estado de Oaxaca ha ocupado en años consecutivos los primeros lugares a nivel nacional en la producción de papaya (*Carica papaya* L.). Por otro lado, las plantaciones son altamente susceptibles al ataque de tipo viral, uno de los más devastadores es la papaya ringspot virus (PRSV). Debido a lo anterior se diseñaron tres oligonucleótidos específicos que permiten la identificación del PRSV mediante la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a una transcriptasa reversa (RT-PCR). Los oligonucleótidos fueron diseñados por el software Vector NTI Advance® V11.5 que amplificaron tres fragmentos de 857 pares de bases (pb), 583 pb y 213 pb de regiones conservadas del genoma viral. Para comprobar el desempeño de los oligonucleótidos se realizaron extracciones de ácido ribonucleico (ARN) de tejido foliar de papaya con signos del PRSV utilizando TRIzol™ y el Kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System para la técnica de RT-PCR. Los resultados de la amplificación fueron analizados en un gel de agarosa donde los amplicones coincidieron con el tamaño esperado al diseño preliminar.

**Palabras clave:** PRSV, amplificación, ARN, cápside, HC-Pro, papaya, RT-PCR.

## ABSTRACT

*In Mexico, the state of Oaxaca has occupied the first places in the national level in the production of papaya (*Carica papaya* L.) in consecutive years. On the other hand, plantations are highly susceptible to viral attack, one of the most devastating is the papaya ringspot virus (PRSV). For that reason, three specific oligonucleotides were designed that allow the identification of the PRSV using the reverse transcriptase coupled polymerase chain reaction (RT-PCR). The oligonucleotides were designed by Vector NTI Advance® V11.5 software that amplified three fragments of 857 base pairs (bp), 583 bp and 213 bp from conserved regions of the viral genome. To check the performance of the oligonucleotides, ribonucleic acid (RNA) extractions of papaya leaf tissue with symptoms of PRSV were performed using TRIzol™, then the SuperScript™ III One-Step RT-PCR System Kit was used to perform the RT-PCR technique. The results of the amplification were analyzed on an agarose gel where the amplicons coincided with the size expected at their preliminary design.*

**Keywords:** amplification, RNA, capsid, HC-Pro, papaya, RT-PCR.

<sup>1</sup>Universidad del Mar (UMAR), Representante del Cuerpo Académico: Tecnologías Agropecuarias y Forestales en el Trópico (UMAR-CA-35), Carretera vía Sola de Vega km 1.5, 71980, Puerto Escondido, Oaxaca, México.

<sup>2</sup>Universidad del Mar (UMAR), Colaborador del Cuerpo Académico: Tecnologías Agropecuarias y Forestales en el Trópico (UMAR-CA-35), Carretera vía Sola de Vega km 1.5, 71980, Puerto Escondido, Oaxaca, México.

<sup>3</sup>Universidad del Mar (UMAR), Colaborador del Cuerpo Académico: Tecnologías Agropecuarias y Forestales en el Trópico (UMAR-CA-35), Carretera vía Sola de Vega km 1.5, 71980, Puerto Escondido, Oaxaca, México.

<sup>4</sup>Universidad del Mar (UMAR), Colaborador del Cuerpo Académico: Tecnologías Agropecuarias y Forestales en el Trópico (UMAR-CA-35), Carretera vía Sola de Vega km 1.5, 71980, Puerto Escondido, Oaxaca, México, Correo electrónico: ruiz\_ruiz\_francisco@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

En México, Oaxaca se destaca como uno de los principales estados productores de papaya (*Carica papaya* L.) con un promedio anual de 70.247 t, Veracruz con 65.483 t y Chiapas con 30.357 t (SIAP, 2019). Actualmente, se han identificado varios tipos de virus que afectan severamente el rendimiento del cultivo, entre los que destacan; papaya ringspot virus (PRSV) (Cabrera *et al.*, 2010; Azad *et al.*, 2014; Tapia *et al.*, 2015), papaya maleira virus (PMeV) (Abreu *et al.*, 2012; Perez *et al.*, 2012), Zucchini yellow meileira virus (ZYMV) (Kwon *et al.*, 2005) y papaya leaf curl virus PaLCV (Chang *et al.*, 2003).

El virus de la mancha anular pertenece a la familia de Potyviridae y al género *Potyvirus*; es transmitido por varias especies de áfidos (Kalleshwaraswamy *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2010). El PRSV está compuesto de partículas filamentosas que contienen un genoma de ARN monocatenario (Maia *et al.*, 1996). El genoma viral consiste de una secuencia promedio de 10.326 nucleótidos (nt) (Mishra y Patil, 2018) envuelto en una cápsida de origen proteico (Tripathi *et al.*, 2008).

El genoma del PRSV codifica para una poliproteína de 3344 aminoácidos (Yeh *et al.*, 1992; Azad *et al.*, 2014), y de acuerdo a la figura 1, en donde se muestra el mapa propuesto de las secuencias de proteínas y sus tamaños moleculares: proteína NT (63 kDa), HC-Pro (52 kDa), P (46 kDa), CI (72 kDa), 6 kDa, NIa (48 kDa), NIb (59 kDa), CP (35 kDa).

La proteína de componente auxiliar (HC-Pro) es una proteína multifuncional relacionada con las interacciones planta-virus; implicada con el movimiento, replicación y la supresión del silenciamiento génico postranscripcional (Yap *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010), afectando a las rutas relacionadas con la expresión de los microARN, perjudicando de esta manera al desarrollo de la planta infectada (Wu *et al.*, 2010; Azad *et al.*, 2014).

La proteína de la cápsida está involucrada en la encapsulación y protección del ARN viral (Azad *et al.*, 2014). La secuencia del gen que codifica para la proteína de la cápsida del PRSV es una de las mayormente caracterizadas en el género de los potyvirus (Cabrera *et al.*, 2010). Tanto la proteína de la cápsida y el componente auxiliar HC-Pro son necesarios para la transmisión vectorial del PRSV (Adams *et al.*, 2005).

Para implementar de manera oportuna métodos de control del PRSV es necesario su correcta identificación. Por lo general los productores de papaya emplean personal para identificar a las plantas infectadas por el PRSV a simple vista, normalmente

se realiza de manera rápida, pero no es muy confiable ya que los síntomas pueden confundirse con otros factores no virales (Azad *et al.*, 2014). Existe otro método más confiable, pero requiere de equipo especializado como es la técnica de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Cruz *et al.*, 2009; Kelaniyan-goda y Madhubashini, 2010; Esquivel *et al.*, 2019).

Además, se han desarrollado otras técnicas que implican la identificación de regiones específicas del genoma viral, como la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a una transcriptasa reversa (RT-PCR) (Ruiz y Silva, 1997; Guzmán *et al.*, 2018; Hamim *et al.*, 2018; Sultana *et al.*, 2019).

Recordando que el estado de Oaxaca se ha posicionado como uno de los principales productores de papaya a nivel nacional es determinante que se diseñen oligonucleótidos específicos para la detección de manera oportuna el PRSV en cultivos de papaya de la costa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de material vegetal

La colecta de tejido vegetal se realizó en el año 2019 en la localidad de San José Río Verde, municipio de Santiago Jamiltepec y consistió en seleccionar plantas con síntomas característicos de la enfermedad causados por el agente viral. A las plantas seleccionadas se les extrajo una hoja de la zona apical. Cada hoja fue inmediatamente colocada en papel filtro, el que fue posteriormente colocado en una bolsa Ziplock® con 200 gramos de sílica gel (Camen®) en su interior, esto con la finalidad de deshidratar el material vegetal y prevenir la degradación de los ácidos nucleicos. Por último, las bolsas fueron colocadas en el interior de una hielera con una cama de hielo de 10 centímetros de grosor. Una vez en el laboratorio, las bolsas que contenían el tejido vegetal fueron colocados a una temperatura de 6 °C durante 2 días, tiempo suficiente para que el tejido vegetal se deshidratara completamente, al tercer día las muestras fueron almacenadas a -80 °C en un ultracongelador (8800 Thermo Fisher Scientific).

### Diseño de oligonucleótidos

Con el uso de la base de datos (GenBank, 2018) se procedió a buscar secuencias en formato FASTA relacionadas con el genoma completo del virus de la mancha anular de la papaya.

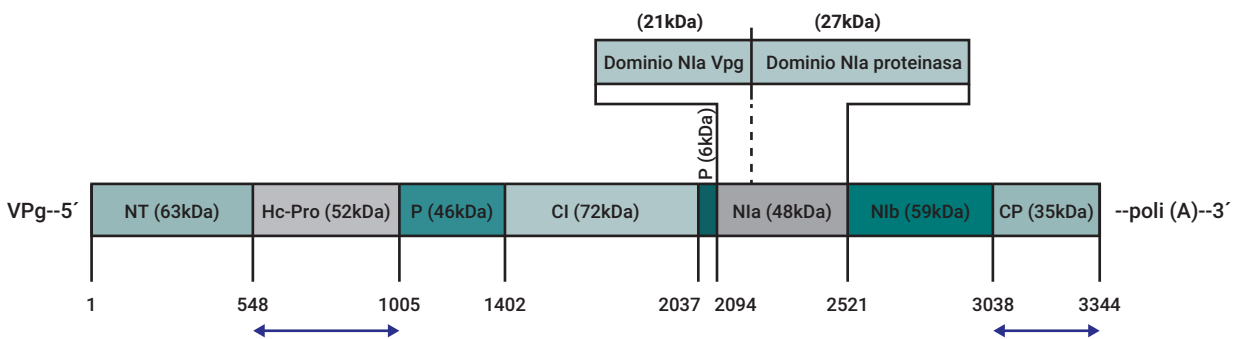


Figura 1. Mapa propuesto de la poliproteína del PRSV. Está conformado de un total de 3344 aminoácidos, los cuales están flanqueados por una proteína viral (VPg) y una cola de Poli (A). Las flechas en rojo indican las regiones conservadas empleadas en el presente trabajo. Fuente: Adaptada de Yeh *et al.* (1992).

Con base al manual de usuario del programa Vector NTI Advance® (Invitrogen 2008), se siguieron las instrucciones para realizar el alineamiento de las secuencias obtenidas. Posteriormente se determinaron las regiones altamente conservadas que fueron las regiones blanco en el diseño de los tres oligonucleótidos.

El diseño de los oligonucleótidos se enfocó en las regiones conservadas; se implementó el uso de la herramienta "Primer Design" del software Vector NTI Advance® siguiendo las instrucciones del manual de usuario (Invitrogen 2008).

Para predecir el desempeño de los tres oligonucleótidos se realizó un análisis *in silico* con Primer Select (2006). Habiendo comprobado su desempeño *in silico*, se solicitó la síntesis de los tres oligonucleótidos a la empresa T4oligo por el método de purificación desalado.

### Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ARN se realizó con el uso de TRIzol™ y se siguieron las indicaciones del fabricante (Invitrogen, 2018). Para realizar la extracción, se colocó aproximadamente 100 mg de tejido vegetal deshidratado con sílica gel en un tubo eppendorff. El ARN extraído fue analizado, almacenado a -80 °C en ultracongelador (8800 Thermo Fisher Scientific) y posteriormente amplificado por la técnica RT-PCR.

### Visualización del ARN

Para verificar la calidad del ARN se realizó una electroforesis horizontal en un gel de agarosa (Invitrogen™) al 1,2% (p/v) cargando en el gel 2 µL del producto de la extracción y 1 µL de solución de carga 6X en una cámara de electroforesis (Bio-Rad modelo: Mini-Sub®Cell GT) con solución de corrida TAE 1X (40 mM Tris-HCl (JT Baker), 20 mM ácido acético (Meyer®), 1 mM EDTA pH 8,0 (JT Baker) usando una fuente de poder (Bio-Rad modelo: POWER PAC™ HC) por 45 minutos a 80 volts, 0,09 Amperes y 7 watts. Posteriormente, el gel se tiñó con SYBR Green (Invitrogen), se visualizó en un transiluminador (FOTO/UV®21, Fotodyne), se documentó con una cámara fotográfica (PowerShot G9, Canon), y adicionalmente fue cuantificado en un espectrofotómetro (Genesys 10S VIS, Thermo Fisher Scientific).

### Reacción de RT-PCR

Los oligonucleótidos diseñados fueron usados en conjunto

con el Kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System con Platinum™Taq polimerasa (Invitrogen™) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Este sistema es sumamente rápido; en el mismo tubo se realizan dos reacciones, (1) síntesis del ADN complementario (ADNc) y (2) la obtención de los amplicones por la Taq ADN polimerasa Platinum™.

Para la amplificación, la mezcla de reacción se realizó en tubos para PCR de 200 µL a un volumen final de 50 µL. Para realizar la reacción se usó un termociclador (PTC-100®, Bio-Rad). Las concentraciones finales de los reactivos se muestran en la tabla 1.

El programa del termociclador consistió de dos etapas; la primera fue para realizar la síntesis de ADNc a una temperatura de 55 °C por 30 min. Inmediatamente al término de ese tiempo se incrementó la temperatura a 95 °C por 2 min (predesnaturalización). Al haber finalizado la primera etapa, comenzó el proceso de amplificación con una desnaturalización a 95 °C por 15 segundos (s) seguido de 40 ciclos de 30 s a 58 °C para alineamiento y 60 s a 68 °C de extensión, finalmente una extensión de 5 min a 68 °C.

### Análisis de los amplicones

Para verificar los resultados de la técnica RT-PCR se realizó nuevamente una electroforesis horizontal en un gel de agarosa (Invitrogen) al 1,4% (p/v), cargando 5 µL del producto de la amplificación y 1 µL de solución de carga 6X. Finalmente, el gel se capturó fotográficamente para el análisis de los productos de amplificación.

## RESULTADOS

### Colecta de tejido vegetal

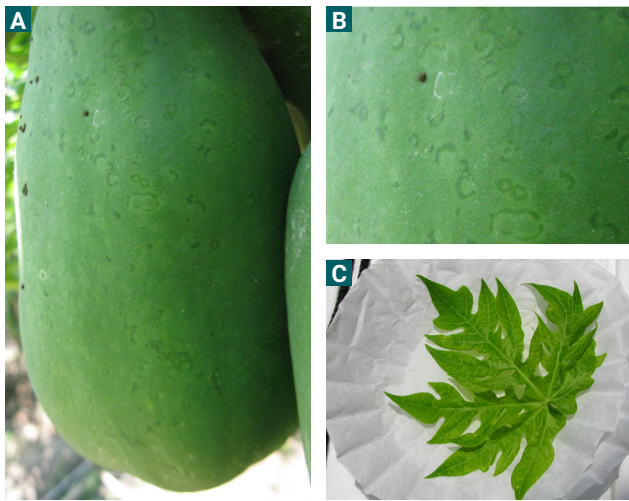
En Boquilla, localidad de San José Río Verde, municipio de Santiago Jamiltepec, (16° 08' 28,6" N y 97° 45' 38,7" O) se detectó por inspección visual plantas de papaya con síntomas del PRSV, los frutos mostraron las típicas marcas en forma de anillos y las hojas presentaron deformaciones relacionadas con clorosis y moteado. Se colectaron hojas jóvenes provenientes de quince plantas con síntomas virales.

### Secuencias analizadas

Se obtuvieron 27 secuencias de PRSV de la base de datos (GenBank, 2018) con los siguientes números de acceso:

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Total µL
2x Mezcla de reacción	2x	1x	25
Oligonucleótido-F	5 µM	0,4 µM	4
Oligonucleótido-R	5 µM	0,4 µM	4
TaqMix	200 µl	-	2
ARN	50 µg	1 µg	1
Agua			14
Total			50

Tabla 1. Reactivos para la reacción de RT-PCR. La tabla muestra las concentraciones iniciales, finales y el volumen para usar por cada reacción. Elaborada para la presente edición.

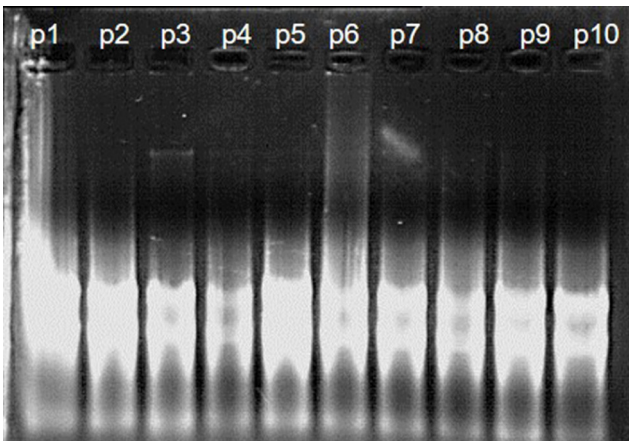


**Figura 2.** Plantas seleccionadas para realizar la colecta de tejido. (A) Fruto de papaya con los síntomas característicos del PRSV. (B) Acercamiento de la región con los anillos propiciados por el PRSV. (C) Hoja extraída que fue colocada en papel filtro para posteriormente ser deshidratada y procesada. Elaborada para la presente edición.

AB369277, AY010722, DQ340769, DQ340770, DQ340771, DQ374152, DQ374153, EF017707, EF183499, EU126128, EU475877, EU882728, HQ424465, JX448369, JX448370, JX448371, JX448372, JX448373, KC345609, KF734962, KF791028, NC001785, X67673 y X97251.

**Diseño y verificación de los oligonucleótidos**

Para conocer las regiones conservadas se sometieron las 27 secuencias de PRSV obtenidas de GenBank a un proceso de alineamiento por Clustalw. Se seleccionaron dos regiones del genoma viral que codifican para la proteína Helper component (HC-pro) y la proteína de la cápsida (CP). Para el caso de la región HC-Pro que comprende de 1727 nt a 3097 nt se obtuvo una pareja de oligonucleótidos que se etiquetaron como (HP857F y HP857R), por el tamaño del fragmento de 857 pb que se espera que amplifique del genoma viral. Los oligonucleótidos restantes se diseñaron en la región que codifica para la proteína de la cápsida. Estos se denominaron CP583F-CP583R y CP213F-CP213R porque amplifican fragmentos de 583 pb y 213 pb, respectivamente. En la tabla 2 se resumen los productos de amplificación de los iniciadores específicos diseñados en conjunto con parámetros como temperatura de fusión ( $T_m$ ) y porcentaje de contenido de guanina:citosina (%GC) de cada oligonucleótido. Con el desarrollo de los análisis *in silico*, con el programa Primer Select se confirmó que las parejas de los iniciadores amplificaron los fragmentos de acuerdo a su diseño y no amplifican en ninguna otra región de la secuencia analizada en GenBank.



**Figura 3.** Análisis de la extracción del ARN. Visualización de ARN de diez plantas (p1 a p10) a partir de hojas de papaya previamente deshidratadas con silica gel que presentaron síntomas visibles del agente viral, con el uso de TRizol™. La integridad del ARN fue comprobada cargando 2 µL de cada muestra en un gel de agarosa al 1,2% (p/v). Elaborada para la presente edición.

**Extracción de ARN**

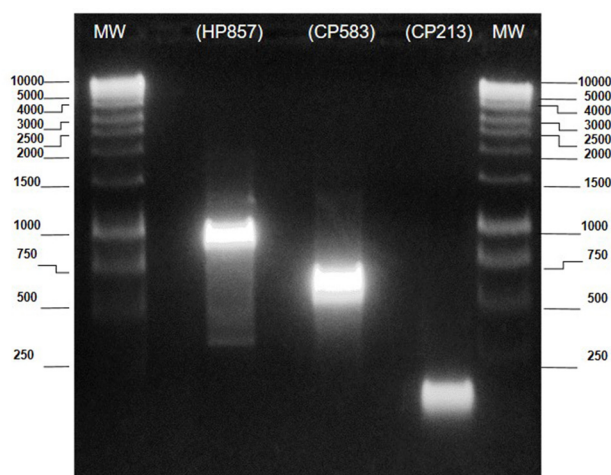
Se procesó el tejido deshidratado en silica gel de hojas de papaya para la obtención del ácido nucleico. El ARN obtenido de diez muestras procesadas con TRizol y posteriormente purificado presentó una pureza, según la relación de absorbancia  $\lambda_{260/280}$  de entre 1,875 y 2,191 siendo esta la calidad seleccionada para el desarrollo de la técnica RT-PCR. En cinco de las hojas restantes no se logró extraer suficiente calidad y cantidad de ARN, por tanto, se procesaron únicamente 10 muestras para los análisis subsecuentes.

**Análisis RT-PCR**

El ARN en conjunto con los oligonucleótidos (HP857F-R, CP583F-R y CP213F-R) y la reacción de RT-PCR amplificaron

Oligo	Secuencia (5' 3')	Tamaño pb	Gen blanco	Localización (nt)	Tm (°C)	GC (%)
HP857F	TTGTGAGCTTGAACGTTTAC	857	HC-Pro	1948-1967	45.4	40
HP857R	CCTCATTTTCAGGTATGTTT			2785-2804	43.5	35
CP583F	ATCCGCAACAATTGACATT	583	CP	9540-9559	49.6	35
CP583R	ATTTAGTTGCGCATACCCAG			10103-10122	49.7	45
CP213F	TGAGGTGAATTCGAAAACAC	213	CP	9928-9947	47.4	40
CP213R	AAACACACAAGCGCAGGTAT			10121-10140	49.9	45

**Tabla 2.** Secuencias de los oligonucleótidos diseñados. Las secuencias fueron obtenidas por el software Vector NTI Advance®, indicando el tamaño del fragmento amplificado, la región de interés del genoma viral, temperatura de fusión ( $T_m$ ) y contenido de Guanina:Citosina (%GC). Elaborada para la presente edición.



**Figura 4.** Obtención de los amplicones por RT-PCR. De izquierda a derecha; el primer carril, se visualiza el marcador de peso molecular Promega de 1 kb (MW); en el segundo, el producto de la reacción derivado de la pareja de iniciadores (HP857F-R); el tercer carril, el amplicón proveniente de los iniciadores (CP583F-R); el cuarto carril la amplificación producida por los oligos (CP213F-R), el último carril, el mismo marcador de peso molecular. Elaborada para la presente edición.

tres señales que se correspondieron con los análisis previos realizados *in silico* generando los fragmentos de 857 pb, 583 pb y 213 pb en las muestras de papaya procesadas.

## DISCUSIÓN

Actualmente, el uso de herramientas bioinformáticas desempeña un papel importante en el desarrollo de técnicas moleculares. Con el software NTI Advance® en conjunto con la base de datos GenBank se determinaron las regiones conservadas de 27 secuencias del genoma viral del PRSV, y con los análisis *in silico* se logró predecir el tamaño de los amplicones que se obtendrían con los oligonucleótidos HP857F-R, CP583F-R y CP213F-R que se desarrollaron en la presente investigación.

Además, el cultivo de papaya ha despertado interés en el sector agrícola de la Costa por las ganancias que genera a corto plazo, originando que el estado de Oaxaca ocupe en años consecutivos los primeros lugares en la producción de papaya a nivel nacional. Pero estos logros no han sido sencillos, ya que las plantaciones son altamente susceptibles al ataque de varios agentes fitopatógenos, entre los que destacan los de tipo viral, uno de los más devastadores es el PRSV.

Así mismo, para garantizar el éxito en los rendimientos del cultivo es determinante que los centros de investigación de la región tropical contribuyan con el desarrollo y la implementación de herramientas moleculares que permitan la identificación temprana de agentes fitopatógenos como los virus para implementar el control de manera oportuna y específica.

La técnica de transporte de tejido vegetal por deshidratación con sílica gel ha sido documentada con éxito en la reacción en cadena de la polimerasa (Carrió y Rosselló, 2014). Los resultados de autores que evaluaron la estabilidad genética de plántulas de uva (*Vitis vinifera*) y kiwi (*Actinidia deliciosa*) fueron altamente reproducibles a partir de plantas criopreserva-

das usando sílica gel (Zhai *et al.*, 2003). Investigaciones con cítricos, en las que se compararon diferentes procesamientos de tejido para detectar *Candidatus Liberibacter asiaticus* por PCR, reportaron que las muestras deshidratadas en sílica gel son apropiadas para ser usadas en técnicas moleculares (Bella *et al.*, 2016). En cuanto a investigaciones de árboles de ornato se reportó que la calidad del ADN extraída por tejido preservado por sílica gel fue comparable a la pureza del ADN extraído de hojas frescas (Huang *et al.*, 2016). Los estudios relacionados con técnicas moleculares y el uso de la sílica gel como agente secante de material vegetal son amplios, sin embargo, no se encontró evidencia documentada relacionada con la técnica de RT-PCR en conjunto con el uso de material vegetal deshidratado mediante esta técnica, por ello, en el presente trabajo se reporta el éxito de la amplificación usando ARN extraído mediante este método con hojas de papaya deshidratadas con sílica gel.

Las tres parejas de oligonucleótidos HP857F-R y CP213F-R amplificaron de manera exitosa los tres fragmentos esperados de acuerdo a su diseño y validado por los análisis *in silico*.

Estudios similares han reportado el uso de oligonucleótidos específicos para la detección del PRSV de plantas de papaya de Chiapas, Tabasco y Veracruz. Los oligonucleótidos fueron capaces de amplificar por medio de la técnica de RT-PCR un fragmento de 800 pb y 1100 pb del gen que codifica para la proteína de la cápsida (Ruiz y Silva, 1997). Otros investigadores en Colima usaron oligonucleótidos que flanquean la proteína de la cápsida obteniendo un amplicón de aproximadamente 1000 pb (Guzmán *et al.*, 2018). En el ámbito internacional han detectado el PRSV en plantaciones de papaya en Hawái, por la técnica de PCR anidada (Hamim *et al.*, 2018).

Actualmente, no hay reportes del desarrollo de oligonucleótidos específicos para la identificación del PRSV en plantas de papaya de la Costa de Oaxaca. Los oligonucleótidos que han sido reportados solo amplifican una región, la secuencia que codifica para la proteína de la cápsida. En cambio, los que se proponen en el presente trabajo amplifican dos regiones conservadas del genoma viral, HC-Pro y CP.

La tecnología está evolucionando constantemente y las técnicas moleculares no son su excepción porque evolucionan de tal manera para que los análisis o protocolos sean más rápidos, fáciles y confiables; sin embargo, para poder lograrlo, debemos de incursionar con otros investigadores que desarrollan otras disciplinas como: bioinformática, visión artificial, y desarrollo de aplicaciones móviles; integrando dichas disciplinas se podrán obtener herramientas integrales útiles para que los productores puedan detectar de manera rápida, económica y eficiente alguna enfermedad, ya sea ocasionada por un agente viral, bacteriano o fúngico.

## CONCLUSIONES

Se reportan las secuencias de tres oligonucleótidos específicos HP857F-R, CP583F-R y CP213F-R que identificaron al PRSV de plantas infectadas, confirmando la presencia del agente viral en los cultivos de papaya localizados en San José Río Verde en el Municipio de Santiago Jamiltepec del estado de Oaxaca.

La calidad del ARN extraído proveniente de la deshidratación de las hojas de plantas papaya con sílica gel en conjunto con el reactivo TRizol™ generó una pureza que propició el correcto desarrollo de la técnica RT-PCR. Este procedimiento de preservación es útil cuando la disponibilidad de nitrógeno líquido

sea limitada y exista distancia considerable entre el sitio de colecta y el lugar de su procesamiento.

Con la implementación de herramientas bioinformáticas fue posible diseñar tres pares de oligonucleótidos específicos que amplifican regiones altamente conservadas del genoma viral. Los iniciadores aquí reportados se recomiendan para ser implementados en la identificación del PRSV en otros cultivares de papaya y regiones donde se presenten síntomas compatibles o sugerentes de PRSV.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Mar por el financiamiento otorgado para el proyecto, a los productores Ing. Alberto Reyes Cisneros e Ing. Juan Manuel Abrajan por el material vegetal que donaron a la investigación. Del mismo modo a los revisores anónimos que ayudaron a mejorar el presente documento.

## CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

## BIBLIOGRAFÍA

ABREU, P.; PICCINA, J.; SILAS, P.; BUSSA, D.; VENTURA, J.; FERNANDES, P. 2012. Molecular Diagnosis of papaya meileira Virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and Real-Time RT-PCR. *Virological Methods*, 180(1-2), 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.jvirom-et.2011.12.003>

ADAMS, M.; ANTONIW, J.; BEAUDOIN, F. 2005. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Molecular Plant Pathology*, 6(4), 471-487. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00296.x>

AZAD, M.; KALAM, A.; AMIN, L.; SIDIK, N. 2014. Gene technology for papaya ringspot virus disease management. *The Scientific World Journal*, 14 1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/768038>

BELLA, P.; LICCIARDELLO, G.; SICILIA, A.; STRANO, C.; CATARA, A.; DENG, X.; DENG, Z.; LA ROSA, R.; CATARA, V. 2016. Collecting and preserving plant DNA for Huanglongbing diagnosis in citrus samples from China. *European Journal of Plant Pathology*, 146(4), 829-836. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0961-3>

CABRERA, D.; CRUZ, M.; PORTAL, O. 2010. Efecto de la temperatura en la virulencia del virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-p). *Fitosanidad*, 14(2), 123-125. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209115357009>

CABRERA, D.; GARCÍA, D.; PORTAL, O. 2010. Virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-p): Biología, epifitología y diversidad genética como base para el manejo mediante técnicas biotecnológicas. *Biotecnología Vegetal*, 10(2), 67-77. (Disponible: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/273> verificado: noviembre de 2019).

CARRIÓ, E.; ROSSELLÓ, J. 2014. Salt drying: a low cost, simple and efficient method for storing plants in the field and preserving biological repositories for DNA diversity research. *Molecular Ecology Resources*, 14(2), 344-351. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12170>

CHANG, L.; LEE, Y.; SU, H.; HUNG, T. 2003. First report of papaya leaf curl virus infecting papaya plants in Taiwan. *Plant Disease*, 87(2), 204-204. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.2.204A>

CRUZ, F.; TAÑADA, J.; ELVIRA, P.; DOLORES, L.; MAGDALITA, P.; HAUTEA, D.; HAUTEA, R. 2009. Detection of mixed virus infection with papaya ringspot virus (PRSV) in papaya (*Carica papaya* L.) grown in Luzon, Philippines. *Crop Science*, 34(1), 62-74. (Disponible: <https://www.cabi.org/isc/FullTextPDF/2009/20093112035.pdf> verificado: febrero de 2020).

DÍAZ, A.; QUIÑONES, M.; ARANA, F.; SOTO, M.; HERNÁNDEZ, A. 2010. Potyvirus: Características generales, situación de su diagnóstico y determinación de su presencia en el cultivo del pimiento en Cuba. *Protección Vegetal*, 25(2), 69-79. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522010000200001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522010000200001)

ESQUIVEL, A.; CAMELO, V.; REZENDE, J.; KITAJIMA, E.; GONZÁLEZ, L. 2019. First detection of papaya ringspot virus-type W and zucchini yellow mosaic virus infecting *Cucurbita maxima* in Paraguay. *Plant Pathology*, 102, 231. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00367-7>

GENBANK. 2018. National Center for Biotechnology Information - NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

GUZMÁN, S.; RENTERÍA, J.; VALADEZ, P.; BUENROSTRO, M.; MANZO, G.; VELÁZQUEZ, S. 2018. Identificación molecular de virus asociados al cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) 'maradol' en el estado de Colima. *Biotecnología y Sustentabilidad*, 2(1), 115-121. (Disponible: <http://revistas.uaz.edu.mx/index.php/biotecnologiasust/article/view/223> verificado: noviembre de 2019).

HAMIM, I.; BORTH, W.; MELZER, M.; HU, J. 2018. Ultra-sensitive detection of papaya ringspot virus using single-tube nested PCR. *Acta Virologica*, 62(4), 379-385. <https://doi:10.4149/av.2018.405>

HUANG, M.; SUN, X.; ZHOU, Y.; WANG, X. 2016. Comparison of methods to preserve *Rheum palmatum* (Polygonaceae) for efficient DNA extraction and PCR amplification. *Genetics and Molecular Research*, 15(3), 1-9. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038019>

INVITROGEN. 2008. Vector NTI Advance™ Software User manual; Invitrogen Corporation: Carlsbad, CA, EUA. (Disponible: [https://www.urmc.rochester.edu/libraries/Miner/research/documents/Vector\\_NTAdvance\\_11\\_Users\\_Manual.pdf](https://www.urmc.rochester.edu/libraries/Miner/research/documents/Vector_NTAdvance_11_Users_Manual.pdf) verificado: julio de 2019).

INVITROGEN. 2018. Trizol™ reagent User guide; Invitrogen Corporation: Carlsbad, CA, EUA. (Disponible: [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf) verificado: septiembre de 2019).

KALLESHWARASWAMY, C.; KRISHNAKUMAR, N.; DINESH, M.; CHANDRASHEKAR, K.; MANJUNATHA, M. 2010. Evaluation of insecticides and oils on aphid vectors for the management of papaya ringspot virus (PRSV). *Agricultural Sciences*, 22(3), 552-553. (Disponible: [https://www.researchgate.net/profile/Chandrashekara\\_KN/publication/233933434\\_2009\\_Chandra\\_KJAS/links/0912f50d19c3cc5302000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Chandrashekara_KN/publication/233933434_2009_Chandra_KJAS/links/0912f50d19c3cc5302000000.pdf) verificado: enero de 2020).

KELANIYANGODA, D.; MADHUBASHINI, L. 2010. Indicator plants: Tools for detecting papaya ring spot potyvirus and cucumber mosaic virus. *Food and Agriculture*, 1(2), 64-69. (Disponible: <https://jfa.sljol.info/articles/abstract/10.4038/jfa.v1i2.1800/> verificado: enero de 2020).

KWON, S.; KIM, M.; CHOI, H.; KIM, H. 2005. Biological characteristics and nucleotide sequences of three Korean isolates of zucchini yellow mosaic virus. *General Plant Pathology*, 71(1), 80-85. <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0165-0>

MAIA, I.; HAENNI, A.; BERNARDI, F. 1996. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *General Virology*, 77(7), 1335-1341. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-7-1335>

MISHRA, R.; PATIL, B. 2018. First complete genome sequence of a distinct papaya ringspot virus isolate from the northeastern region of India. *Genome Announcements*, 6(22), 1-2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00437-18>

PEREZ, D.; TAPIA, R.; CORTES, A.; QUIJANO, A.; NEXTICAPAN, A.; MARTÍN, R. 2012. First report of papaya meileira virus (PMeV) in Mexico. *African Journal of Biotechnology*, 11(71), 13564-13570. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB12.1189>

PRIMER SELECT®. 2006. Version 7.0. DNASTAR. Madison, WI.

RUIZ, S.; SILVA, L. 1997. Use of RT-PCR for papaya ringspot virus detection in papaya (*Carica papaya*) plants from Veracruz, Tabasco and Chiapas. *Mexicana de Fitopatología*, 15(2), 86-90. (Disponible: [https://www.researchgate.net/profile/Laura\\_Silva-Rosales/publication/268419793\\_Use\\_of\\_RT-PCR\\_for\\_Papaya\\_Ringspotvirus\\_Detection\\_in\\_Papaya\\_Carica\\_papaya\\_Plants\\_from\\_Veracruz\\_Tabasco\\_and\\_Chiapas/links/54b-1875b0cf2318f0f93ecfd.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Laura_Silva-Rosales/publication/268419793_Use_of_RT-PCR_for_Papaya_Ringspotvirus_Detection_in_Papaya_Carica_papaya_Plants_from_Veracruz_Tabasco_and_Chiapas/links/54b-1875b0cf2318f0f93ecfd.pdf) verificado: agosto de 2019).

SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (SIAP). 2019. (Disponible: [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenProducto.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do) verificado: noviembre de 2019).

SHEN, W.; YAN, P.; GAO, L.; PAN, X.; WU, J.; ZHOU, P. 2010. Helper component proteinase (HC-Pro) protein of Papaya ringspot virus interacts with papaya calreticulin. *Molecular Plant Pathology*, 11(3), 335-346. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00606.x>

SULTANA, S.; ROY, B.; SHERPA, A. 2019. Natural occurrence of papaya ringspot virus in *Clitoria ternatea* in India. *Plant Pathology*, 101(1), 183-183. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0128-5>

TAPIA-TUSSELL, R.; MAGAÑA-ALVAREZ A.; CORTES-VELAZQUEZ A.; ITZA-KUK G.; NEXTICAPAN-GARCEZ A.; QUIJANO-RAMALLO A.; MARTIN-MEX, R.; PEREZ-BRITO D. 2015. Seed transmission of papaya meileira virus in papaya (*Carica papaya*) cv. maradol. *Plant pathology*, 64(2), 272-275. <https://doi.org/10.1111/ppa.12279>

TRIPATHI, S.; SUZUKI, J.; FERREIRA, S.; GONSALVES, D. 2008. Papaya ringspot virus P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Molecular Plant Pathology*, 9(3), 269-280. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00467.x>

WU, H.; LIN, S.; CHEN, K.; YEH, S.; CHUA, N. 2010. Discriminating mutations of HC-Pro of zucchini yellow mosaic virus with differential effects on small RNA pathways involved in viral pathogenicity and symptom development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(1), 17-28. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-1-0017>

YAP, Y.; DUANGJIT, J.; PANYIM, S. 2009. N-terminal of papaya ringspot virus type-W (PRSV-W) helper component proteinase (HC-Pro) is essential for PRSV systemic infection in zucchini. *Virus Genes*, 38(3), 461-467. <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0348-z>

YEH, S.; JAN, F.; CHIANG, C.; DOONG, T.; CHEN, M.; CHUNG, P.; BAU, H. 1992. Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. *General Virology*, 73(10), 2531-2541. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-10-2531>

ZHAI, Z.; WU, Y.; ENGELMANN, F.; CHEN, R.; ZHAO, Y. 2003. Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved *in vitro* cultured grape and kiwi shoot-tips using RAPD. *CryoLetters*, 24(5), 315-322. (Disponible: <https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2003/0000024/0000005/art00006#> verificado: diciembre de 2019).