



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Evidencia de la transmisión del *Papaya meleira virus* (PMeV) por insectos en *Carica papaya* L.

Tesis que presenta

GUADALUPE ISABEL GARCÍA CÁMARA

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Opción Bioquímica y Biología molecular)

Mérida, Yucatán, México

Octubre del 2018

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de la **M.C. Guadalupe Isabel García Cámara**, titulado **“EVIDENCIA DE LA TRANSMISIÓN DEL PAPAYA MELEIRA VIRUS (PMeV) POR INSECTOS EN CARICA PAPAYA L.”** fue realizado en el Laboratorio GeMBio y en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito y el Dr. Óscar Alberto Moreno Valenzuela, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

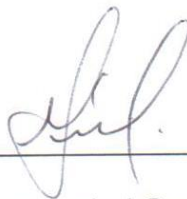
Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 3 de octubre del 2018.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



M.C. Guadalupe Isabel García Cámara

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo al inicio de este proyecto, por su dedicación y sus valiosas enseñanzas durante mi formación académica.

Al Dr. Óscar Alberto Moreno Valenzuela, por su apoyo, su confianza y su valiosa dirección a lo largo de todo mi proceso académico.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell, por sus comentarios y enseñanzas, las cuales contribuyeron al mejoramiento de mi desarrollo académico.

Al Dr. Anuar Ahmed Magaña Álvarez, por su apoyo durante cada etapa de la presente investigación y su valiosa amistad.

Al I.Q.I. Alberto Cortés Velázquez, por su orientación sobre las técnicas moleculares durante la fase experimental de la presente tesis de doctorado.

Al M.C. Rodolfo Martín Mex, por su asesoría sobre el manejo agronómico de las especies vegetales durante los experimentos de campo del presente trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca de manutención número 265330, sin la cual no hubiera sido posible realizar mis estudios de doctorado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., por permitirme el uso de sus instalaciones a lo largo de toda mi formación académica.

Al posgrado en Ciencias Biológicas y la Coordinación de la opción en Bioquímica y Biología Molecular, por su apoyo y orientación durante los procesos de titulación.

Al Laboratorio GeMBio (Grupo de Estudios Moleculares aplicados a la Biología), por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos, y proporcionarme los materiales necesarios para el desarrollo de la presente investigación.

A mi Comité Tutorial: Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito, Dr. Óscar Alberto Moreno Valenzuela, Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes y Dr. Raúl Tapia Tussell, por su dedicación y sus valiosas observaciones, las cuales contribuyeron al fortalecimiento de mi formación académica.

A mi comité predoctoral: Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes, Dr. Raúl Tapia Tussell, Dra. Cecilia Hernández Zepeda, Dr. Jairo Cristóbal Alejo y Dr. Enrique Castaño de la Serna, por sus importantes comentarios dirigidos al mejoramiento de mi desarrollo académico.

A mi Comité Revisor: Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito, Dr. Óscar Alberto Moreno Valenzuela, Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes, Dr. Raúl Tapia Tussell, Dra. Cecilia Hernández Zepeda, Dr. Jairo Cristóbal Alejo y Dr. Enrique Castaño de la Serna, por su dedicación durante la revisión de la presente tesis y las observaciones, las cuales enriquecieron el presente trabajo de investigación.

A todos los que de una forma u otra han contribuido en mi formación académica y en la realización de la presente tesis de doctorado.

DEDICATORIAS

A todas las personas importantes de mi vida, por quienes soy lo que soy.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XVIII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES GENERALES.....	3
1.1. CULTIVO DE PAPAYA.....	3
1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	3
1.3. PRODUCCIÓN MUNDIAL Y NACIONAL DE PAPAYA E IMPORTANCIA ECONÓMICA ...	4
1.4. LIMITANTES FITOSANITARIAS DEL CULTIVO DE PAPAYA.....	6
1.4.1. <i>Papaya meleira virus (PMeV)</i>	7
1.4.1.1. Sintomatología de la enfermedad pegajosa de la papaya	8
1.4.1.2. Diagnóstico del PMeV.....	9
1.4.1.3. Epidemiología del PMeV	11
1.5. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE VIRUS DE PLANTAS.....	13
1.5.1. <i>Transmisión por insectos vectores</i>	14
1.5.2. <i>Transmisión no persistente</i>	15
1.5.3. <i>Transmisión persistente</i>	16
1.5.4. <i>Transmisión semipersistente</i>	17
1.5.5. <i>Transmisión por mosquita blanca</i>	17
1.5.6. <i>Transmisión por áfidos</i>	18
1.5.7. <i>Transmisión por chicharritas</i>	21
1.6. JUSTIFICACIÓN	24
1.7. HIPÓTESIS	25
1.8. OBJETIVOS	26
1.8.1. <i>General</i>	26
1.8.2. <i>Específicos</i>	26
1.9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
CAPÍTULO 2. EMPOASCA PAPAYAE (HEMIPTERA: CICADELLIDAE)-MEDIATED TRANSMISSION OF PAPAYA MELEIRA VIRUS IN MEXICO.....	29
2.1. ABSTRACT	30
2.2. INTRODUCTION.....	31
2.3. MATERIALS AND METHODS.....	32
2.3.1. <i>Insect's collection</i>	32

2.3.2.	<i>Morphological and molecular identification of insects</i>	33
2.3.3.	<i>Screening of PMeV-Mx in insects by RT-qPCR and sequencing</i>	34
2.3.4.	<i>Empoasca papayae colony establishment</i>	35
2.3.5.	<i>Plant material and virus source</i>	35
2.3.6.	<i>Quantification of PMeV-Mx by RT-qPCR</i>	36
2.3.7.	<i>PMeV transmission tests</i>	37
2.3.8.	<i>Acquisition of PMeV by E. papaya nymphs</i>	39
2.4.	RESULTS	39
2.4.1.	<i>Insect species diversity and abundance</i>	39
2.4.2.	<i>Detection of PMeV-Mx in insect species</i>	42
2.4.3.	<i>Establishing Empoasca papaya populations</i>	43
2.4.4.	<i>Transmission of PMeV-Mx by Empoasca papayae</i>	44
2.5.	DISCUSSION.....	46
2.6.	ACKNOWLEDGMENTS.....	52
 CAPÍTULO 3. MOLECULAR AND EXPERIMENTAL EVIDENCE OF OCCURRENCE OF MEXICAN VARIANT OF PAPAYA MELEIRA VIRUS IN COMMON WEED SPECIES IN PAPAYA ORCHARDS IN MEXICO		53
3.1.	ABSTRACT	54
3.2.	INTRODUCTION.....	55
3.3.	MATERIALS AND METHODS.....	56
3.3.1.	<i>Plant material survey</i>	56
3.3.2.	<i>Detection of PMeV-Mx by RT-PCR</i>	57
3.3.3.	<i>Infectivity test</i>	57
3.3.4.	<i>Quantification of PMeV-Mx by RT-qPCR</i>	58
3.4.	RESULTS	59
3.4.1.	<i>Detection of PMeV-Mx in weed species under natural conditions</i>	59
3.5.	DISCUSSION.....	64
3.6.	ACKNOWLEDGMENTS.....	67
 CAPÍTULO 4. MOLECULAR AND EXPERIMENTAL EVIDENCE OF WATERMELON (CITRULLUS LANATUS) AS HOST OF THE MEXICAN VARIANT OF PAPAYA MELEIRA VIRUS		
69		
4.1.	ABSTRACT	70
4.2.	INTRODUCTION.....	71
4.3.	MATERIALS AND METHODS.....	73

4.3.1.	<i>Seed source and germination process.....</i>	73
4.3.2.	<i>Inoculation of watermelon plants with PMeV-Mx.....</i>	73
4.3.3.	<i>Detection of PMeV-Mx by RT-PCR.....</i>	74
4.3.4.	<i>Assessment of viral load by real-time RT-PCR.....</i>	74
4.3.5.	<i>PMeV sequencing and analysis.....</i>	75
4.4.	RESULTS.....	75
4.4.1.	<i>Screening watermelon for susceptibility to PMeV-Mx infection.....</i>	75
4.4.2.	<i>Viral spread and replication in watermelon.....</i>	76
4.5.	DISCUSSION.....	78
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES		81
5.1.	DISCUSIÓN	81
5.2.	CONCLUSIONES GENERALES	85
5.3.	PERSPECTIVAS.....	86
BIBLIOGRAFÍA.....		87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 <i>Carica papaya</i> L.....	4
Figura 1.2 Principales síntomas del PMeV.....	10
Figure 2.1 Transmission tests using cage-reared <i>E. papayae</i> adults.....	38
Figure 2.2 Six of the 16 leafhopper genera/species (Hemiptera: Cicadellidae) found in papaya fields, positive to PMeV-Mx.....	42
Figure 2.4 A , TaqMan® RT-qPCR of PMeV-Mx in <i>E. papayae</i> adults exposed to PMeV-Mx-infected papaya plants.....	45
Figure 2.5 TaqMan® RT-qPCR of PMeV-Mx in <i>Carica papayae</i> L. cv. Maradol plants exposed to viruliferous <i>E. papayae</i> adults.....	46
Figure 3.1 RT-PCR detection of PMeV-Mx in weed plants collected at Alfredo Bonfil orchard in Campeche, Mexico.....	60
Figure 3.2 RT-PCR detection of PMeV-Mx in inoculated weed plants.....	62
Figure 3.3 TaqMan® RT-qPCR of PMeV-Mx in <i>P. hirsutum</i> and <i>R. nudiflora</i> inoculated plants.....	63
Figure 4.1 RT-PCR detection of PMeV-Mx in inoculated watermelon plants.....	76
Figure 4.2 Symptoms of PMeV-Mx infection in watermelon.....	77
Figure 4.3 TaqMan® RT-qPCR of PMeV-Mx in inoculated watermelon seedlings	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Principales Estados productores de papaya en México 5

Cuadro 1.2 Virus de papaya en las principales regiones de cultivo en el mundo..... 8

Table 2.1 Taxonomic classification and response to PMeV-Mx detection of insects collected in papaya fields in 2015 and 2016..... 40

Table 2.2 Abundance of insect species PMeV-Mx-positives by RT-qPCR, collected in papaya fields in 2015 and 2016..... 41

Table 3.1 List of host and non-host weed species of Mexican variant Papaya meleira virus (PMeV-Mx) sampled in papaya crops..... 61

Table 3.2 Viral load of PMeV-Mx in *Panicum hirsutum* and *Ruellia nudiflora* inoculated plants by TaqMan®PCR quantitation. 63

ABREVIATURAS

RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
PMeV	Papaya meleira Virus
PSD	Papaya sticky disease
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble cadena
μ L	microlitro
mL	mililitros
mM	milimolar
μ M	micromolar
p/v	Peso/volumen
cDNA	DNA complementario

RESUMEN

El *Papaya meleira virus* (PMeV) es el agente causal de la "enfermedad pegajosa de la papaya" (PSD) en Brasil y México. A pesar de la importancia económica de esta enfermedad y de la necesidad de implementar estrategias efectivas de control, se sabe poco de su epidemiología. Por esto, el objetivo de este trabajo fue identificar a los insectos vectores de la variante mexicana del PMeV (PMeV-Mx), y evaluar la capacidad de infección del PMeV-Mx en especies de arvenses y otras plantas, comúnmente encontradas en áreas de cultivo de papaya. Insectos adultos se colectaron en huertos de papaya de la región sur-sureste de México y fueron identificados morfológica y molecularmente. La familia *Cicadellidae* (Hemiptera) fue la más diversa y abundante, y *Empoasca papayae* fue la especie más abundante y con el título de PMeV-Mx más alto. Los ensayos de transmisión del PMeV-Mx se realizaron en condiciones controladas usando *E. papayae* y *C. papaya* cv. Maradol. El PMeV-Mx fue detectado y cuantificado en el 100% de las plantas de papaya, 14 días después de que estas fueron expuestas a los insectos virulíferos (dae), cuyo título de RNA viral aumentó de 0.06 pg/μl (21 dae) a 26.6 pg/μl (60 dae). Cinco meses después, las plantas mostraron síntomas de la enfermedad pegajosa, lo que demostró que *E. papayae* es capaz de transmitir PMeV-Mx a *C. papaya*. Además, se evaluaron 38 especies de arvenses presentes en huertos de papaya y se detectó PMeV-Mx en 11 especies, pertenecientes a tres familias de plantas. También se detectó este virus en muestras de sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) recolectadas en huertos ubicados a 0.5 km de huertos de papaya infectados con PMeV. Para confirmar la susceptibilidad a PMeV-Mx, las especies *Dactyloctenium aegyptium*, *Panicum hirsutum* (Poaceae), *Ruellia nudiflora* (Acanthaceae), y *Citrullus lanatus* (Cucurbitaceae), fueron inoculadas con látex infectado con PMeV-Mx. La infección se confirmó mediante RT-PCR y RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR), mostrando que estas especies son hospedantes alternos de PMeV-Mx. Este es el primer reporte acerca de estas especies como hospederos de PMeV-Mx.

ABSTRACT

Papaya meleira virus (PMeV) causes “papaya sticky disease” (PSD) in *Carica papaya* in Brazil and Mexico. Despite its economic importance and the need for effective control, little is known about PSD epidemiology. The aim of this work was to identify insect vectors of PMeV-Mexican variant (PMeV-Mx) and to evaluate the occurrence and infection capacity of PMeV-Mx for common weed and other plant species found in papaya-growing areas. Adult insects were collected in papaya fields in the south-southeast region of Mexico and were identified morphological and molecularly. The *Cicadellidae* family (Hemiptera) was the most diverse and abundant, and *Empoasca papayae* was the most abundant species with higher virus titers. PMeV-Mx transmission assays were conducted under controlled conditions using *E. papayae* and *C. papaya* cv. Maradol. Beginning 14 days after plants were exposed to insects, PMeV-Mx was detected and quantified in 100% of evaluated papaya plants, whose viral RNA titer increased from 0.06 pg/μl (21 dae) to 26.6 pg/μl (60 dae). Five months later, these plants developed sticky disease symptoms, demonstrating that *E. papayae* is capable of transmitting PMeV-Mx to *C. papaya* with a high efficiency. Additionally, 38 common weed species present in papaya-growing areas were evaluated and PMeV-Mx was detected in 11 different species of three plant families. PMeV was also detected in collected samples of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) plants from orchards located 0.5 Km from sticky disease papaya fields. To confirm their susceptibility to PMeV-Mx, weed species *Dactyloctenium aegyptium*, *Panicum hirsutum* (Poaceae), *Ruellia nudiflora* (Acanthacea), and watermelon seedlings were inoculated with latex from papayas infected with PMeV-Mx, and infection was confirmed by RT-PCR and quantitative RT-PCR (RT-qPCR), showing that these plant species are alternative hosts of PMeV-Mx. This is the first reference of these species as natural hosts of PMeV-Mx.

INTRODUCCIÓN

Carica papaya L. es una especie originaria de América Central perteneciente a la familia *Caricaceae* (Carvalho y Renner, 2012). Los principales países productores del fruto fresco son: India, Brasil, Indonesia, República Dominicana, Nigeria y México (FAOSTAT, 2018). En México, este cultivo es atractivo para el agricultor por su corto período entre siembra y cosecha, así como su rendimiento por hectárea y su alta demanda en el mercado. Sin embargo, el rendimiento es afectado por diversas limitantes fitosanitarias, entre las cuales destacan las enfermedades ocasionadas por virus (Ventura *et al.*, 2004).

Una de las enfermedades virales que afectan el cultivo de papaya y la cual ha adquirido importancia en los últimos años, es la “papaya sticky disease” (PSD) o “meleira”, cuyo agente causal es el *Papaya meleira virus* (PMeV). Esta enfermedad fue detectada por primera vez en Brasil, a finales de los 80’s del siglo XX, y desde entonces se ha convertido en el principal problema fitosanitario del cultivo en ese país, debido a las grandes pérdidas de producción causadas por el virus (Araujo *et al.*, 2007). El síntoma característico de esta enfermedad es la exudación espontánea de látex en frutos verdes, que al oxidarse, provoca la formación de costras negras que dañan la superficie de los mismos, ocasionando la pérdida de su valor comercial (Maciel-Zambolin *et al.*, 2003). Un estudio realizado en el Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C (CICY), por parte del laboratorio GeMBio (Grupo de Estudios Moleculares aplicados a la Biología), permitió la detección del PMeV en muestras de huertos de papaya de diferentes estados de México, denominando a esta enfermedad como “lloroso de la papaya” (Pérez-Brito *et al.*, 2012).

El origen viral del agente causal de esta enfermedad fue confirmado por Maciel-Zambolim *et al.*, (2003), trabajo en donde fue propuesto por primera vez el nombre de *Papaya meleira virus* (PMeV). La morfología y composición de este virus, con un genoma de RNA de doble cadena (dsRNA) de aproximadamente 12 kb, eran totalmente distintas a otras previamente descritas. Recientemente, otros estudio realizado en Brasil, demostró que la enfermedad surge de una doble infección con PMeV, el primer virus identificado y reportado, relacionado con miembros de la familia *Totiviridae*, y un segundo virus, el *Papaya meleira virus 2* (PMeV2), relacionado con miembros del género *Umbravirus*, y el

cual posee un genoma de RNA de cadena sencilla (ssRNA) de aproximadamente 4.5 Kbs (Antunes *et al.*, 2016). En México, Zamudio-Moreno *et al.*, (2015) reportaron una variante mexicana del PMeV (PMeV-Mx), con una secuencia parcial de 1154 pb que codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), y que muestra una similitud del 71% con la RdRp de PMeV2 (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015; Antunes *et al.*, 2016).

Existen pocos registros de la epidemiología de esta enfermedad y de sus mecanismos de transmisión. Se considera que algunas prácticas agrícolas, principalmente durante la cosecha de los frutos, son responsables de la diseminación de la enfermedad dentro de los huertos (Ventura *et al.*, 2004; Abreu *et al.*, 2015). Además, este virus se encuentra en las semillas y puede ser transmitido a la siguiente generación por esta vía (Tapia-Tussell *et al.*, 2014). En cuanto al rango de posibles hospederos del PMeV, únicamente existe un estudio preliminar al respecto, el cual evaluó la presencia del virus en diferentes especies de arvenses comúnmente encontradas en los huertos de papaya en Brasil, detectando al PMeV en la especie *Brachiaria decumbens* (*Poaceae*) (Maciel-Zambolin *et al.*, 2003). Finalmente, se ha considerado la participación de insectos como posibles vectores del PMeV, con base en estudios sobre el patrón de propagación de la enfermedad en campo (Rodrigues *et al.*, 1989; Vidal *et al.*, 2005).

Por lo anterior, es de suma importancia confirmar si existe algún vector aéreo involucrado en la transmisión del PMeV, el cual pueda favorecer su rápida diseminación en los campos de papaya. También es importante conocer el rango de hospedantes de este virus, en particular en especies arvenses que pudieran ser reservorios del PMeV, lo que aseguraría la permanencia del virus entre ciclos productivos de papaya. De esta manera será posible complementar las estrategias de manejo fitosanitario enfocadas al control y prevención de la diseminación de esta enfermedad.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. CULTIVO DE PAPAYA

La papaya (*Carica papaya* L.) es una planta dicotiledónea, perteneciente a la familia *Caricaceae* Dumort., la cual comprende 34 especies en seis géneros. Tiene su origen en América Central, muy probablemente en el sureste de México, de donde fue tomada por los españoles y llevada a las Filipinas en el siglo XVI, desde donde se introdujo a India y de ahí fue introducida a la mayoría de los países tropicales y subtropicales (Carr, 2014). *C. papaya* L., la única especie del género *Carica*, representa la especie de mayor cultivo y valor comercial dentro de esta familia (Carvalho y Renner, 2012; Badillo, 1993).

1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La papaya es una planta arborescente perennifolia, la cual puede vivir hasta 25 años; sin embargo, los árboles de papaya en plantaciones comerciales son por lo general menores de 2 años, debido a la reducción de la productividad de los árboles de mayor edad y la dificultad en la recolección de los frutos de los árboles altos. Así mismo, la papaya es una de las pocas especies de plantas reconocidas como polígamas con tres sexos, femenino, masculino y hermafrodita (Ming *et al.*, 2012).

Los árboles pueden medir de 2 a 10 m. Poseen un tronco principal erguido y estrecho (20-30 cm de diámetro en la base y 5-7 cm de diámetro en la corona), el cual es hueco entre los nudos y está cubierto con una corteza delgada con cicatrices foliares prominentes (Figura 1.1). Las hojas son grandes y de peciolo largo, emergen desde la parte superior de la planta, conformando una lámina palmeada abierta y redondeada. Tanto el tallo, como las hojas y los frutos de la planta contienen látex (Carr, 2014; Ming *et al.*, 2012).

En campo, dependiendo de la variedad, las plantas comienzan a florecer aproximadamente dos meses después del trasplante, y la floración continúa durante todo el año. En cuanto a la fructificación, ésta inicia entre los tres a seis meses después del trasplante. La maduración de fruto ocurre de cuatro a seis meses después de la floración. Los frutos, apiñados alrededor del tronco, son bayas elipsoides (si provienen de flores

bisexuales) o esféricas (si provienen de flores femeninas), con un tamaño aproximado de 10 a 50 cm de largo y un contenido de 200 a 400 semillas. Los frutos, de pulpa blanda, se tornan de verdes a anaranjados en la madurez (Carr, 2014).

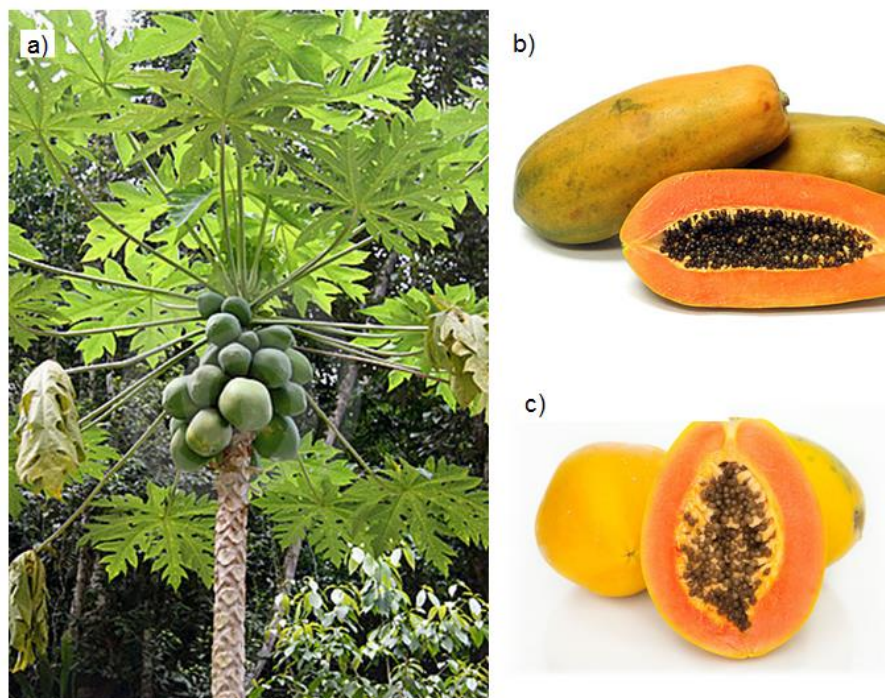


Figura 1.1 *Carica papaya* L. a) Árbol de papaya.; b) Fruto proveniente de flor bisexual; c) Fruto proveniente de flor femenina.

1.3. PRODUCCIÓN MUNDIAL Y NACIONAL DE PAPAYA E IMPORTANCIA ECONÓMICA

El cultivo de papaya se encuentra distribuido principalmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Es producido en 60 países, en su mayoría, en vías de desarrollo. Los principales países productores del fruto fresco son: India, Brasil, México, Indonesia y República Dominicana, con una producción total de 13, 050,746.00 toneladas, lo que posiciona al cultivo como uno de los tres cultivos tropicales más importantes (excluyendo al plátano), después de los mangos y las piñas, con un total de 441,964 hectáreas cultivadas en el mundo (FAOSTAT, 2018).

México es el principal exportador de papaya, el mayor volumen de esta exportación es hacia Estados Unidos de América. Actualmente, en México se cultivan 19,114 hectáreas, con una producción total de 964,702 toneladas y un rendimiento de 57.82 toneladas por hectárea (SIAP, 2017). Los principales estados productores se presentan en el Cuadro 1.1. El estado de Veracruz tiene la mayor superficie cosechada, con 106,888 toneladas anuales de fruta. Sin embargo, los mayores rendimientos de producción se concentran en el estado de Oaxaca, el cual en conjunto con otros estados como Chiapas, Colima y Yucatán, dominan el mercado nacional e internacional, dada la calidad del fruto (Guzmán *et al.*, 2012; SIAP, 2017).

Cuadro 1.1 Principales Estados productores de papaya en México (SIAP, 2017).

Posición	Estado	Producción (ton)
1	Oaxaca	288,160
2	Colima	167,775
3	Chiapas	146,436
4	Veracruz	106,888
5	Michoacán	79,207
6	Guerrero	43,232
7	Campeche	25,931
8	Jalisco	24,768
9	Yucatán	18,272
10	Sinaloa	11,439

El fruto de papaya es consumido principalmente fresco, aunque también puede utilizarse como materia prima para bebidas y mermeladas (Ming *et al.*, 2012). De acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (2018), la papaya ocupa el primer lugar en puntajes nutricionales entre 38 frutas comunes, con base en el requerimiento diario recomendado de vitamina A, vitamina C, potasio, ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina, hierro y calcio, además de fibra.

El fruto de papaya también cuenta con múltiples usos industriales, basados principalmente en su contenido de una enzima proteolítica denominada papaína (EC: 3.4.22.2), la cual es el mayor componente de la mezcla de enzimas extraídas del látex del

fruto verde, y podría estar asociada con mecanismos de defensa de la planta contra patógenos e insectos (El Moussaoui *et al.*, 2001). Comercialmente, la papaína es utilizada directamente para la digestión de proteínas, así como para el ablandamiento de carnes y el aclaramiento de cerveza, aunque entre sus posibles aplicaciones farmacológicas, también se incluyen el desarrollo de inhibidores selectivos de cisteinproteasas y el tratamiento externo de tejidos duros tales como verrugas y cicatrices (Czaplewski *et al.*, 1999).

Tanto frutos, tallos, hojas, semillas, raíces y látex de papaya han mostrado contener una gran variedad de compuestos activos (cisteín-proteasas, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, flavonoides, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos) y han sido utilizados en etnomedicina para el tratamiento de enfermedades que incluyen úlceras gástricas y cáncer, pues sus efectos farmacológicos incluyen antioxidación, antiinflamación, antialérgicos y antiproliferativo (Seigler *et al.*, 2002; Otsuki *et al.*, 2010).

1.4. LIMITANTES FITOSANITARIAS DEL CULTIVO DE PAPAYA

El cultivo de papaya es atractivo para los agricultores por su alta rentabilidad, su período corto entre siembra y cosecha, y su alto rendimiento por hectárea. Sin embargo, existen limitantes fitosanitarias que afectan severamente la producción del fruto. Entre los principales factores limitantes del cultivo se encuentran las enfermedades ocasionadas por diferentes fitopatógenos, entre los que destacan bacterias, hongos, fitoplasmas y virus (Lima *et al.*, 2001). La presencia de enfermedades en el cultivo ocasiona cuantiosas pérdidas de producción, comercialización y exportación del fruto fresco, cuyo impacto podría ser en ocasiones hasta del 100% (Ventura *et al.*, 2004). Aunque en el mundo se han reportado más de diez diferentes virus en papaya (Cuadro 1.2), sólo cinco son considerados de mayor importancia: *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Papaya leaf distortion mosaic virus* (PLDMV), *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), *Papaya mosaic virus* (PapMV) y *Papaya meleira virus* (PMeV) (Abreu *et al.*, 2015).

1.4.1. *Papaya meleira virus* (PMeV)

Papaya meleira virus (PMeV) es el agente causal de la enfermedad pegajosa de la papaya o “meleira”. Dicha enfermedad fue reportada por primera vez en Brasil a finales de los 80s del siglo XX en el estado de Bahía, y posteriormente en Espírito Santo, alcanzando hasta el 100% de incidencia en algunos huertos, y convirtiéndose en un factor limitante para la producción de papaya (Rodrigues *et al.*, 1989; Lima *et al.*, 2001; Ventura *et al.*, 2004). Años más tarde, en el 2008, el personal del laboratorio GeMBio del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), observó una sintomatología similar a la de PSD, en una plantación de papaya ubicada en el estado de Quintana Roo, México. La detección molecular de PMeV en muestras de látex de plantas sintomáticas colectadas en siete estados productores de papaya (Campeche, Jalisco, Quintana Roo, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y Yucatan), confirmó la presencia de este virus en México (Perez-Brito *et al.*, 2012).

Dentro de las primeras descripciones de esta enfermedad, la sintomatología encontrada fue atribuida a una perturbación en la absorción de calcio o boro asociada al estrés hídrico (Nakagawa *et al.*, 1987), o a la posibilidad de un desequilibrio en el intercambio con el suelo (Correa *et al.*, 1988). La primera evidencia de un agente causal fue reportada por Kitajima *et al.*, (1993), quien detectó la presencia de partículas isométricas similares a las de origen viral, de alrededor de 50 nm de diámetro, distribuidas en masas amorfas o agregados de tamaño variable dentro de los vasos laticíferos de las plantas enfermas. Este estudio también demostró la presencia de un RNA de doble cadena (dsRNA) de aproximadamente 12 kb, proveniente de la extracción de látex de frutos de plantas sintomáticas. El origen viral del agente causal de esta enfermedad fue confirmado por Maciel-Zambolim *et al.* (2003), en este reporte fue propuesto por primera vez el nombre de *Papaya meleira virus* (PMeV), puesto que la morfología y composición del virus, eran totalmente distintas a otros agentes causales previamente descritos. Recientemente, un estudio realizado en Brasil, demostró que la enfermedad surge de una doble infección con PMeV, el primer virus identificado y reportado, relacionado con miembros de la familia *Totiviridae*, y un segundo virus, el *Papaya meleira virus 2* (PMeV2), relacionado con miembros del género *Umbravirus* y el cual posee un genoma de RNA de cadena sencilla

(ssRNA) de aproximadamente 4.5 Kbs (Antunes *et al.*, 2016). En México, Zamudio-Moreno *et al.*, (2015) reportaron una variante mexicana del PMeV (PMeV-Mx), con una secuencia parcial de 1154 pb que codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), que muestra una similitud del 71% con la RdRp de PMeV2 (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015; Antunes *et al.*, 2016).

Cuadro 1.2 Virus de papaya en las principales regiones de cultivo en el mundo (Antunes *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2012; Ventura *et al.*, 2004).

Familia	Género	Especie
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i> , TSWV
	<i>Tenuivirus</i>	<i>Papaya mild yellow leaf virus</i> , PMYLV
<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Papaya leaf curl virus</i> , PalCuV
	<i>Bigeminivirus</i>	<i>Croton yellow vein mosaic virus</i> , CYVMV
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Papaya ringspot virus</i> , PRSV
	<i>Potyvirus</i>	<i>Papaya leaf distortion mosaic virus</i> , PLDMV
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Rhabdovirus</i>	<i>Papaya apical necrosis virus</i> , PANV
NE ²	<i>Sobemovirus</i>	<i>Papaya lethal yellowing virus</i> , PLYV
NE ²	<i>Potexvirus</i>	<i>Papaya mosaic virus</i> , PapMV
NE ²	Relacionado con miembros de <i>Totiviridae</i>	<i>Papaya meleira virus</i> , PMeV
NE ²	Relacionado con miembros de <i>Umbravirus</i>	<i>Papaya meleira virus 2</i> , PMeV2

²No establecido. La caracterización molecular del genoma viral está en desarrollo.

1.4.1.1. Sintomatología de la enfermedad pegajosa de la papaya

El síntoma característico de la enfermedad pegajosa de la papaya es la exudación excesiva de látex en los frutos verdes, la cual se produce espontáneamente o a causa de daños mecánicos (Figura 1.2). Este látex es translúcido y acuoso, mucho menos viscoso que el látex de plantas sanas, carente de coagulación; además, se oscurece rápidamente por oxidación a causa de la exposición atmosférica, manchando la superficie del fruto

(Abreu *et al.*, 2015). La excesiva exudación de látex otorga un aspecto pegajoso al fruto, de ahí el nombre de la enfermedad.

La exudación espontánea de látex también puede ocurrir en el borde de hojas jóvenes y en el ápice de la planta, en donde su oxidación provoca pequeñas lesiones necróticas (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003). En frutos infectados, en estados avanzados de la enfermedad, se observan áreas irregulares de color verde-claro en la superficie, síntomas ligeramente similares a deficiencia por micronutrientes, principalmente por boro (Ventura *et al.*, 2004) y que han sido denominados como “mapeo” del fruto. Además, la pulpa de la fruta presenta pequeñas manchas y una consistencia más suave y menos sabrosa, lo que afecta su valor comercial (Abreu *et al.*, 2015). En casos de transmisión por semilla, los síntomas de la enfermedad son más severos, ya que aparecen nódulos de látex dentro de la cavidad de los frutos (Tapia Tussell *et al.*, 2015).

La distribución del PMeV dentro de la planta parece estar restringida a los vasos laticíferos, en donde modifica los niveles de potasio y, en consecuencia, el equilibrio osmótico, lo que ocasiona la ruptura de la células para la subsecuente exudación espontánea de látex (Rodrigues *et al.*, 2009a). Es importante mencionar que el látex de papaya contiene altas cantidades de proteasas y de alcaloides, y pudiera estar directamente involucrado en mecanismos de defensa de la planta contra patógenos (El Moussaoui *et al.*, 2001), por lo cual representa un ambiente completamente antagonista para otros virus de la planta (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003).

1.4.1.2. Diagnóstico del PMeV

El diagnóstico del PMeV es de gran importancia para el control de la enfermedad, puesto que hasta el momento no se conocen variedades de papaya resistentes al PMeV que pudieran estar disponibles en el mercado. Éste se realiza principalmente mediante el monitoreo en campo de los síntomas de la enfermedad, los cuales aparecen hasta después del período de floración, situación que complica la detección oportuna, dado el largo período asintomático de las plantas infectadas (Ventura *et al.*, 2004; Abreu *et al.*, 2012). En consecuencia, una planta infectada podría permanecer meses dentro de la

plantación sin ser detectada, y se convierte en una fuente de inóculo antes de ser eliminada (Araujo *et al.*, 2007).

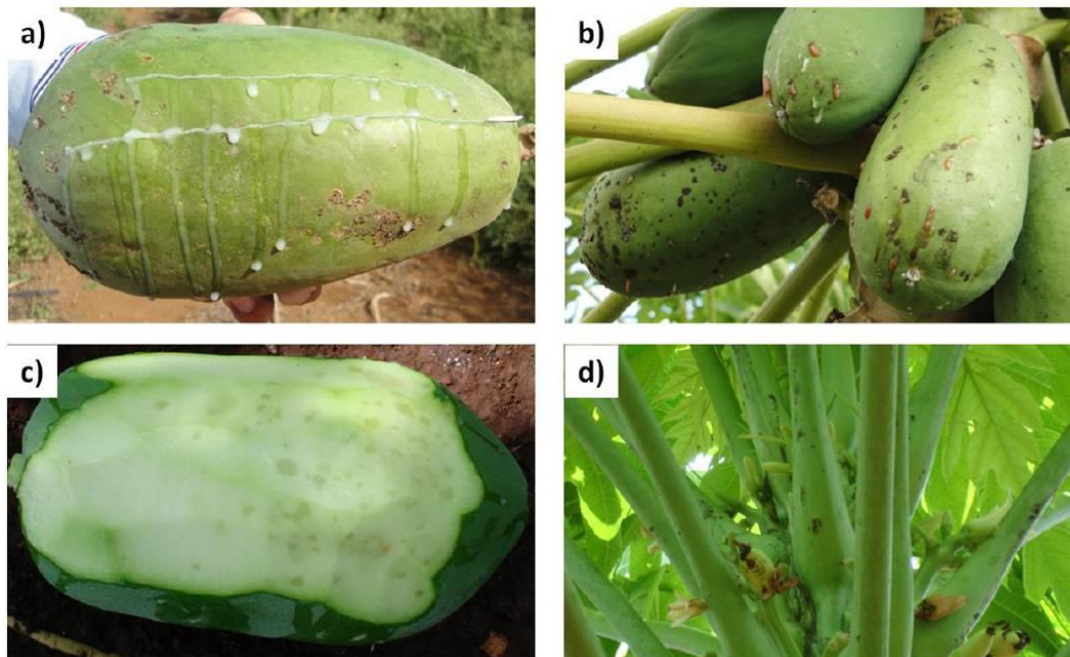


Figura 1.2 Principales síntomas del PMeV: a) Exudación espontánea; b) Frutos manchados; c) pequeñas manchas en la pulpa; d) Manchas necróticas en el peciolo.

Por lo anterior, se han desarrollado y descrito métodos moleculares para la detección del virus. Los utilizados inicialmente estuvieron basados en la purificación del dsRNA mediante una columna CF11, seguida de su visualización en geles de acrilamida (Doods *et al.*, 1984). Posteriormente, Tavares *et al.*, (2004), desarrollaron dos métodos para el diagnóstico de la enfermedad con base en la extracción de ácidos nucleicos provenientes del látex de plantas de papaya infectadas y la visualización del dsRNA en geles de agarosa al 1%. Estos métodos son rápidos, fáciles, económicos y permiten el análisis de un gran número de muestras simultáneamente. Además, requieren únicamente entre 350 y 500 μL de látex de papaya.

Araujo *et al.*, (2007) desarrollaron un método basado en la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), el cual ofrece ventajas sobre los métodos anteriores de detección y diagnóstico, ya que requiere únicamente de algunos μL de ácido

nucleico extraídos a del látex. Entre las ventajas de este método están su rapidez, sensibilidad y capacidad de analizar un gran número de muestras. Un método aún más sensible para la detección del virus a través de RT-PCR en tiempo real, fue desarrollado por Abreu *et al.*, (2012), el cual permite mayor sensibilidad ante la baja titulación del virus en plantas enfermas, así como la cuantificación y el análisis simultáneo de un gran número de muestras. Por su parte, Zamudio-Moreno *et al.*, (2015) desarrollaron iniciadores específicos para la detección molecular de la variante mexicana del PMeV (PMeV-Mx) con base en la construcción de una mini biblioteca de DNA complementario, puesto que los métodos de detección descritos previamente resultaron ineficientes para la detección de esta variante. En cambio, estos iniciadores desarrollados para el PMeV-Mx son capaces de amplificar muestras infectadas tanto de México, como de Brasil. Finalmente, García-Cámara *et al.* (2017) presentaron un método de detección y cuantificación del PMeV mediante el diseño de una sonda TaqMan®, basada en la secuencia del gen de la RdRp del PMeV-Mx.

1.4.1.3. Epidemiología del PMeV

En las plantaciones de papaya donde no se eliminan las plantas infectadas con este virus, la incidencia de la enfermedad puede alcanzar hasta el 100%, extendiéndose rápidamente dentro del cultivo y ocasionando la pérdida total de la producción (Ventura *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar del impacto económico de esta enfermedad, la información epidemiológica es escasa, lo cual representa un problema al implementar estrategias de control.

Diversos estudios acerca del patrón de diseminación de la enfermedad en el campo, basados en monitoreos mensuales, sugieren que algunas prácticas agrícolas, como la cosecha de los frutos, son las responsables de la diseminación de la enfermedad, pues el patrón espacial se observa a lo largo de las filas del cultivo (Ventura *et al.*, 2004; Abreu *et al.*, 2015). Rodrigues *et al.*, (2009b), evaluaron cinco métodos diferentes de inoculación mecánica, basados en simulaciones de las lesiones causadas por actividades de trabajo en el campo, tales como cortar las hojas, cortar los tallos, raspar la superficie de las hojas, raspar la superficie de los tallos e inyectar el látex infectado en el ápice del tallo, esta última práctica fue la única responsable de la transmisión del virus. Posiblemente la rápida

coagulación del látex exudado ante la lesión provocada por cortes o raspaduras sobre el tejido, impidió la infección del PMeV (Rodrigues *et al.*, 2009b).

Un estudio realizado con semillas del cultivar Maradol demostró que el PMeV es transmitido por semillas contaminadas, lo que podría explicar cómo llegó este virus a México (Daldro *et al.*, 2014; Tapia-Tussell *et al.*, 2015). Los autores demostraron la presencia del virus en el embrión-endospermo y en la testa de semillas provenientes de frutos de plantas infectadas. Además, detectaron el virus en el 81% de las plántulas evaluadas, obtenidas a partir de semillas contaminadas, a los 160 días posteriores al trasplante (Tapia-Tussell *et al.*, 2015).

Otro aspecto importante en la epidemiología de la enfermedad pegajosa de la papaya son los hospedantes alternos del PMeV. Sin embargo, hay muy poca información al respecto, ya que sólo se conoce un estudio realizado en Brasil, donde se evaluaron diversas especies de arvenses, pertenecientes a diferentes familias, que crecían en los huertos de papaya afectados por la meleira. Únicamente en *Brachiaria decumbens* (Poaceae) se encontró un dsRNA viral con un peso molecular similar al de PMeV (Maciel-Zambolin *et al.*, 2003).

Los estudios sobre el patrón de diseminación de la enfermedad en campo también señalaron la posibilidad de un vector aéreo involucrado en la transmisión del PMeV. En la mayoría de las áreas de evaluación, se detectó una alta incidencia de la enfermedad en los bordes de los huertos, lo que indicó que la migración del vector puede jugar un rol importante en la diseminación del virus. Además, fue posible detectar la presencia de focos aislados de infección dentro del cultivo, indicio de la formación de colonias del vector, pues una mayor agregación del virus entre las filas del cultivo, pudiera ser consecuencia del limitado movimiento del vector aéreo, al pretender colonizar plantas cercanas (Ventura *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2004). Al respecto, se evaluó la capacidad de la especie *Trialeurodes variabilis* Quaintance (Hemiptera: Aleyrodidae), la cual se considera una plaga importante en el cultivo de papaya en Brasil. Esta especie no fue capaz de transmitir al PMeV a plantas de papaya sanas, aunque se determinó la presencia del virus en adultos y ninfas (Rodrigues *et al.*, 2009).

En campo, la mejor estrategia disponible para el control y manejo de la enfermedad en campo es la eliminación de las plantas infectadas. Para complementar lo anterior, se han recomendado diversas estrategias de control para reducir el progreso de esta enfermedad, o prevenir y retrasar su introducción en áreas donde no se han observado los síntomas característicos. Estas estrategias incluyen inspecciones semanales en los campos, eliminación de plantas enfermas tan pronto se observen los primeros síntomas; instalación de nuevos huertos de papaya lo más lejos posible de aquellos con historial de meleira; evitar la recolección de semillas provenientes de plantas infectadas; disminución de daños mecánicos en las plantas durante las actividades de cultivo y desinfección del material utilizado durante el proceso; eliminación de las plantas al final de un ciclo de producción para eliminar las fuentes de inóculo; e implementación de rotación de cultivos en áreas productoras de papaya.

1.5. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE VIRUS DE PLANTAS

Un aspecto importante acerca de la dinámica de las enfermedades virales así como de las interacciones hospedante-patógeno es el conocimiento acerca de sus mecanismos de transmisión (Chen *et al.*, 2006). Los virus son un grupo de parásitos intracelulares obligados, pues carecen de un sistema que les permita desarrollar su propio metabolismo, por lo que requieren vivir dentro de las células de un hospedante, apoderándose de su maquinaria enzimática y otros componentes celulares para replicarse y propagarse dentro del huésped (Chen *et al.*, 2006; Andret-Link y Fuchs, 2005). Dentro de la planta, los virus se movilizan de una célula a otra a través de los plasmodesmos. Sin embargo, debido a que los plasmodesmos no comunican con el exterior, los virus requieren de un mecanismo que permita el rompimiento de la pared celular para su eficiente inoculación y diseminación dentro de los individuos de una plantación (Blanc *et al.*, 2014).

Por lo anterior, los virus desarrollaron diferentes estrategias de transmisión dependientes de diversos factores adicionales. La transmisión de un virus puede ocurrir de manera horizontal, vertical, o ambas. En la transmisión horizontal, los virus se transmiten entre individuos de la misma generación a través del movimiento de otros agentes y la penetración del virus es a través de heridas sobre las capas superficiales de la planta,

como sucede durante la inoculación por daño mecánico o a través de la transmisión por vectores; en cambio, en la transmisión vertical, los virus se transmiten a través de la semilla de una planta infectada hacia la siguiente generación o a través del vector a su progenie (Chen *et al.*, 2006; Hull, 2009).

1.5.1. Transmisión por insectos vectores

Las plantas son organismos inmóviles, incapaces de ser transmisores de virus, excepto en algunos casos de transmisión a través de la semilla o el polen, o por el movimiento de algunas plantas como resultado de la intervención humana así como por algunos métodos de propagación vegetativa. La mayoría de los virus de plantas dependen de la transmisión eficiente de un vector específico, el cual los transmitirá de hospedero a hospedero (Ng y Falk, 2006).

El 76% de las especies de virus reconocidas por el International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), son transmitidas a través de un vector. Los insectos del orden Hemiptera transmiten la mayoría de estos virus de plantas (55%), sin embargo, los insectos vectores de mayor importancia económica están restringidos a unas pocas familias dentro de este orden (Hogenhout *et al.*, 2008). Los áfidos o pulgones (Aphididae) y las mosquitas blancas (Aleyrodidae), ambas familias dentro del suborden Sternorrhyncha, son capaces de transmitir al menos 270 y 320 especies de virus de plantas, respectivamente (Wylie *et al.*, 2017; Zerbini *et al.*, 2017; Navas-Castillo *et al.*, 2011; Hull, 2009). Por otro lado, las chicharritas (Cicadellidae) y los saltahojas (Delphacidae), dentro del suborden Auchenorrhyncha, son capaces de transmitir 31 y 24 virus de plantas, respectivamente (Hull, 2009; Hogenhout *et al.*, 2008). Finalmente, otras 52 especies de virus de plantas son transmitidas por insectos hemípteros de las familias Coccoidea, Psyllidae y Membracidae (Hull, 2009; Hogenhout *et al.*, 2008).

Los trips del orden Thysanoptera son parientes cercanos de los insectos hemípteros y poseen piezas bucales compuestas por dos estiletes maxilares y un estilete mandibular que conforman el aparato de alimentación, lo que les permite ser transmisores eficientes de virus de plantas. Los ácaros del orden Trombidiformes, de las familias Eriophyidae y

Tenuipalpidae, también son transmisores de virus de plantas y sus estructuras bucales en forma de estilete o de aguja, pueden perforar las células en la superficie e inducir deformaciones foliares (Sarwar, 2015). Finalmente, algunos nemátodos del orden Dorylaimida como *Xiphinema* spp., *Longidorus* spp. y *Trichodorus* spp., con estiletes huecos, reversibles y largos, son capaces de alcanzar el floema de la planta y transmitir virus de plantas (Brown y MacFarlane, 2001).

Los insectos hemípteros poseen piezas bucales penetrantes de tipo chupador. Sus piezas maxilares y mandibulares conforman un estilete en forma de aguja, el cual les permite realizar una transmisión de partículas virales efectiva. La alimentación de algunos hemípteros es especializada, a partir de células del floema, xilema o mesófilo; sin embargo, algunos son capaces de alimentarse a partir de una combinación de estos tejidos (Cranston y Gullan, 2003). Se han descrito tres mecanismos de transmisión: no persistente, persistente y semipersistente (Watson y Roberts, 1939; Blanc *et al.*, 2014), dependientes de los sistemas de compatibilidad virus-vector, los cuales son complejos y específicos, determinados por características moleculares específicas. Dichas características determinan el tiempo necesario para la adquisición de un virus, el tiempo durante el cual el virus es retenido dentro del vector y el tiempo requerido para la inoculación eficiente en una nueva planta sana.

1.5.2. Transmisión no persistente

La transmisión no persistente se presenta cuando el virus se adquiere a partir de una planta infectada en cuestión de segundos (< 5 min) y necesita ser inoculado inmediatamente en un nuevo hospedante, ya que no se retiene dentro del vector por más de algunos minutos u horas (< 12 h) (Ng y Falk, 2006; Hogenhout *et al.*, 2008). Los virus transmitidos por este mecanismo establecen una asociación reversible con la cutícula de las piezas bucales o en el intestino anterior del insecto vector, empleando para ello dos estrategias principales. La primera, la estrategia de la cápside, consiste en la interacción específica de los virus de plantas con sus vectores a través de dominios específicos en su proteína de la cápside (CP), la cual cuenta con receptores putativos en el estilete del vector, aún pobremente caracterizados (Weber y Hampton, 1980; Hampton y Weber,

1983; Chen y Francki, 1990; Blanc *et al.*, 2014). La segunda estrategia, la estrategia del componente auxiliar, consiste en la interacción específica de los virus de plantas con sus vectores a través de proteínas virales, requeridas para la unión de las partículas virales al interior del revestimiento cuticular de los estiletes maxilares del vector, que funcionan como un 'puente' de unión entre la CP y el receptor putativo en el estilete (Govier y Kassanis, 1974; Lung y Pirone, 1974). En ambas estrategias, la retención de las partículas virales ocurre exclusivamente en el extremo distal, en donde el canal salival y el canal de alimentación se unen conformando un conducto común. Lo anterior permite la retención temporal de las partículas virales en el interior del conducto común, hasta ser liberadas en las células del hospedante durante el proceso de alimentación del vector, a través de la hidrólisis de las proteínas de unión, mediante una proteasa (Ammar *et al.*, 1994; Uzest *et al.*, 1995). Es importante señalar que los virus no persistentes pueden ser transmisibles mecánicamente y los áfidos, son los únicos vectores reconocidos como transmisores de virus de manera no persistente (Ng y Falk, 2006).

1.5.3. Transmisión persistente

En la transmisión persistente, los vectores son capaces de inocular al virus adquirido por períodos de tiempo más largos (horas, días o semanas). Es decir, los tiempos requeridos para la adquisición e inoculación del virus son mayores y el tiempo de retención del virus dentro del cuerpo del vector es indefinido, por lo que pueden permanecer a lo largo de toda su vida (Hogehout *et al.*, 2008). Un virus persistente, requiere de un período de latencia para completar su ciclo dentro del cuerpo del vector, medido en horas o días (Ng y Falk, 2006). Durante este período, los virus de plantas transmitidos por este mecanismo son capaces de atravesar la barrera del epitelio intestinal, mediante un proceso de transcitosis, y a través de un receptor celular dependiente de clatrina (Wei *et al.*, 2007). Posteriormente, las partículas virales son liberadas al intestino para difundirse pasivamente a través de la hemolinfa, hasta encontrar receptores putativos ubicados específicamente en la lámina basal de las glándulas salivales (Brault *et al.*, 2007). Algunos estudios sugieren la implicación no específica de una proteína denominada simbionina y producida por una bacteria simbiótica, la cual podría actuar como una chaperona que protege a las partículas virales del sistema inmune de los insectos (van

den Heuvel *et al.*, 1994). Luteoviridae, Geminiviridae y Nanoviridae son familias de virus transmitidos por este mecanismo (Brault *et al.*, 2007; Ammar *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2013). Algunos virus de plantas son capaces de replicarse dentro de sus vectores, por lo que son denominados virus circulativos propagativos (Fukushi, 1935; Blanc *et al.*, 2014).

1.5.4. Transmisión semipersistente

También se han descrito virus intermedios, con períodos de adquisición e inoculación de varios minutos a horas y sin necesidad de un período de latencia antes de la inoculación, pues se asocian con su vector externamente, sobre la cutícula que recubre las partes de las piezas bucales o el intestino anterior. Este mecanismo de transmisión se denomina semipersistente (Sylvester, 1956; Harris, 1977). Los áfidos, las mosquitas blancas y las chicharritas son reconocidos como transmisores de virus de manera semipersistente (Ng y Falk, 2006).

1.5.5. Transmisión por mosquita blanca

Las moscas blancas son insectos pertenecientes a la familia Aleyrodidae. Se reproducen en climas cálidos donde son plagas de plantas herbáceas y leñosas. En climas templados son plagas de cultivos protegidos, lo que les permite sobrevivir durante condiciones de temperatura poco favorables. Los huevos son depositados por adultos móviles y alados en la parte inferior de las hojas (Gill, 1990; Jones, 2002). Tras la eclosión, aparece el primer estadio, llamado “el rastreador”, que es el único instar móvil lo que le permite buscar alimento. Posteriormente, siguen tres estadios inmaduros e inmóviles. El último estadio o etapa “pupa” sufre metamorfosis para convertirse en adulto (Basu, 1995). El ciclo de vida depende de la temperatura y de las especies de plantas presentes, y puede tardar de 14 a 60 días, 20 días en promedio a una temperatura de 25°C, siendo capaces de reproducirse por partenogénesis (clonación o reproducción asexual) cuando las condiciones no son favorables (Frank y Liburd, 2005). Las mosquitas blancas tienen una amplia gama de hospedantes, en teoría todas las dicotiledóneas, incluidos diferentes cultivos de importancia económica de las familias Cucurbitaceae y Solanaceae, así como la yuca, el algodón, el frijol, la lechuga, entre otros (Jones, 2002). Las mosquitas blancas dañan directamente a las plantas al alimentarse de la savia de las hojas, induciendo

trastornos fisiológicos como el llamado “hoja de plata” (*Squash silver leaf disorder* o SSL) en cucurbitáceas, causado por la inyección de fitotoxinas por algunos biotipos de la especie *Bemisia tabaci* Genn. Estos insectos también pueden afectar a sus hospederos al producir una secreción pegajosa, conocida como “fumagina”, la cual interfiere con el funcionamiento adecuado de las hojas y sirve como sustrato de hongos saprófitos del género *Capnodium* spp. (Jones, 2002).

El daño indirecto producido por estos insectos es debido a la transmisión de virus, de manera persistente circulativa (Liburd y Nyoike, 2008). De las 1,300 especies de mosquitas blancas descritas actualmente, pertenecientes a 120 géneros, únicamente las especies *B. tabaci* Genn., *T. vaporariorum* West., *T. abutilonea* Hald. y *T. ricini* Mi. son vectores de virus (Mound y Halsey, 1978). Tanto las ninfas como los adultos de estas especies se alimentan al insertar sus probóscides en las hojas, hasta penetrar y alcanzar las células del floema para extraer la savia. Es durante este proceso que los virus de las plantas son adquiridos a partir de plantas infectadas (Jones, 2002). Después de su adquisición, los virus persistentes son conservados durante períodos que varían desde un par de semanas hasta toda la vida del insecto (Duffus, 1987). *B. tabaci* es vector de al menos 320 especies de virus de plantas pertenecientes a las familias Geminiviridae, Closteroviridae y Potyviridae (Zerbini *et al.*, 2017; Navas-Castillo *et al.*, 2011; Hull, 2009; Jones, 2002). Es importante mencionar que existen biotipos importantes de esta especie, con diferencias importantes en su capacidad de transmisión de virus (Bedford *et al.*, 1994; Sánchez-Campos *et al.*, 1999). Las poblaciones del biotipo B tienen una gran capacidad para transmitir Begomovirus; el género de virus de plantas más importante, con base en el número de especies de virus transmitidos por esta especie de mosquita blanca (Zerbini *et al.*, 2017; Navas-Castillo *et al.*, 2011). Incluso se sugiere que la aparición de nuevos virus en zonas colonizadas por el biotipo B es debido al rápido desarrollo y a la gama de hospedantes de este biotipo (Jones, 2002).

1.5.6. Transmisión por áfidos

Los áfidos o pulgones son vectores de al menos 270 especies de virus (Wylie *et al.*, 2017; Hull, 2009; Hogenhout *et al.*, 2008). Pertenecen a la familia Aphididae, dentro del

suborden Sternorrhyncha, y se encuentran distribuidos por todo el mundo, con más de 4,700 especies identificadas, especializadas en la alimentación a partir del floema (Blackman y Eastop, 2007). Estos insectos poseen una gran capacidad reproductiva. Además, dependiendo de la densidad poblacional, son capaces de invertir en la producción de ejemplares ápteros altamente fecundos o producir ejemplares alados menos prolíficos, que permiten su dispersión hacia nuevos hospedantes. Este dimorfismo les permite utilizar plantas herbáceas como hospedantes secundarios en el verano, con reproducción por partenogénesis, y migrar hacia hospederos perennes primarios durante el otoño, con una sola reproducción sexual (Tagu *et al.*, 2005; Braendle *et al.*, 2006; Williams y Dixon, 2007). Sin embargo, en zonas tropicales y subtropicales, con condiciones de temperatura más favorables, las hembras se reproducen por partenogénesis durante todo el año (Williams y Dixon, 2007). En algunas especies, las ninfas pueden alcanzar la madurez en tan solo cinco días. Su tipo de metamorfosis es denominada simple o incompleta, con base a una secuencia de desarrollo que inicia con la ovoposición, la eclosión seguida por cuatro instares ninfales hasta convertirse en adulto (Awmack y Leather, 2007). Aunque su alta inversión en reproducción les cuesta la producción de reservas de grasa, lo que limita su capacidad para recorrer largas distancias en la búsqueda de nuevos hospedantes, también los convierte en plagas capaces de colonizar plantas en monocultivo, por lo que casi todos los cultivos de importancia económica en el mundo son hospedantes de al menos una especie de áfido. En las regiones templadas, los pulgones son principalmente monófagos, por lo que se alimentan de una o algunas especies hospedantes relacionadas. Sin embargo, en zonas tropicales, en donde se encuentran mayor diversidad de especies de plantas, los áfidos suelen ser polífagos, donde seleccionan a sus hospedantes por pruebas al azar, estimulados por la apariencia de la planta (Blackman y Eastop, 2007). Estos insectos ingieren savia del floema a través de una estrecha perforación mediante su estilete. Durante el sondeo, los estiletes realizan punciones transitorias en células superficiales (epidermis, mesófilo o parénquima), causan un daño mecánico, que desencadena una respuesta por parte de la planta ante la infestación; además de que su saliva contiene oxidasas, pectinasas y celulasas, que se translocan a larga distancia dentro de la planta, produciendo efectos tóxicos (Goggin, 2007). Los síntomas comunes ante la infestación de áfidos incluyen clorosis, necrosis, marchitamiento, rizado de hojas, retraso en el

crecimiento de tallos y malformaciones, debido a que son capaces manipular la distribución de los nutrientes en la planta, de manera que favorecen la calidad nutricional en sus sitios de alimentación y restringen la exportación de nutrientes hacia otros órganos (Girousse *et al.*, 2005).

Son diversas las características que contribuyen al éxito de los áfidos como vectores de virus de plantas. Sus piezas bucales, en forma de estilete, son similares a una aguja capaz de perforar la pared celular, lo que les permiten la entrega de partículas virales a las células vegetales durante el proceso de alimentación, sin ocasionarles daños irreparables. Además, su alta capacidad de reproducción potencia la rápida diseminación del virus. Aunado a lo anterior, estos insectos al ser polívoros, son capaces de alimentarse de una gran variedad de plantas hospederas, una propiedad que permite la difusión de los virus hacia nuevos hospederos, así como su propagación a larga distancia. La conducta alimentaria de una determinada especie de áfido, así como la selección de una planta hospedante, afecta su potencial como vector (Ng y Perry, 2004). La mayoría de los áfidos vectores pertenecen a la subfamilia Aphidinae, en particular los géneros *Myzus*, *Aphis*, *Acyrtosiphon* y *Macrosiphum* (Blackman y Eastop, 2007; Katis *et al.*, 2007). La mayoría de los virus transmitidos por pulgones se realiza de manera no persistente o semipersistente (no circulativa), de acuerdo con el tiempo de retención y capacidad de inoculación y transmisión de las partículas virales por parte de estos insectos (Pirone y Harris, 1977). Con respecto a los virus transmitidos de manera no persistente, éstos pueden hacerlo a través de la estrategia de la cápside (*Bromoviridae*), o mediante la estrategia del componente auxiliar (*Potyviridae*). Con respecto al mecanismo de transmisión semipersistente, la adquisición de las partículas virales puede ocurrir en cuestión de minutos, aunque la eficiencia incrementa con la alimentación prolongada. Además, los viriones pueden ser retenidos por horas e incluso días, requiriendo de una o más proteínas auxiliares, como en el caso de los miembros de la familia *Caulimoviridae*, *Closteroviridae* y *Sesquiviridae* (Palacios *et al.*, 2002; Ng y Perry, 2004). Finalmente, los miembros de la familia *Luteoviridae* son transmitidos de manera persistente circulativa, ya que después de la ingestión de las partículas virales en tejidos infectados, éstas atraviesan el intestino anterior y son transportadas a través de la hemolinfa, para ser absorbidas por las células de las glándulas salivales accesorias (Gildow y Gray, 1993).

Por el contrario, las especies de la familia *Rhabdoviridae* son transmitidos por un mecanismo persistente propagativo, en donde la asociación entre el virus y el vector permanece por el resto del ciclo de vida del insecto e incluso es transmitido a la progenie (Ammar, 1994).

1.5.7. Transmisión por chicharritas

Existen más de 20,000 especies descritas de chicharritas en el mundo, distribuidas desde los bosques tropicales hasta la tundra ártica y desde el nivel del mar hasta una elevación de más de 4,000 metros (Dietrich, 2013). Son insectos saltadores que pertenecen a la familia Cicadellidae, que es la más numerosa y diversa dentro del suborden Auchenorrhyncha. Estos hemípteros fueron los primeros en ser descritos como vectores de virus de plantas (Nault y Ammar, 1989). El 90% de estas especies son endémicas a su respectiva región geográfica, lo que indica una alta especificidad con los hospedantes y una baja tasa de dispersión, la cual generalmente ocurre del sur hacia el norte, del oeste hacia el este, de las regiones alta diversidad a regiones de baja diversidad, y de climas cálidos hacia climas templados (Nielson y Knight, 2000).

Los cicadélidos se caracterizan por su gran biodiversidad, por ser poseedores de características morfológicas distintivas, con colores brillantes, alas cortas, un tamaño de 4 a 15 mm y por tener un comportamiento nocturno (Hamilton y Whitcomb, 2010; Mukhopadhyay, 2010). Estos insectos colonizan y se alimentan de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas, herbáceas o leñosas; para ello, utilizan dos estrategias distintas: los “generalistas” son polípagos y tienden a colonizar diversas especies de plantas, aunque algunas especies de generalistas únicamente ovipositan en un único hospedante; y los “especialistas”, que suelen alimentarse de una sola familia de plantas (olípagos), de géneros estrechamente relacionados (estenófagos) o de una sola especie perenne (monófagos), donde aseguran el suministro constante de alimentos y requieren de un menor esfuerzo reproductivo para mantener sus poblaciones reproductoras, ya que son sedentarios y no suelen sufrir pérdidas por dispersión, y se adaptan a la morfología y fisiología de la especie hospedera a expensas de perder su capacidad de reproducirse en otras especies (Hamilton y Whitcomb, 2010).

La mayoría de los cicadélidos prefieren alimentarse del floema, sin embargo, existen algunas excepciones, como los de la subfamilia Cicadellinae, que se alimentan del xilema, o la familia Typhlocybae, cuyos miembros se alimentan de las células del mesófilo (Redak *et al.*, 2004). El ciclo de vida de estos insectos depende de cada especie, así como del hospedante y las condiciones ambientales. Normalmente, el ciclo de un adulto dura entre 16 y 53 días, con machos de ciclos más cortos en comparación con las hembras. Después del apareamiento, las hembras adultas ovipositan en las hojas, pecíolos o tallos, y son capaces de completar varias generaciones durante el crecimiento de los cultivos. Las ninfas mudan cuatro o cinco veces antes de convertirse en adultos, y su rango de temperatura óptimo es de 15 a 36 °C (Mukhopadhyay, 2010).

Sólo alrededor del 1% de las especies descritas han demostrado ser capaces de ser vectores de virus de plantas; sin embargo, es muy probable que este número sea mucho mayor, dado el pobre conocimiento acerca de las interacciones hospedante-vector-virus (Dietrich, 2013). La subfamilia Deltocephalinae comprende el grupo más numeroso de vectores de virus de plantas (Zahniser y Dietrich, 2013). Los virus de plantas cuyos vectores son las chicharritas, se transmiten principalmente mediante tres mecanismos: semipersistente (no circulativa), persistente circulativa y persistente propagativa. Algunos de los virus transmitidos de manera semipersistente son el *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) y el *Rice tungro spherical virus* (RTSV), ambos transmitidos por especies de la subfamilia *Deltocephalinae* (Yamashita *et al.*, 197; Ammar *et al.*, 1992). Este mecanismo de transmisión se caracteriza por el involucramiento de una proteína auxiliar (HC) y la localización de las partículas virales en el revestimiento del intestino anterior, particularmente en el cibario, la faringe y el esófago del vector (Ng y Falk, 2006).

Con respecto a los virus de plantas transmitidos de manera persistente circulativa, algunos miembros de la familia *Geminiviridae*, el *Beet curly top virus* (CTV), especie tipo del género *Curtovirus*, y el *Maize streak virus* (MVS), especie tipo del género *Mastrevirus*, son transmitidos por este mecanismo, puesto que son capaces de atravesar la barrera del intestino, y acumularse en las células del intestino medio hasta ser liberados para circular en la hemolinfa (Ammar *et al.*, 2009). El *Maize streak virus* (MVS) es transmitido por nueve especies de chicharritas del género *Cicadulina* de manera persistente circulativa

(Bosque-Perez, 1999). El *Beet curly top virus* (CTV) es transmitido por la especie *Circulifer tenellus*, con una gama de hospedantes que incluyen 300 especies de plantas pertenecientes a 44 familias, en donde la especificidad de la interacción virus-vector es completamente dependiente de la proteína de la cápside (Soto *et al.*, 2005; Hogenhout *et al.*, 2008). Finalmente, el *Maize yellow stripe virus* (MYSV), así como los miembros de la familia *Rhabdoviridae* (*Wheat striate mosaic virus*, *Rice transitory yellowing virus*, *Potato yellow dwarf virus*, entre otros), *Tymoviridae* (*Maize yellow stripe virus*), y *Reoviridae* (*Rice Dwarf Virus*, *Rice gall dwarf virus*, *Wound tumour virus*) son transmitidos por chicharritas de manera persistente propagativa, puesto que son capaces de replicarse dentro de sus insectos vectores e invadir la mayor parte de sus tejidos (Fukushi, 1935; Ammar *et al.*, 2007).

1.6. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la gran importancia del *Papaya meleira virus* (PMeV) para el cultivo de papaya por las pérdidas que ocasiona, aún se desconoce si hay algún vector involucrado en su transmisión. Sin embargo, estudios previos de la epidemiología de esta enfermedad sugieren dicha posibilidad. Por lo anterior, es necesario identificar al (o los) insecto(s) vector(es) de PMeV a fin de complementar las estrategias de manejo fitosanitario enfocadas al control y a la prevención de la diseminación de este virus en México.

1.7. HIPÓTESIS

El *Papaya meleira virus* (PMeV) es transmitido por al menos un insecto vector presente en plantaciones de papaya y hay al menos una especie de planta hospedante alterna del virus.

1.8. OBJETIVOS

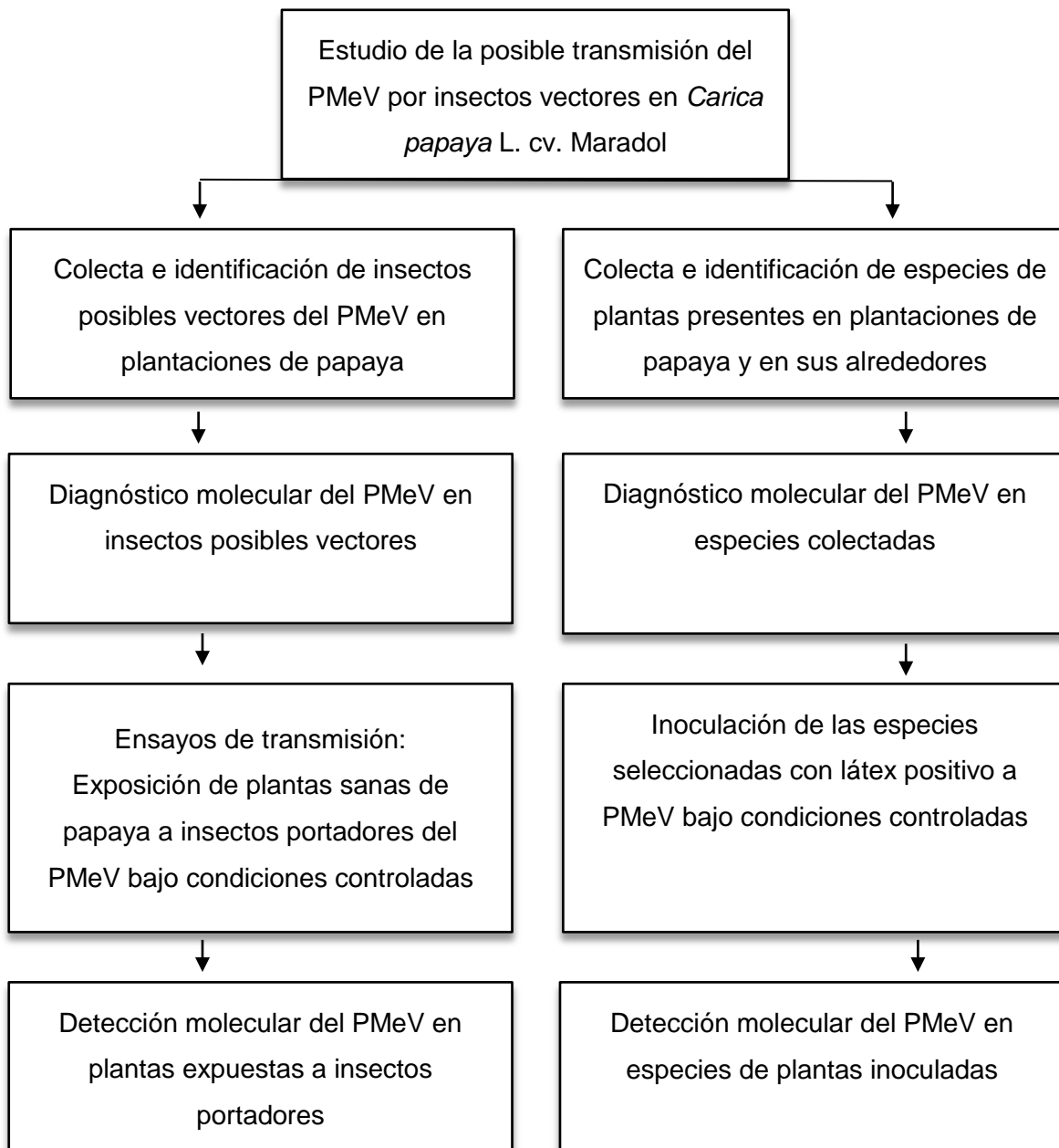
1.8.1. General

Identificar el (los) insecto(s) involucrado(s) en la transmisión de PMeV y la(s) especie(s) de planta(s) hospedante(s) alternativo(s) del virus.

1.8.2. Específicos

- Identificar las especies de insectos posibles vectores presentes en plantaciones experimentales y comerciales de papaya.
- Determinar molecularmente la presencia de PMeV en insectos posibles vectores.
- Evaluar la transmisión del PMeV a través de insectos portadores en plantas sanas bajo condiciones controladas.
- Identificar otras especies vegetales presentes en plantaciones experimentales y comerciales de papaya que pudieran ser reservorios alternativos de PMeV.
- Probar la patogenicidad del PMeV en los hospedantes alternos.

1.9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**Capítulo 2. EMPOASCA PAPAYAE (HEMIPTERA: CICADELLIDAE)-
MEDIATED TRANSMISSION OF PAPAYA MELEIRA VIRUS IN MEXICO**

I. García-Cámara^a; R. Tapia-Tussell ^b; A. Magaña-Álvarez^a, A. Cortés Velázquez^a; R. Martín-Mex^a, O. Moreno-Valenzuela^c and D. Pérez-Brito^a.

^a Laboratorio GeMBio, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 # 130, x 32 and 34, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán 97205, México.

^b Unidad de Energía Renovable, Centro de Investigación Científica de Yucatán AC, Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto, Km 5, Sierra Papacal, CP 97302, Mérida, Yucatán, México.

^c Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 #130, x 32 and 34, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán 97205, México.

Corresponding author: Daisy Pérez-Brito, e-mail daisypb@cicy.mx

2.1. ABSTRACT

Papaya meleira virus (PMeV) causes sticky disease in *Carica papaya* in Brazil and Mexico. Despite its economic importance and the need for effective phytosanitary control, it remains unknown whether any insect is this virus's vector. The aim of this work was to identify potential insect vectors of PMeV-Mexican variant (PMeV-Mx) and determine whether these potential vectors are capable of transmitting the virus. Adult insects were collected in papaya fields in the south-southeast region of Mexico and were identified morphological and molecularly. Their abundance and frequency was determined, and RT-qPCR was performed to determine if they carried PMeV-Mx. The *Cicadellidae* family (Hemiptera) was the most diverse and abundant, and *Empoasca papayae* was the most abundant species with higher virus titers. PMeV-Mx transmission assays were conducted under controlled conditions using *E. papayae* and *C. papaya* cv. Maradol. *E. papayae* was a carrier of PMeV-Mx 6 h after exposure, and its viral titer increased with time, peaking 2.125 pg/ μ l (maximum value) five days after exposure (dae). Beginning 14 days after plants were exposed to insects, PMeV-Mx was detected and quantified in 100% of evaluated papaya plants, whose viral RNA titer increased from 0.06 (21 dae) to 26.6 pg/ μ l (60 dae). Five months later, these plants developed sticky disease symptoms, demonstrating that *E. papayae* is capable of transmitting PMeV-Mx to *C. papaya* with a high efficiency.

2.2. INTRODUCTION

Mexico is one of the leading papaya (*Carica papaya* L.) producers worldwide, and it is the largest exporter of this fruit to the U.S. (FAOSTAT 2018). The production areas of papaya are predominantly in the central and south-southeastern regions of Mexico. In 2012, *Papaya meleira virus* (PMeV), causing sticky disease, was detected in papaya orchards in the Yucatan Peninsula, and since then, PMeV has spread from southern Mexico to 29 different municipalities in ten (out of 20) papaya-producing states (Perez-Brito *et al.*, 2012).

Sticky disease was first detected in the late 1980s in Brazil (Rodrigues *et al.*, 1989). To date, this disease has been reported only in Brazil and Mexico, but it could eventually spread to other papaya-producing countries in the Central American and Caribbean region.

The causative agent of sticky disease was identified in Brazil as PMeV, an isometric virus with a double-stranded RNA (dsRNA) genome (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003; Tavares *et al.*, 2004). Later in Brazil, sticky disease was found to be associated with double infection with PMeV, a *Totiviridae* virus, and PMeV2, an umbra-like virus with a single-stranded RNA (ssRNA) genome (Antunes *et al.*, 2016). However, in a Mexican variant of PMeV (PMeV-Mx), a 1154-bp partial sequence encoding a putative RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), is more similar to the RdRp of Papaya virus Q (PpVQ), a new papaya virus discovered in Ecuador (Quito-Avila *et al.*, 2015), and to the RdRps of PMeV2 and other members of the genus *Umbravirus* (Antunes *et al.*, 2016; Zamudio-Moreno *et al.*, 2015). It is important to note that a set of primers designed based on the PMeV-Mx sequence amplified fragments from both Brazilian and Mexican sticky disease-infected plants (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015).

During the economic cycle of the crop, PMeV infects between 20 to 50% of the orchards, but the disease incidence can sometimes increase to 100% (Abreu *et al.*, 2015; Ventura *et al.*, 2004).

The main problem with PMeV is not only the quantitative but also the qualitative loss of production because the fruits, affected by exudation and subsequent oxidation of latex, which are the main symptoms of sticky disease, are no longer suitable for commercialization (Abreu *et al.*, 2015; Garcia-Camara *et al.*, 2018).

There have been some studies to determine the ways in which this disease is transmitted. Consensus has been reached that certain agricultural practices, such as fruit harvesting, may be responsible for the spread of PMeV in orchards (Abreu *et al.*, 2015; Ventura *et al.*, 2004). Mechanical transmission of PMeV occurs when latex of diseased plants is injected into the stems of healthy papayas (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2009). In addition, PMeV transmission between generations via contaminated papaya seeds have been demonstrated in cv. Maradol (Tapia-Tussell *et al.*, 2015). Recently, it was also shown that watermelon is an alternative host of this virus (Garcia-Camara *et al.*, 2018).

There are few studies on the transmission of this virus by insect vectors. There is some evidence of an airborne vector of PMeV, based on studies of the field spread pattern of papaya sticky disease (Abreu *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 1989). dsRNA viral and sticky disease symptoms presented six and eight months, respectively, after healthy papaya plants were exposed to PMeV-infected *Bemisia tabaci* type B (Vidal *et al.*, 2003), although the virus was not detected in this potential vector, which is not a papaya pest. Later, in another study, a whitefly species, *Trialeurodes variabilis*, was shown to be a pest to Brazilian papaya but was unable to transmit PMeV from diseased to healthy papayas, even though the virus was present in adults and nymphs (Rodrigues *et al.*, 2009).

Given the relevance of sticky disease to Mexican papaya crops and the importance of the crop itself, the aim of this research was to perform an extensive study to identify potential insect vectors of PMeV-Mx and demonstrate the transmission of the virus by these insects. Information derived from this work is essential for the development of effective management strategies to control sticky disease.

2.3. MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Insect's collection

Adult insects were collected on different dates at five different papaya orchards in south-southeast of Mexico. Collections were made from one experimental orchard located in San Jose Kuche, Yucatan (21.063659, -89.332828), from February to July 2015 and from four commercial orchards located in Temozon, Yucatan (20.9090197, -88.1895908); Tizimin, Yucatan (21.365876, -87.720415); Alfredo Bonfil, Campeche (19.5479081, -90.180298);

and Rancho El Rocio, Frontera Hidalgo, Tapachula, Chiapas (14.772763, -92.231419), from February to November 2016.

All collections were made using sweeping nets and mouth aspirators, and insects were collected from papaya plants and weeds around and between papaya plants. Samples were placed in 50-ml Falcon tubes with 70% ethanol and stored at 4°C until use. At the laboratory, insects were observed under a 4X stereoscope (Swift, China) and initially classified up to the family taxonomic level according to their morphology. From each morphologically different sample, three specimens were collected and sent to be identified taxonomically by specialists. Finally, the samples were counted to obtain abundance and frequency data.

2.3.2. Morphological and molecular identification of insects

Morphological identification of insects was carried out at the Entomology and Acarology Department, National Phytosanitary Reference Center of the National Service of Health, Safety, and Agri-Food Quality (SENASICA), Mexico.

For insect molecular identification, mitochondrial DNA (mtDNA) was extracted from single samples (replicated three times), with hexadecyltrimethyl ammonium bromide extraction buffer (CTAB, 2% with NaCl 5M), according to the protocol of Doyle and Doyle (1987) modified by SENASICA (2017). The quantity and quality of DNA were estimated using a NanoDrop 2000® spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). DNA integrity was analysed by electrophoresis in 0.8 % (w/v) agarose gels in 1X Tris–borate–EDTA buffer (TBE) and ethidium bromide staining. PCR amplifications were performed using universal primers based on genomic regions of the cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) gene, to amplify a 710-bp DNA fragment (LCO1490 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'; HC02198 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3') (Folmer *et al.*, 1994). The following cycling conditions were used: 1 min denaturation at 94°C; 4 cycles of 94°C for 30 s, 45°C for 90 s, and 72°C for 1 min; and 35 cycles of 94°C for 30 s, 51°C for 90 s, and 72°C for 10 min. PCR products were visualized by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gels in 1X TBE and ethidium bromide staining in order to detect the presence of target band. One or more RT-PCR products were purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

(Promega, Madison, USA) and were sequenced in both directions by Macrogen Inc, South Korea. Sequences obtained were analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) accessed via the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) website.

2.3.3. Screening of PMeV-Mx in insects by RT-qPCR and sequencing

Three individuals of each insect species collected were tested by RT-qPCR amplification for the presence of PMeV-Mx. Total RNA was extracted from insect samples according to the TRIzol® procedure (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and RNA quantity and quality were measured using a NanoDrop 2000® spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). RNA integrity was analysed by electrophoresis in 0.8 % (w/v) agarose gels in 1X TBE and ethidium bromide staining. RNAs were reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random primers according to the manufacturer's instructions. The concentration of each sample was adjusted to 20 ng/µl. The presence/absence of PMeV-Mx was determined by quantitative RT-PCR amplification (RT-qPCR). Primers, TaqMan probe, and cycling conditions were designed previously at GeMBio Laboratory (Garcia-Camara *et al.*, 2018). RT-qPCR was performed in a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK). RT-qPCR was conducted in 48-well reaction plates using 20 µl of reaction mix containing 10 µl of TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Warrington, UK), 0.4 µl of each of primer (each at 0.2 µM), 1.2 µl of TaqMan® probe (0.75 µM), 0.4 µl of Rox reference dye (500 nM) and 3 µl (20 ng/ml) of template cDNA of each sample. The thermal profile was set with initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30 s. RNA from PMeV-Mx-infected papaya (positive control), RNA from healthy plants (negative control) and a nontemplate control (NTC) were included in each experiment. All samples were tested in triplicate wells, and sample thresholds, baseline values, and reaction efficiency values, were calculated automatically in the StepOne™ Real-Time PCR System manager software (Applied Biosystems, Warrington, UK). Samples with a C_T value greater than 32 were considered negative. The actin gene was used as an internal control to verify the presence of intact RNA.

In addition, total RNA extracted from insect samples, as described above, was amplified with specific primers based on genomic regions of the PMeV-Mx RdRp gene, to obtain a

491-bp DNA fragment (NCBI Accession KF781635.1) (CB38 5' AGCGCATCTCGTTCTGCCA 3'; CB39 5' GCCCGGATATACCGGCCT 3') (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015). RNAs were reverse-transcribed as described previously. cDNA was amplified with *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), using the following cycling conditions: 5 min denaturation at 95°C, 40 cycles of 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min.; and a final extension at 72°C for 10 min. RT-PCR products were visualized by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gels in 1X TBE and ethidium bromide staining to detect the target band. RT-PCR products were purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) and were sequenced in both directions (Macrogen Inc., South Korea). Sequences obtained were analyzed using BLAST accessed via the NCBI website.

2.3.4. Emposca papayae colony establishment

Once the frequency and abundance of all PMeV-Mx-positive insect species collected were known, the species that would remain PMeV-Mx positive (with a high virus titer) and that was the most abundant in all papaya fields was selected for the transmission study. To establish a colony for the transmission test, 200 adult insects of *E. papayae* were collected from healthy field-papaya plants in a commercial orchard located in Muna (20.440599, -89.791291), Yucatan. Insects were placed inside insect-proof cages (70 cm wide × 70 cm long × 130 cm high) located inside a biosecurity greenhouse at the Yucatan Center for Scientific Research (CICY). Insects were maintained on healthy papaya cv. Maradol plants at ambient temperature (25 to 38 °C) with a photoperiod of 16 h of light. The purity of the insect colony was confirmed by determining the sequence of the cytochrome oxidase I mitochondrial gene, as previously described. To ensure an insect colony free of PMeV and phytoplasmas, nymphs and adults of the fifth generation descended from the original individuals collected were tested every 21 days for PMeV-Mx by RT-qPCR and phytoplasma by nested PCR.

2.3.5. Plant material and virus source

Papaya plants cv. Maradol grown from certificated seeds were used in all experiments. Sixty plants were grown in commercial substrate, placed inside a biosecurity greenhouse

at CICY, and maintained at ambient temperature (25 to 38 °C) with a photoperiod of 16 h of light. All plants were tested for PMeV by RT-qPCR and phytoplasma by nested PCR at 30, 60 and 90 days postgermination.

Latex samples of immature green fruits from sticky diseased papaya plants, located in San José Kuché, municipality of Conkal, Yucatan, Mexico, were obtained by wounding the fruit surfaces. To verify the PMeV presence in this latex, RNA was extracted as described by Tavares *et al.*, (2004), followed by electrophoresis in 1% (w/v) agarose gels in 1X TBE, searching for presence of PMeV dsRNA (9 kb) and PMeV2 ssRNA (4.5 kb) bands. In addition, RT-PCR was performed on this RNA using primers CB38 and CB39, which are specific to the PMeV-Mx RdRp gene (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015).

To obtain PMeV-Mx-infected papaya plants to be used as virus source in transmission tests, eight healthy 3-month-old papaya plants from greenhouse were inoculated with PMeV-Mx-infected latex. PMeV-Mx-infected latex was diluted 1:1 (v/v) in 1X phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. The plants were inoculated by injecting 20 µL of the diluted latex solution using a sterile syringe into the stem near the apex (Abreu *et al.*, 2012). These plants were placed inside an insect-proof cage (cage A).

2.3.6. Quantification of PMeV-Mx by RT-qPCR

The amount of PMeV-Mx-RNA in inoculated papaya plants was determined by RT-qPCR. Primers, TaqMan probe, and cycling conditions were designed previously at GeMBio Laboratory (Garcia-Camara *et al.*, 2018). Total RNA extraction, RNA quality and quantity assessment, and total RNA reverse-transcription were performed as described previously. To estimate the concentration (pg/µl) of PMeV-Mx-RNA, ten-fold serial dilutions of the Synthetic Positive Control Template for Standard Curve (Primer Design Ltd., Southampton, UK) were included in the RT-qPCR to obtain a standard curve. The standard curve template was an 86-bp fragment of the PMeV-Mx polymerase gene, and dilution concentrations were confirmed with a NanoDrop 2000® spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). For quantification, PMeV-Mx-RNA concentrations (pg/µl) were calculated based on the specific standard curve values generated in this reaction, which reproduced a linear relationship between the threshold cycle (C_T) value and the amount of total target concentrations in the samples. Real-time RT-PCR was

performed in a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK) in 48-well reaction plates, using 20 µl of reaction mix containing 10 µl of TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Warrington, UK), 0.4 µl each of primer (each at 0.2 µM), 1.2 µl of TaqMan® probe (0.75 µM), 0.4 µl of Rox reference dye (500 nM), and 3 µl (20 ng/ml) of template cDNA of each sample. The thermal profile was set with initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30 s. RNA from PMeV-Mx-infected papaya (positive control), RNA from papaya healthy plants (negative control) and a NTC were included in each experiment. All samples were tested in triplicate wells, and sample thresholds, baseline values and reaction efficiency values were calculated automatically in the StepOne™ Real-Time PCR System manager software (Applied Biosystems, Warrington, UK). Samples with a C_T value greater than 32 were considered negative. The actin gene was used as an internal control and to verify the presence of intact RNA.

2.3.7. PMeV transmission tests

PMeV-Mx-infected papaya plants at 14 days postinoculation (dpi) (from cage A), were used as viral sources. After a 24-h starvation period, two hundred adults from an *E. papayae* colony were placed inside cage A to be exposed to infected papaya plants for virus acquisition. When the optimal Acquisition Access Period (AAP) and Inoculation Access Period (IAP) are unknown (as in this case), long acquisition and inoculation times should provide maximum efficiency of transmission (Bosco and Tedeschi 2013). To determine the optimal AAP of PMeV-Mx by *E. papayae*, the amount of PMeV-Mx-RNA in these leafhoppers, was measured from 6 h after exposure to 14 days after exposure (dae) to PMeV-infected papaya plants, with intervals of 6 h in the first 24 h and then every 24 h thereafter. This analysis was performed by RT-qPCR under the conditions previously described.

Two more cages (cages B and C) were placed on either side of cage A (Figure 2.1A). Each of these cages contained six healthy papaya plants from greenhouse. All *C. papaya* cv. Maradol plants that were used as recipients for the transmission assays had been evaluated by RT-qPCR before being used to ensure that they were healthy. PMeV-Mx-viruliferous leafhoppers, confined inside cage A, were released to adjacent cages at five

dae to PMeV-infected papaya plants. Insect-proof meshes that separated cage A from cages B and C was removed, and leaves of PMeV-Mx-infected papaya plants were shaken, allowing the passage of viruliferous insects from infected to healthy plants located in the adjacent cages (Figure 2.1B).

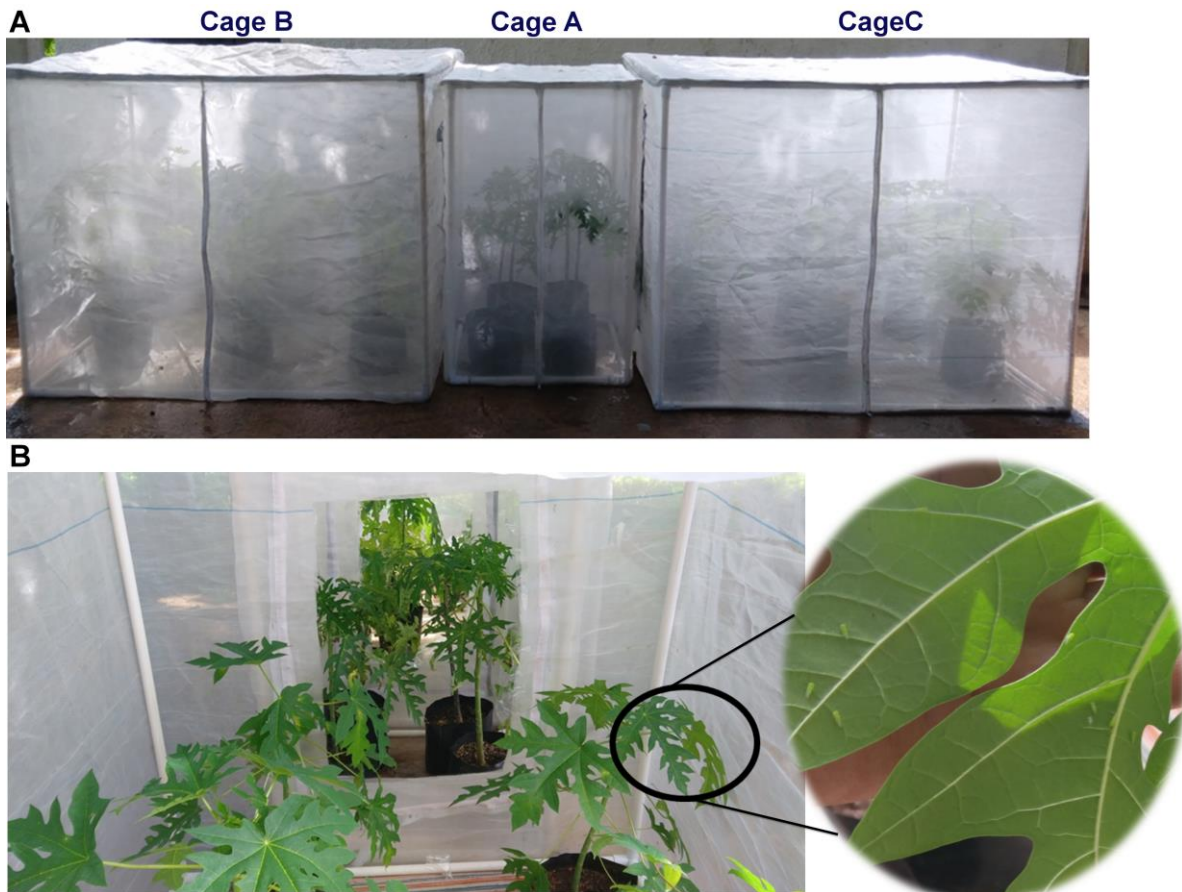


Figure 2.1 Transmission tests using cage-reared *E. papayae* adults. A, Insect-proof cages for transmission experiments (cage A with PMeV-Mx-infected papaya plants, cages B and C with healthy papaya plants). B, inside view of the insect-proof cages after removing the mesh between cages, and viruliferous leafhoppers on the leaves of healthy papaya plants.

Detection and quantification of PMeV-Mx was performed by RT-qPCR from new leaves of all healthy-receptor papaya plants at 7, 14, 21, 28, 35 and 60 dae, to confirm virus infection and the ability of *E. papayae* to transmit PMeV-Mx. Total RNA extraction, reverse-transcription and quantitative amplification was performed under conditions previously described. In addition, total RNA extracted from receptor papaya plants

samples, was amplified with specific primers based on genomic regions of the PMeV-Mx RdRp gen, as described previously (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015) and sequenced. Fourteen days after the release of insects in boxes B and C, plants were treated with imidacloprid (Confidor 200 SL; Bayer CropScience LP) to eliminate the insects, transferred to an insect-proof greenhouse, and observed for development of sticky disease symptoms. Experiments were replicated three times.

2.3.8. Acquisition of PMeV by *E. papaya* nymphs

To test for PMeV-Mx acquisition by nymphs, *E. papayae* adults reared on healthy papayas were isolated with PMeV-Mx-infected papaya plants in cages 70 cm x 70 cm x 130 cm for 15 days. Insect adults were removed, and plants were monitored for emergence of nymphs from hatching eggs. Following the development of insects, the 1st-5th instar nymphs from infected plants were collected for subsequent virus detection. The total RNA from the 1st-5th instar nymphs (five each instar) was extracted and reverse-transcribed, and nymphs were assayed by RT-qPCR to analyze PMeV-Mx acquisition.

2.4. RESULTS

2.4.1. Insect species diversity and abundance

In papaya cv. Maradol fields at different locations in the Yucatán Peninsula and Chiapas, 2795 adult insect samples were collected. Both morphological and molecular identification showed a high diversity, which included 31 genera belonging to the orders Araneae, Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Lepidoptera and Neuroptera (Table 2.1). The *Cicadellidae* family (Hemiptera) was the most diverse and abundant family. Fifteen different genera and/or species, of this family were identified, of which 12 (*Apogonalia* sp., *Coelidia* sp., *Draeculacephala soluta* Gibson, *Flexamia* sp., *Graphogonalia* sp., *Gypona* sp., *Homalodisca* sp. *Hortensia* sp., *Macrosteles* sp., *Ponana* sp., *Texananus* sp., and *Xyphon* sp.) were collected from both papaya plants and the weeds surroundings of the orchards; three genera and/or species (*Agalliopsis novella* Say, *Agallia constricta* Van Duzee, and *Empoasca papayae* Oman) were found only in papaya plant leaves (Figure 2.2 and Table

2.2). In all samplings, the most abundant species within the *Cicadellidae* family was *Empoasca papayae*.

Table 2.1 Taxonomic classification and response to PMeV-Mx detection of insects collected in papaya fields in 2015 and 2016.

Order	Family	Genera	Location	Host	Detection of PMeV-Mx by RT-qPCR
Araneae	--	--	A, B, C, D	<i>C. papaya</i>	-
Coleóptera	<i>Mordellidae</i>	<i>Mordella sp.</i>	A	Weeds	-
Coleóptera	<i>Mordellidae</i>	<i>Madarellus undulatus</i>	A	Weeds	-
Díptera	<i>Lauxaniidae</i>	--	A, B, C, D	Weeds	-
Hemíptera	<i>Coreidae</i>	<i>Amblypelta nitida</i>	A, B	<i>C. papaya</i>	-
Hemíptera	<i>Acanaloniidae</i>	<i>Acanalonia sp.</i>	A, C	Weeds	-
Hemíptera	<i>Aphididae</i>	<i>Aphis sp.</i>	A, B	Weeds	+
Hemíptera	<i>Aphididae</i>	<i>Uroleucon taraxaci</i>	A	Weeds	+
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Agallia constricta</i>	A, C	<i>C. papaya</i>	+
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Agalliopsis novella</i>	A, B, C	<i>C. papaya</i>	+
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Apogonalia sp.</i>	A, C	Weeds	-
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Balclutha abdominalis</i>	A	Weeds	-
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Coelidia sp.</i>	A, B	Weeds	-
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Draeculacephala soluta</i>	A, B, C	Weeds	+
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Empoasca papayae</i>	A, B, C, D, E	<i>C. papaya</i>	+
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Flexamia sp.</i>	A	Weeds	-
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Graphogonalia sp.</i>	A, B, C, D	Weeds	-
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Gypona sp.</i>	A	Weeds	-
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Homalodisca sp.</i>	A, B, C	Weeds	-
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Hortensia sp.</i>	A, B, C	Weeds	+
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Macrosteles sp.</i>	A	Weeds	-

Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Ponana sp.</i>	A	Weeds	-
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Texananus sp.</i>	A, B	Weeds	-
Hemíptera	<i>Cicadellidae</i>	<i>Xyphon sp.</i>	A, B, C	Weeds	+
Hemíptera	<i>Cixiidae</i>	<i>Oecleus sp.</i>	A	Weeds	-
Hemíptera	<i>Membracidae</i>	<i>Cyrtolobus sp.</i>	A	Weeds	-
Hemíptera	<i>Miridae</i>	<i>Reuteroscopus ornatus</i>	A, B, C, D	<i>C. papaya</i>	-
Hemíptera	<i>Miridae</i>	<i>Proba vittiscutis</i>	A, B, C, D	<i>C. papaya</i>	-
Hemíptera	<i>Psyllidae</i>	<i>Euphalerus sp.</i>	A, D	<i>C. papaya</i>	-
Lepidóptera	<i>Gelechiidae</i>	--	A, B, C, D	Weeds	-
Neuroptera	<i>Chrysopidae</i>	<i>Chrysoperla carnea</i>	C, D	<i>C. papaya</i>	-

A: Experimental papaya orchard in San José Kuché, Conkal, Yucatán (21.063659, -89.332828)

B: Commercial papaya orchard in Alfredo Bonfil, Campeche (19.5479081, -90.180298)

C: Commercial papaya orchard in Colonia Yucatán, Tizimín, Yucatán (21.365876, -87.720415)

D: Commercial papaya orchard in Temozón, Yucatán (20.9090197, -88.1895908)

E: Commercial papaya orchard in Rancho El Rocio, Frontera Hidalgo, Tapachula, Chiapas (14.772763, -92.231419)

Table 2.2 Abundance of insect species PMeV-Mx-positives by RT-qPCR, collected in papaya fields in 2015 and 2016

Genus/species	February		July		November	
	P	W	P	W	P	W
<i>Draeculacephala soluta</i>	3	19	0	23	3	15
<i>Hortensia spp.</i>	1	14	4	22	5	17
<i>Agalliopsis novella</i>	12	0	25	0	36	0
<i>Xyphon spp.</i>	1	15	3	19	2	28
<i>Agallia constricta</i>	32	0	34	0	15	0
<i>Empoasca papayae</i>	110	0	89	0	77	0
<i>Aphis spp.</i>	10	110	0	9	0	0

P: *Carica papaya* L.

W: different weeds species

2.4.2. Detection of PMeV-Mx in insect species

PMeV-Mx was detected in six (*Draeculacephala soluta*, *Agalliopsis novella*, *Xyphon* sp., *Hortensia* sp., *Agallia constricta* and *Empoasca papayae*) of the 15 species or genera of *Cicadellidae* (Figure 2.2) and in one genus and one species (*Aphis* sp., and *Uroleucon taraxaci*) of the *Aphididae* family. C_T values varied from 28 to 30, which means that these Hemipteran species are carriers of PMeV-Mx. In addition, a PCR product (491 bp) of each was sample sequenced, confirming the expected viral sequence, showing 97% identity with PMeV hypothetical protein and RdRp genes (KF214786.1).



Figure 2.2 Six of the 16 leafhopper genera/species (Hemiptera: Cicadellidae) found in papaya fields, positive to *Papaya meleira virus* (PMeV-Mx) by TaqMan® RT-qPCR. Dorsal view of: A, *Draeculacephala soluta* Gibson; B, *Agalliopsis novella* Say; C, *Xyphon* spp; D, *Hortensia* spp; E, *Agallia constricta* Van Duzee.; F, *Empoasca papayae* Oman.

2.4.3. Establishing *Empoasca papaya* populations

The insects used to establish the colony of *E. papayae* were identified morphologically at the National Phytosanitary Reference Center, SENASICA, Mexico, and five representative samples were deposited in that institution (deposit number CNRF-12.12-9). In addition, their sequences obtained by molecular identification were analyzed and deposited in GenBank (KY931021.1, KY931022.1, KY931023.1, KY931024.1). The *E. papayae* colony was successfully established in insect-proof cages, located inside a biosecurity greenhouse at CICY, using healthy plants of *C. papaya* cv. Maradol as host and under the conditions established in this study. The molecular diagnoses, made every 21 days, of samples of nymphs and adult insects of *E. papayae* were negative to PMeV-Mx (Figure 2.3A) and negative to phytoplasmas (Figure 2.3B).

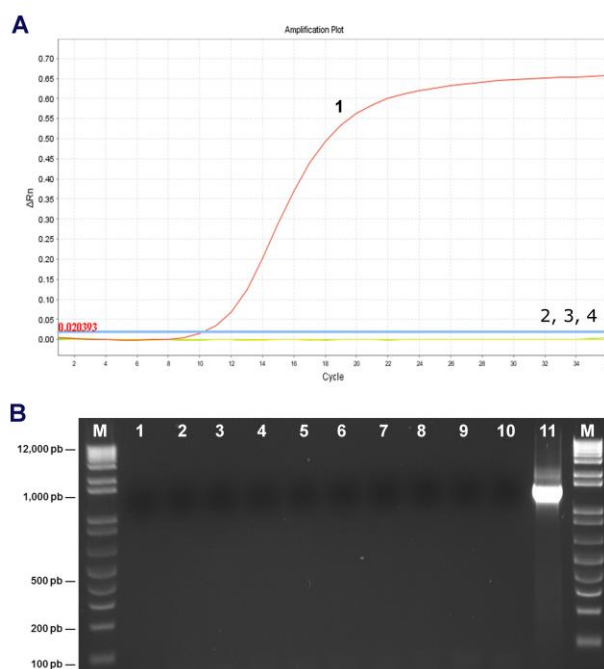


Figure 2.3 Uninfected *Empoasca papaya* colony. A, Amplification plot of TaqMan® RT-qPCR for detection and quantification of PMeV-Mx in nymphs and adults, 1: PMeV-Mx-infected papaya plant (positive control), 2: *E. papayae* nymphs, 3: *E. papayae* adults, 4: Nontemplate control (NTC). B, Nested PCR detection of phytoplasmas in nymphs and adults, Lane M: 100 bp DNA ladder, 1-4: *E. papayae* nymphs, 5-8: *E. papayae* adults, 9: Nontemplate control (NTC), 10: healthy papaya plant (negative control), 11: PMeV-Mx-infected papaya plant (positive control).

2.4.4. Transmission of PMeV-Mx by *Empoasca papayae*

When quantifying the viral titer by RT-qPCR in all papaya plants previously inoculated with PMeV-Mx and used as a source of virus acquisition, it was observed that 14 days after inoculation (at the beginning of the transmission test), the average viral titer was 9.15 pg/μl PMeV-Mx RNA.

On the other hand, when quantifying the viral titer of PMeV-Mx in the colony of *E. papayae* exposed to infected plants, it was found that *E. papayae* became a carrier of this virus 6 h after exposure, with an estimated value of 1.813 pg/μl PMeV-Mx RNA. The viral titer of PMeV-Mx in *E. papayae* increased with time, reaching a maximum titer at five dae, with an estimated value of 2.125 pg/μl of PMeV-Mx RNA (Figure 2.4A). However, PMeV-Mx was not detected in *E. papayae* nymphs (Figure 2.4B).

Once the transmission test was concluded, it could be proven that *E. papayae* transmitted the PMeV-Mx in 100% of the plants evaluated under the conditions established in the present study. PMeV-Mx was detected and quantified by RT-qPCR in the new leaves of all *C. papaya* plants from 14 days after insect liberation. The C_T values decreased in later evaluations (21, 28, 35 and 60 dae), indicating an increase in the viral titer of the plants exposed to insects carrying PMeV-Mx. C_T values were found within a range of 33 at 21 dae, down to 26 at 35 and 60 dae. The quantification of PMeV-Mx RNA in new leaves of *C. papaya* revealed estimated values of 0.06 pg/μl at 21 dae, up to 25.8 pg/μl at 35 dae and 26.6 pg/μl at 60 dae (Figure 2.5A), demonstrating that *E. papayae* is capable of transmitting PMeV-Mx with high efficiency.

The sequencing of a fragment of each sample confirmed that the PCR products (491 bp) corresponded to the expected viral sequence, showing a 98% similarity with the RpRd gene of PMeV-Mx (KF214786.1). No symptoms of papaya sticky disease were observed in papaya plants used as negative controls. Likewise, they were negative for PMeV-Mx by RT-qPCR in all experiments. All papaya plants exposed to viruliferous *E. papayae* adults developed sticky disease symptoms within 3-4 months after insect exposure (Figure 2.5B). These plants show exudation of translucent and watery latex and dark scab on diseased fruit surface caused by oxidized latex, the most distinct and typical symptoms produced by PMeV.

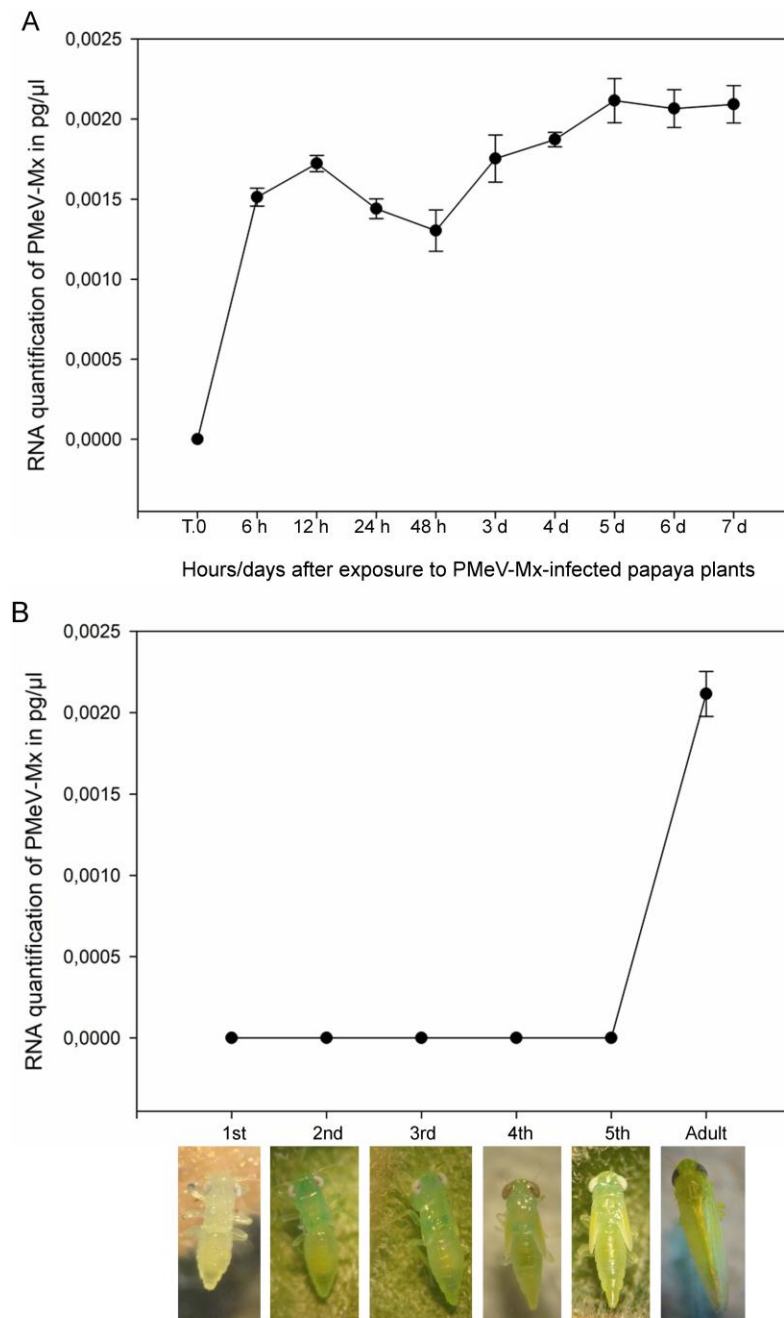


Figure 2.4 A, TaqMan® RT-qPCR of PMeV-Mx in *E. papayae* adults exposed to PMeV-Mx-infected papaya plants ($R^2 = 0.999$). All data shown are mean values (\pm standard error) of three replicates. B, TaqMan® RT-qPCR of PMeV-Mx in different nymph instars and adult of *E. papayae* exposed to PMeV-Mx-infected papaya plants ($R^2 = 0.999$). All data shown are mean values (\pm standard error) of three replicates.

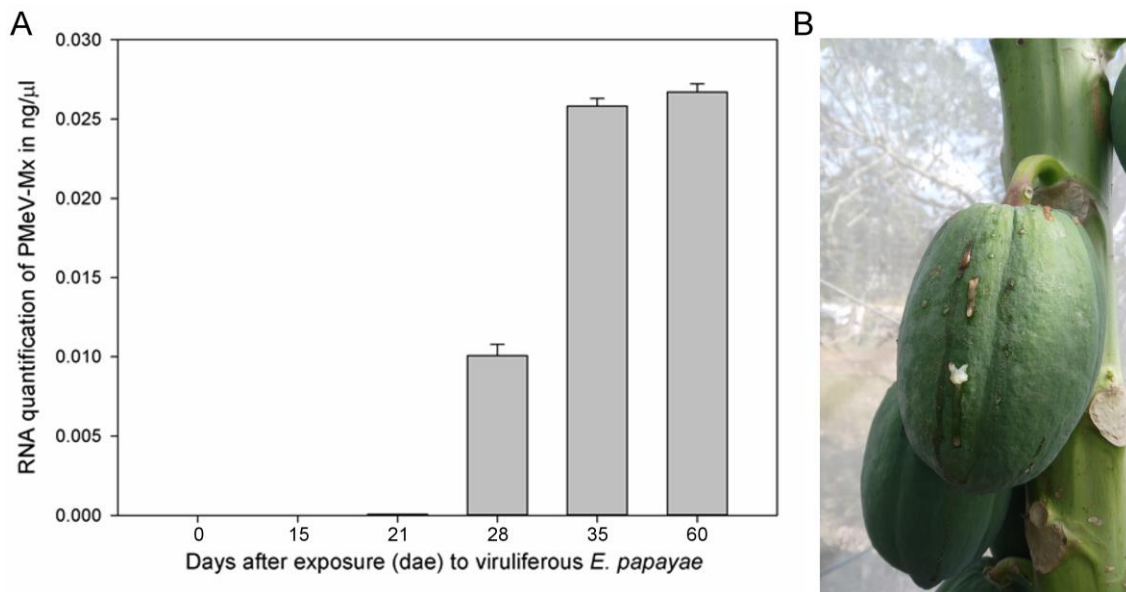


Figure 2.5 A, TaqMan® RT-qPCR of PMeV-Mx in *Carica papayae* L. cv. Maradol plants ($R^2 = 0.999$) exposed to viruliferous *E. papayae* adults. All data shown are mean values (\pm standard error) of three replicates. B, Sticky disease symptoms in papaya plants exposed to viruliferous *E. papayae*. All these papaya plants show exudation of translucent and watery latex 5 months after insect exposure.

2.5. DISCUSSION

Sticky disease is among the most important diseases of papaya crops in Brazil and Mexico. One of the main problems with this disease is that the causal agent disperses rapidly, reaching an incidence of up to 100%, when the sources of inoculum are not eliminated from the field (Abreu *et al.*, 2015; Ventura *et al.*, 2004). Studies on the field spread pattern of this disease, carried out in Brazil and Mexico, reveal an infected plant distribution that suggests the participation of an aerial vector in PMeV transmission (Abreu *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2009). In this work, we analyzed the diversity and abundance of insects present in experimental and commercial papaya orchards to find those predominant species that could be involved in the transmission of PMeV. The high diversity of insects found in papaya orchards includes at least 31 genera belonging to different orders such as *Amblypelta* spp., *Draeculacephala* spp., *Empoasca papayae*, *Hortensia* spp., *Aphis* spp., and *Chrysoperla carnea*, some of which have previously been

reported in papaya fields in other countries (Pantoja *et al.*, 2002; Acosta *et al.*, 2010; Saengyot and Burikam 2011).

Among all the genera species of insects collected in the five papaya orchards under study, those belonging to the leafhoppers family (Hemiptera: Cicadellidae) were the most abundant. This is important in terms of plant virus transmission because leafhoppers are vectors of at least 31 plant virus species (Ammar *et al.*, 2007; Hogenhout *et al.*, 2008; Nault 1997; Nault *et al.*, 1989; Todd *et al.*, 2010). In fact, the most economically important insect vectors are restricted to a few hemiptera families, such as *Aphididae* (aphids) and *Aleyrodidae* (whiteflies) of the suborder Sternorrhyncha; *Cicadellidae* (leafhoppers) of the suborder Cicadomorpha; and *Delphacidae* (delphacid planthoppers) of the suborder Fulgoromorpha (Hogenhout *et al.*, 2008). To our knowledge, there are no previous reports of the diversity and abundance of insects in papaya fields in Mexico, so this work contributes to new insights into insect species associated with papaya crops, which could be involved in the transmission of phytopathogens.

Plant virus and insect-vectors interactions are very specific; in most cases, the same type of vector transmits viruses of a given taxon (Ng and Falk 2006). For example, members of the genus Potyvirus are transmitted specifically and nonpersistently by aphids (Ng and Perry 2004), and Begomoviruses are transmitted specifically and persistently by whitefly species, mainly *Bemisia tabaci* (Power 2000). However, in the case of PMeV, it is not possible to analyze taxonomic relationships that allow us to suggest some aerial vector involved in its transmission because the International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) has not classified PMeV (Abreu *et al.*, 2015). In our study, we tested all species found in papaya orchards for PMeV-Mx presence by RT-qPCR. PMeV-Mx was detected in six leafhopper species or genera (*Draeculacephala soluta*, *Agalliopsis novella*, *Xyphon* spp., *Hortensia* spp., *Agallia constricta*, *Empoasca papayae*). PMeV-Mx was also detected in *Aphis* spp. However, this genus was found in high abundance only during February sampling. Previously, *Trialeurodes variabilis*, a whitefly species with high abundance in papaya fields in Brazil and considered a pest to Brazilian papaya and other fruit trees, was unable to transmit PMeV from diseased to healthy papayas, even though the virus was present in adults and nymphs (Rodrigues *et al.*, 2009). However, no whitefly species were found in the papaya orchards sampled in this study.

Empoasca papayae (Hemiptera: Cicadellidae) was the most abundant leafhopper species found in the papaya fields included in this study. This species has been found in papaya plantations in Puerto Rico, Santo Domingo, Haiti, Jamaica and Cuba, being the most abundant species of this crop (Martorell and Adsuar 1952).

E. papayae is able to produce damage from direct feeding, known as "hopperburn", characterized by tip-wilting, leaf chlorosis, premature leaves drop and plant stunting, usually caused by a reduction in stem elongation (Backus *et al.*, 2005). However, this leafhopper is considered a limiting factor in the production of papaya due to its vector capacity. *E. papayae* was reported as the simultaneous vector of the 16Srl-B and 16SrlI phytoplasmas and rickettsia associated with Bunchy top symptoms (BTS) in Cuba, where high population densities of *E. papayae* were associated with an increasing incidence of BTS in the same papaya field (Acosta *et al.*, 2010; Acosta *et al.*, 2017). One study reported *E. papayae* as the vector of *Papaya apical necrosis virus* (PANV). In that study, papaya plants showed symptoms after being exposed to viruliferous *E. papayae* adults. However, rhabdovirus particles were not found tissues that showed symptoms of disease (Lastra and Quintero 1981).

In the present study, this leafhopper showed a higher virus titer than did other insects tested for PMeV presence, so it was selected for PMeV transmission experiments. A colony of this leafhopper was established successfully in *C. papaya* cv. Maradol, under greenhouse conditions. Transmission experiments performed with infected *E. papayae* adults exposed to PMeV-infected papaya plants revealed high transmission efficiency by this leafhopper to healthy papaya plants. According to our results, *E. papayae* is the first identified vector involved in the transmission of PMeV and is capable of acquiring and transmitting this virus under our experimental conditions. All healthy papaya plants exposed to viruliferous *E. papayae* were positive to PMeV at 21 dae, with 100% transmission efficiency. However, the transmission efficiency of plant viruses transmitted by leafhoppers is not always high. For *maize streak virus* (MSV) transmitted by *Cicadulina mbila*, this efficiency ranged between 40 and 45% (Bosque-Pérez and Buddenhagen 1999); and in another study, it reached up to 90% (Reynaud and Peterschmitt 1992). Meanwhile for *maize rayado fino virus* (MRFV) transmitted by *Dalbulus maidis*, the transmission efficiency was 70% (Nault, *et al.*, 1980). There are some reports of

transmission efficiencies as high as those obtained in this study. For example, in an experiment using ten *Circulifer tenellus* leafhoppers per plant, the transmission efficiency of beet curly top virus (BCTV) to sugar beet was 100% (Wang *et al.*, 1999). In another study, the leafhopper vector *Psammotettix alienus* transmitted wheat dwarf virus (WDV) to wheat and barley hosts with a 100% infection rate (Parizipour *et al.*, 2016).

Quantification of PMeV in *E. papayae* by RT-qPCR showed that this leafhopper is able to acquire the virus within 6 h after exposure to PMeV-infected plants. Acquisition threshold times in leafhopper vectors are very different and vary from a few seconds to several hours. For example, the field vector *Graminella nigrifrons* can acquire *maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) from infected plants or can inoculate healthy plants in 15 min, whereas *Nephotettix virescens* requires 30 min to acquire or inoculate *rice tungro bacilliform virus* (RTBV). On the other hand, vectors such as *Graminella sonora*, *Laodelphax striatellus* and *Recilia dorsalis* required 6, 5 and 8 h respectively for *sorghum stunt mosaic rhabdovirus* (SSMV) (Creamer *et al.*, 1997), *barley yellow striate mosaic virus* (BYMV) (Conti 1980), and *rice gall dwarf virus* (RGDV) acquisition (Morinaka *et al.*, 1982). However, longer AAPs and IAPs increase transmission efficiency because, for circulative and propagative viruses, longer latent periods are needed before leafhoppers become inoculative because the ingested virus requires incorporation into salivary secretions (Nault and Ammar 1989).

In this study, the viral titre of *E. papayae* was increased up to 5 days, after which it was maintained, and it was at that time when the transmission experiment was initiated and under these conditions that the transmission efficiency was 100%.

It has been shown that the leafhopper *Cicadulina mbila* vector of MSV, has low transmission efficiency on the first day after virus acquisition from MSV-infected plants, whereas 17 days after acquisition, a 90% transmission efficiency could be obtained (Reynaud and Peterschmitt 1992). This may be due to the rapid circulation of the viral particles through the filter chamber within the vector's body (a few minutes after AAP) and to the long retention period of the virions within the leafhopper vector (Wang *et al.*, 2014). Similar studies are required to clarify the interactions between PMeV-Mx and *E. papayae*, which allow us to understand their specific interactions and could explain part of sticky disease epidemiology and complement the control strategies. It is necessary to evaluate

shorter AAPs and retention of the virus in the vector's body to determine the possible type of transmission. For example, analysis of the temporal characteristics of *banana bunchy top virus* (BBTV) acquisition, inoculation, and retention on the vector body suggest that *Pentalonia nigronervosa* transmits this virus in a circulative manner (Franz *et al.*, 1998).

Vector life stage is an important factor in the transmission of many insect-borne plant viruses, and usually, transmission efficiency is higher when vectors acquire a virus as nymphs rather than as adults, with nymphs being generally more susceptible to infection than adults (Todd *et al.*, 2010). For example, *Graminella nigrifrons* nymphs acquire *maize fine streak virus* (MFSV) at higher titers than do adults, although differences in titer do not translate directly into differences in inoculativity (Todd *et al.*, 2010). In contrast, *Recilia dorsalis* nymphs have higher *rice stripe mosaic virus* (RSMV) acquisition and inoculation rates than do adults (Yang *et al.*, 2017). However, PMeV was not detected in any of different instar stages of *E. papayae*, showing that *E. papayae* nymphs are incapable of acquiring this virus.

The epidemiology of vector-borne plant viruses is directly dependent on the biology of the vector species, including host range and feeding preferences (Cvrković *et al.*, 2014; Pu *et al.*, 2012). Unfortunately, the biology, host plant associations, and feeding preferences of *E. papayae* are not well documented. To the date, all findings suggest that this leafhopper is a monophagous species that, until now, has not been reported in any species other than *C. papaya*. In fact, *E. papayae* is commonly known as "papaya leafhopper" because it is its only known host (Nielson 1968).

In contrast, other species of the *Empoasca* genus have different plant associations; for example, *E. decipiens* is extremely polyphagous and has been reported in different crops, representing a pest for beans, potatoes, cotton and sesame (Galletto *et al.*, 2011). In the case of *E. fabae*, this vector has been recognized as an important pest in many crops in the USA, being able to reproduce in more than 200 plant species belonging to 25 families (Shields and Testa 1999). Therefore, there is still much left to study regarding the biology of *E. papayae*.

The epidemiology of plant viruses is multifaceted and very diverse, involving a tripartite pathosystem in which each component (virus, vector and host) interacts with the

environment (Jones 2014). Different environmental parameters (temperature, precipitation, atmospheric pressure, light intensity, daylength, relative humidity, precipitation, and wind) determine the behavior of viruses and their vectors and, consequently, the transmission efficiency and the rapid dispersion and incidence of viral diseases in the field (Gingery *et al.*, 2004; Jones 2014). For example, transmission rates of MCDV by *Graminella nigrifrons* decreased at lower light levels, lower temperatures, and shorter days, and this situation may explain why MCDV transmission rates are reduced in winter (Gingery *et al.*, 2004). Studies of the biology of *E. papayae* are required. Knowing the population dynamics of the vector species, the propagation pattern of the virus, the vector host range (annual or perennial plant species), the mode of transmission of the virus (persistent or nonpersistent), and whether the vector is colonizing permits the implementation of phytosanitary management strategies. All this knowledge can define, for example, when to apply insecticides or the natural enemies of that species and how they can be used, among others approaches.

The present study demonstrated the ability of *Empoasca papayae* Oman (Hemiptera: Cicadellidae) to acquire and transmits PMeV-Mx to *Carica papaya*. cv. Maradol. Transmission tests reveal a high efficiency in the transmission of this virus by adult insects of this vector to healthy papaya plants under established experimental conditions. PMeV-Mx was detected and quantified in all papaya plants exposed to *E. papayae* adults that carried this virus beginning 21 dae to diseased plants. This is the first report of PMeV-Mx transmission by an aerial vector. These results are the beginning of understanding PMeV-vector-papaya interactions. Increasing our knowledge about the cycle and epidemiology of sticky disease will be very useful for the development of disease control strategies. However, several studies are needed to clarify the transmission characteristics of PMeV by *E. papayae* to papaya plants, including type of transmission, persistence of the virus within the vector, and effect of the environmental conditions on transmission efficiency, and thus promote the development and implementation of effective strategies for the management of this disease.

2.6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thanks to MSc. Héctor Enrique Vega Ortiz (Head of Entomology and Acarology Department, National Phytosanitary Reference Center, SENASICA, Mexico) for the morphological identification of all insects studied in this work.

Acknowledgments also go to Máximo Paredes Rodríguez (Head of Rural Development and Commercialization Department) of Rural Development Secretariat of Yucatan (SEDER), for the support for insect samplings in papaya orchards. In addition, the authors want to thanks to Fernando Amilcar Contreras (Yucatan Center for Scientific Research, CICY) for his technical assistance in maintenance in greenhouse of papaya plants used in this study.

CAPÍTULO 3. MOLECULAR AND EXPERIMENTAL EVIDENCE OF OCCURRENCE OF MEXICAN VARIANT OF PAPAYA MELEIRA VIRUS IN COMMON WEED SPECIES IN PAPAYA ORCHARDS IN MEXICO

I. García-Cámara^{1, 2}, D. Pérez-Brito¹, R. Tapia-Tussell³, A. Magaña-Alvarez¹, P. Machado Bueno Fernandes⁴, O. Moreno-Valenzuela^{2*}

¹Laboratorio GeMBio, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 # 130, x 32 and 34, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán 97205, México.

²Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 #130, x 32 and 34, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán 97205, México.

³Unidad de Energía Renovable, Centro de Investigación Científica de Yucatán AC, Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto, Km 5, Sierra Papacal, CP 97302, Mérida, Yucatán, México.

⁴Núcleo de Biotecnología, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória 29040090, Espírito Santo, Brazil.

* **Author for correspondence:** O. Moreno-Valenzuela oamv@cicy.mx

Running Head: PMeV-Mx in common weeds

3.1. ABSTRACT

Papaya sticky disease (PSD) or “meleira”, caused by *Papaya meleira virus* (PMeV), is one of the most damaging diseases of this crop, with important losses in papaya orchards in Brazil and Mexico. To date, little is known about PSD epidemiology. The identification of alternative hosts of this virus, which can act as reservoirs and primary sources of infection, is important for the development of effective management practices. In this regard, 38 common weed species belonging to 15 different plant families present in papaya-growing areas were evaluated by reverse transcription-PCR (RT-PCR) amplification. Amplicons (491 bp) of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene of Mexican variant of PMeV (PMeV-Mx) were detected in eleven different species of three different plant families. To confirm their susceptibility to PMeV-Mx, *Dactyloctenium aegyptium*, *Panicum hirsutum* (*Poaceae*), and *Ruellia nudiflora* (*Acanthaceae*) plants were inoculated with latex from papayas infected with PMeV-Mx, and infection was confirmed by RT-PCR and quantitative RT-PCR (RT-qPCR). Quantification of PMeV-Mx-RNA by RT-qPCR in *P. hirsutum* and *R. nudiflora* showed an increase in viral load over time (from 0.788 pg/μl to 2.220 pg/μl and 0.560 pg/μl to 1.140 pg/μl, respectively), 7 to 21 days post-inoculation (dpi), showing that these plant species are alternative hosts of PMeV-Mx. To the best of our knowledge, this is the first reference of these species as natural hosts of PMeV-Mx and should be considered potential reservoirs of this virus, since they grow along the margins of papaya fields.

Keywords: *Papaya meleira virus*; papaya sticky disease; *Carica papaya*; RT-qPCR; TaqMan

3.2. INTRODUCTION

Papaya sticky disease (PSD), or “meleira”, is one of the most serious diseases of papaya (*Carica papaya* L.) and is capable of spreading rapidly and causing complete crop loss. PSD was first reported in Brazil (Rodrigues *et al.*, 1989) and twenty years later in Mexico (Perez-Brito *et al.*, 2012). Initially, PMeV (causal agent of PSD) was described as an isometric virus with a double-stranded RNA (dsRNA) genome of approximately 12,000 base pairs (bp) (Kitajima *et al.*, 1993; Maciel-Zambolim *et al.*, 2003). These features were also observed in Mexico when PSD was first reported (Perez-Brito *et al.*, 2012) but were associated with a 4.5 kb band in nucleic acid electrophoresis in PMeV detection (Garcia-Camara *et al.*, 2017).

In Brazil, it was recently found that PSD arises from an association between PMeV, a dsRNA virus related to *Totiviridae*, and PMeV2, a virus with a ssRNA genome related to the genus *Umbravirus* (Antunes *et al.*, 2016). Meanwhile, the Mexican variant of PMeV (PMeV-Mx) (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015) has a 1154-bp partial sequence encoding a putative RdRp, which shows closer similarity (79%) with RdRp of *Papaya virus* Q found in Ecuador (Quito-Avila *et al.*, 2015) and a 71% similarity with RdRp of PMeV2 (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015; Antunes *et al.*, 2016).

PSD causes a spontaneous exudation of aqueous and translucent latex in the infected papayas, resulting in a sticky fruit surface, and after ambient exposure, the latex oxidizes, which renders the fruit unacceptable for commercial consumption, as the disease compromises their texture and flavor (Ventura *et al.*, 2004; Abreu *et al.*, 2015). Other symptoms, observed in Mexico, are nodules of latex in the fruit flesh and latex within the fruit cavity, covering the seeds (Tapia-Tussell *et al.*, 2015).

In infected orchards, where roughing diseased plants was not carried out, incidence of the disease reached 100%, causing total yield losses (Abreu *et al.*, 2015). Agricultural practices, mainly fruit harvest, are responsible for the spread of the disease within the orchard because the dispersion of the PSD often occurs along the array of the crop row (Ventura *et al.*, 2004; Abreu *et al.*, 2015). The possible involvement of insects as sticky disease vectors has been considered, based on some studies of the field-spread pattern of the disease, and there is evidence of an aerial vector associated with the disease

(Rodrigues *et al.*, 1989; Vidal *et al.*, 2004). The virus transmission by papaya seeds was also demonstrated in the cv. Maradol (Tapia-Tussell *et al.*, 2015). Currently, research teams in Brazil and Mexico are undertaking research to identify the virus vector and elucidate the mechanism of transmission (Abreu *et al.*, 2015).

Another important aspect in plant disease epidemiology is alternative hosts. In a study conducted in Brazil, species belonging to different families of plants that grew in papaya orchards affected by PSD were assessed for PMeV infection, and a viral dsRNA, with a molecular weight similar to that of PMeV, was detected in *Brachiaria decumbens* (*Poaceae*) (Maciel-Zambolin *et al.*, 2003). Recently, molecular and experimental evidence demonstrate that watermelon (*Citrullus lanatus*) is an alternative host for PMeV-Mx. Quantification of PMeV-Mx RNA in axillary leaves of watermelon seedlings show that PMeV can replicate and move within this host (García-Cámara *et al.*, 2017).

The identification of alternative hosts for the virus, which could be the source of infection, is important for determining factors that influence viral epidemiology and control strategies. In this research, we evaluate the occurrence and infection capacity of PMeV-Mx for common weed species found in papaya-growing areas using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) to detect PMeV-Mx infection and determine the virus load, obtaining a more thorough understanding of PMeV-Mx accumulation in these weed species.

3.3. MATERIALS AND METHODS

3.3.1. Plant material survey

Surveys of common weed plant species were carried out in June 2015 and July 2016 across a papaya-growing area, on the edges and between papaya plants, in an experimental papaya orchard in San José Kuché, municipality of Conkal, in the State of Yucatan, as well as in a commercial orchard in Alfredo Bonfil, in the State of Campeche, both in Mexico. All plants were identified by a botanical expert, and voucher specimens were deposited in the herbarium “U Najil Tikin Xiw” of Natural Resources Unit, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY). Samples were stored at -80°C until use.

3.3.2. Detection of PMeV-Mx by RT-PCR

Leaf samples of all weed species collected were tested for the presence of PMeV-Mx by RT-PCR amplification, using specific primers based on genomic regions of the PMeV-Mx RNA-dependent RNA polymerase gene to amplify a 491-bp DNA fragment (NCBI Accession KF781635.1) (CB38 5' AGCGCATCTCGTTCTGCCA 3'; CB39 5' GCCCGGATATACCGGCCT 3') (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015). Total RNA was extracted from leaf samples according to TRIzol® procedure (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and extracts were reverse-transcribed using M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random primers according to the manufacturer's instructions. cDNA was amplified with *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For this amplification, the following cycling conditions were used: 5 min. denaturation at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 1 min., 60°C for 1 min., and 72°C for 1 min., with a final extension at 72°C for 10 min. RT-PCR products were visualized by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gels in 1x Tris–borate–EDTA buffer (TBE) and ethidium bromide staining in order to detect the presence or absence of the target band. One or more RT-PCR products were purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) and were sequenced in both directions (Macrogen®). Sequences obtained were analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) accessed via the National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.3.3. Infectivity test

After confirmation of natural infections, the species that reached the highest titers of PMeV-Mx; *Dactyloctenium aegyptium*, *Panicum hirsutum* and *Ruellia nudiflora* were tested to corroborate their susceptibility to PMeV-Mx under experimental conditions through an infectivity test. Nine plants of each weed species were collected around Merida in Yucatan, Mexico. All plants were transplanted into black bags containing a commercial substrate and maintained under greenhouse conditions. Latex samples of immature green fruits from PMeV-diseased papaya plants located in San José Kuché, municipality of Conkal in Yucatan, Mexico were obtained by wounding the fruit surfaces. To verify the PMeV presence in this latex, RNA was extracted as described by Tavares *et al.*, (2004), followed

by electrophoresis in 1% (w/v) agarose gels in 1X TBE, searching for presence of PMeV dsRNA (9 kb) and PMeV2 ssRNA (4.5 kb) bands. RT-PCR was performed on this RNA using primers CB38 and CB39, which are specific to the PMeV-Mx RNA-dependent RNA polymerase gene (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015). PMeV-infected latex was diluted 1:1 (v/v) in 1X phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. Weed plants were inoculated by injecting 20 μ l of the diluted latex solution, using a sterile syringe, into the stem near the apex (Abreu *et al.*, 2012). Controls for the infectivity test included one set of plants of each species, inoculated with latex from healthy fruit diluted 1:1 (v/v) in 1X PBS, and another set inoculated with 1X PBS alone. Both were used as a negative control for RT-PCR. All plants were evaluated for the appearance of symptoms, and their axillary leaves were sampled for RT-PCR at 7, 14, 21 and 28 days post-inoculation (dpi) to further confirm the PMeV infection. This experiment was repeated three times.

3.3.4. Quantification of PMeV-Mx by RT-qPCR

The amount of PMeV-Mx-RNA was determined by quantitative RT-PCR amplification (RT-qPCR). Primers, *TaqMan* probe, and cycling conditions were designed previously in the GeMBio Laboratory (Garcia-Camara *et al.*, 2017). Total RNA was extracted from axillary leaves of *P. hirsutum* and *R. nudiflora* inoculated plants according to the TRIzol® procedure (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA quality and quantity were determined using a NanoDrop 2000® spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Total RNA extracts were reverse-transcribed using M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random primers, according to the manufacturer's instructions, and the concentration of each sample was adjusted to 20 ng/ μ l. To estimate the concentration (pg/ μ l) of PMeV-Mx-RNA, ten-fold serial dilutions of the Synthetic Positive Control Template for Standard Curve (Primer Design Ltd., Southampton, UK) were included in the RT-qPCR to obtain a standard curve. The standard curve template was an 86-bp fragment of the PMeV-Mx polymerase gene, and dilution concentrations were confirmed with a NanoDrop 2000® spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). For quantification, concentrations (pg/ μ l) of PMeV-Mx-RNA were calculated based on the specific standard curve values generated in the reaction, which reproduced a linear relationship between the threshold cycle (C_T) value and the amount of total target

concentrations in the samples. Real-time RT-PCR was performed in a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK). Real-time RT-qPCR was conducted in 48-well reaction plates using 20 µl of reaction mix containing 10 µl of TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Warrington, UK), 0.4 µl each of primer (each at 0.2 µM), 1.2 µl of TaqMan® probe (0.75 µM), 0.4 µl of Rox reference dye (500 nM) and 3 µl (20 ng/ml) of template cDNA of each sample. The thermal profile was set with initial denaturation at 95°C for 5 min., followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30 s. RNA from PMeV-Mx-infected papaya (positive control), RNA from healthy plants (negative control) and a non-template control (NTC) were included in each experiment. All samples were tested in triplicate wells, and sample thresholds, baseline values and reaction efficiency values were calculated automatically in the StepOne™ Real-Time PCR System manager software (Applied Biosystems, Warrington, UK). Samples with a C_T value greater than 38 were considered negative. The actin gene was used as an internal control and to verify the presence of intact RNA.

3.4. RESULTS

3.4.1. Detection of PMeV-Mx in weed species under natural conditions

For PMeV-Mx, the expected amplicon (491 bp) of the RdRp gene was detected in 11 of the 38 weed species sampled on the edges and between papaya fields (Figure 3.1). These species positive to PMeV belong to families *Acanthaceae*, *Fabaceae* and *Poaceae* (Table 3.1). In all cases, this PCR product of each sample was purified and sequenced, and they were confirmed as the expected viral sequence, showing 98-99% identity with the PMeV-Mx RdRp gene (KF214786.1). PMeV-Mx was detected in *P. hirsutum* at 7 dpi, and C_T values decreased in time (from 36 at 7 dpi to 33 at 28 dpi), indicating increased viral load (from 0.788 pg/µl at 7 dpi to 5.54 pg/µl at 28 dpi) (Table 3.2, Figure 3.3), suggesting that this virus is capable of replicating itself in the plant cells and spreading in a systemic way. On the other hand, it was found that the amount of PMeV-Mx-RNA in *R. nudiflora* showed a different dynamic. C_T values ranged from 37 at 7 dpi to 36 at the 21 dpi, with estimated amounts of PMeV-Mx-RNA ranging from 0.560 pg/µl at 7 dpi to 1.140 pg/µl at 21 dpi. However, the C_T values increases again to 37 at 28 dpi, with a decrease in the quantity of PMeV-Mx-RNA to 0.580 pg/µl (Table 3.2, Figure 3.3).

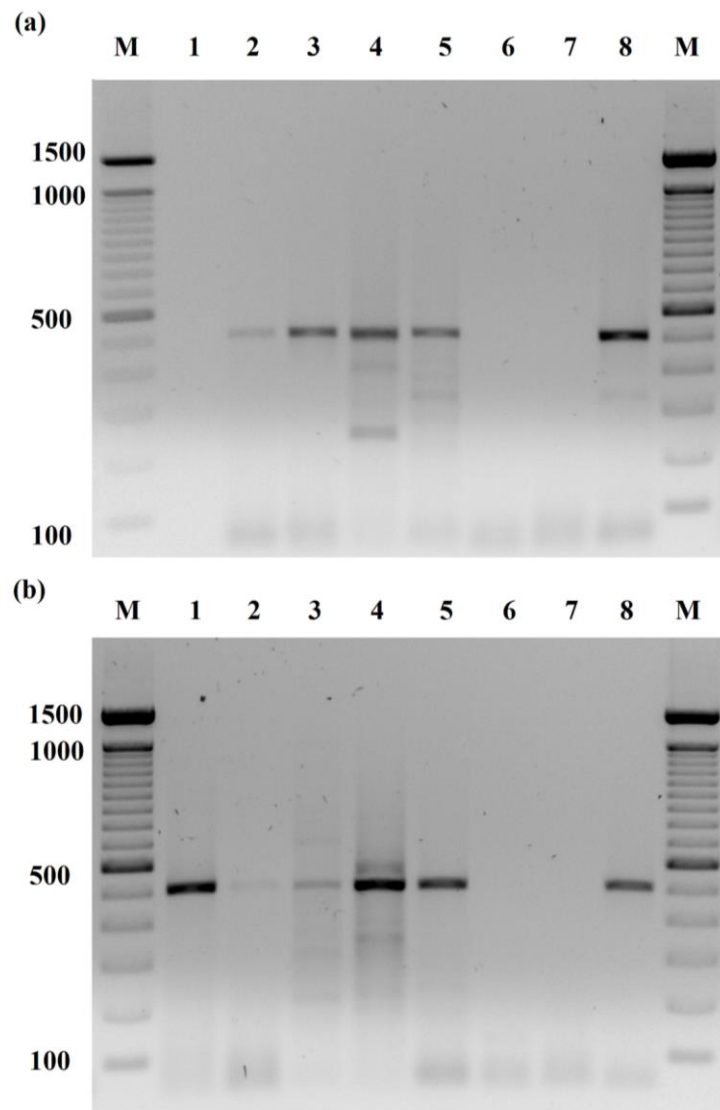


Figure 3.1 RT-PCR detection of PMeV-Mx in weed plants collected at Alfredo Bonfil orchard in Campeche, Mexico in different years. (a) Sampling conducted in June 2015. Lane M: 100 bp DNA ladder; lane 1: *Echinochloa colona*; lane 2: *Panicum hirticaule*; lane 3: *Panicum hirsutum*; lane 4: *Pasapalum virgatum*; lane 5: *Dactyloctenium aegyptium*; lane 6: non-targeting control (NTC); lane 7: Healthy papaya plant (negative control); lane 8: PMeV-infected papaya plant (positive control). (b) Sampling conducted in June 2016. M: 100 bp DNA ladder; lane 1: *Echinochloa colona*; lane 2: *Panicum hirticaule*; lane 3: *Panicum hirsutum*; lane 4: *Pasapalum virgatum*; lane 5: *Dactyloctenium aegyptium*; lane 6: non-targeting control (NTC); lane 7: Healthy papaya plant (negative control); lane 8: PMeV-infected papaya plant (positive control).

Table 3.1 List of host and non-host weed species of Mexican variant *Papaya meleira virus* (PMeV-Mx) sampled in papaya crops.

Plant species	Family	Accession number*	Life cycle	Natural infection with PMeV-Mx
<i>Ruellia nudiflora</i> (Engelm. y A. Gray) Urb	<i>Acanthaceae</i>	I. García 020	Perennial	Yes
<i>Melampodium gracile</i> Less.	<i>Asteraceae</i>	I. García 021	Annual	No
<i>Tridax procumbens</i> L.	<i>Asteraceae</i>	I. García 022	Annual	No
<i>Viguiera dentata</i> var. <i>helianthoides</i> (Kunth) S.F. Blake	<i>Asteraceae</i>	I. García 023	Annual	No
<i>Commelina erecta</i> L.	<i>Commelinaceae</i>	I. García 025	Perennial	No
<i>Evolvulus alsinoides</i> (L.) L.	<i>Convolvulaceae</i>	I. García 026	Annual	No
<i>Ipomea triloba</i> L.	<i>Convolvulaceae</i>	I. García 033	Annual	No
<i>Merremia aegyptia</i>	<i>Convolvulaceae</i>	I. García 024	Annual	No
<i>Dioscorea</i> sp.	<i>Dioscoreaceae</i>	I. García 038	Perennial	No
<i>Acalypha alopecuroides</i> Jacq.	<i>Euphorbiaceae</i>	I. García 028	Annual	No
<i>Acalypha</i> sp.	<i>Euphorbiaceae</i>	I. García 027	Annual	No
<i>Euphorbia hypericifolia</i> L.	<i>Euphorbiaceae</i>	I. García 031	Annual	No
<i>Desmodium incanum</i> DC.	<i>Fabaceae</i>	I. García 032	Perennial	Yes
<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	<i>Fabaceae</i>	I. García 029	Perennial	No
<i>Piscidia piscipula</i> (L.) Sarg.	<i>Fabaceae</i>	I. García 030	Perennial	No
<i>Corchorus siliquosus</i> L.	<i>Malvaceae</i>	I. García 037	Annual	No
<i>Sida acuta</i> Burm. f.	<i>Malvaceae</i>	I. García 035	Annual	No
<i>Andropogon</i> sp.	<i>Poaceae</i>	I. García 016	Annual	No
<i>Bothriochloa pertusa</i> (L.) A. Camus	<i>Poaceae</i>	I. García 011	Annual	No
<i>Chloris ciliata</i> Sw.	<i>Poaceae</i>	I. García 012	Annual	No
<i>Dactyloctenium aegyptium</i> (L.) Willd	<i>Poaceae</i>	I. García 003	Annual	Yes
<i>Digitaria bicornis</i> (Lam.) Roem. y Schult.	<i>Poaceae</i>	I. García 004	Annual	No
<i>Echinochloa colona</i> (L.) Link	<i>Poaceae</i>	I. García 001	Annual	Yes
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	<i>Poaceae</i>	I. García 002	Annual	Yes

<i>Elytraria imbricata</i> (Vahl) Pers.	Poaceae	I. García 019	Annual	Yes
<i>Panicum hirsutum</i> Sw.	Poaceae	I. García 005	Annual	Yes
<i>Panicum hirticaule</i> Presl.	Poaceae	I. García 006	Annual	Yes
<i>Paspalum virgatum</i> L.	Poaceae	I. García 007	Annual	Yes
<i>Rhynchelytrum repens</i> (Willd.) C.E. Hubb.	Poaceae	I. García 008	Annual	No
<i>Setariopsis auriculata</i> (Fourn.) Scribn.	Poaceae	I. García 009	Annual	No
<i>Sporobolus buckleyi</i> Vasey	Poaceae	I. García 010	Annual	No
<i>Urochloa fusca</i> (Sw.) B.F. Hansen y Wunderlin	Poaceae	I. García 015	Annual	Yes
<i>Urochloa reptans</i> L.	Poaceae	I. García 014	Annual	Yes
<i>Gymnopodium floribundum</i> Rolfe	Polygonaceae	I. García 036	Perennial	No
<i>Neomillspaughia emarginata</i> (Gross) Blake	Polygonaceae	I. García 039	Perennial	No
<i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Meyer	Rubiaceae	I. García 034	Annual	No
<i>Morinda yucatanensis</i> Greenm.	Rubiaceae	I. García 041	Perennial	No
<i>Capraria biflora</i> L.	Scrophulariaceae	I. García 040	Biennial	No

* Voucher specimens deposited in herbarium "U Najil Tikin Xiw" of Natural Resources Unit, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

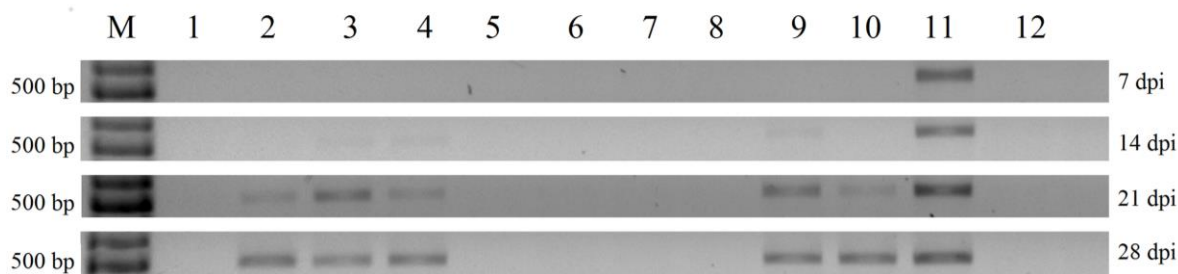


Figure 3.2 RT-PCR detection of PMeV-Mx in inoculated weed plants at 0 (top gel), 14 (middle gel), 21 (middle gel) and 28 (bottom gel) days post inoculation (dpi). Lane M: 100 bp DNA ladder; lane 1: *P. hirsutum* inoculated with healthy latex (negative control); lanes 2-4: *P. hirsutum* PMeV-Mx-inoculated; lane 5: *D. aegyptium* inoculated with healthy latex (negative control); lanes 6-7: *D. aegyptium* PMeV-Mx-inoculated; lane 8: *R. nudiflora* inoculated with healthy latex (negative control); lanes 9-10: *R. nudiflora* PMeV-Mx-inoculated; lane 11: PMeV-infected papaya plant (positive control); lane 12: Non-template control (NTC).

Table 3.2 Viral load of PMeV-Mx in *Panicum hirsutum* and *Ruellia nudiflora* inoculated plants by TaqMan®PCR quantitation.

Days postinoculation (dpi)	<i>Ruellia nudiflora</i>		<i>Panicum hirsutum</i>	
	$C_T \pm \text{Std. dev.}^a$	Viral load (pg/ μl) ^b	$C_T \pm \text{Std. dev.}^a$	Viral load (pg/ μl) ^b
7	37.11 \pm 0.43	0.560 \pm 0.10	36.62 \pm 0.68	0.780 \pm 0.20
14	38.09 \pm 1.22	0.360 \pm 0.30	36.92 \pm 0.84	0.670 \pm 0.30
21	36.02 \pm 0.88	1.140 \pm 0.50	34.92 \pm 0.32	2.220 \pm 0.40
28	37.07 \pm 0.49	0.580 \pm 0.10	33.47 \pm 0.30	5.540 \pm 1.00

^a Average threshold cycle (C_T) and standard deviation (Std. dev.) obtained from three replicates.

^b Viral load calculated based on the specific standard curve values of the Synthetic Positive Control Template for Standard Curve (Primer Design Ltd., Southampton, UK).

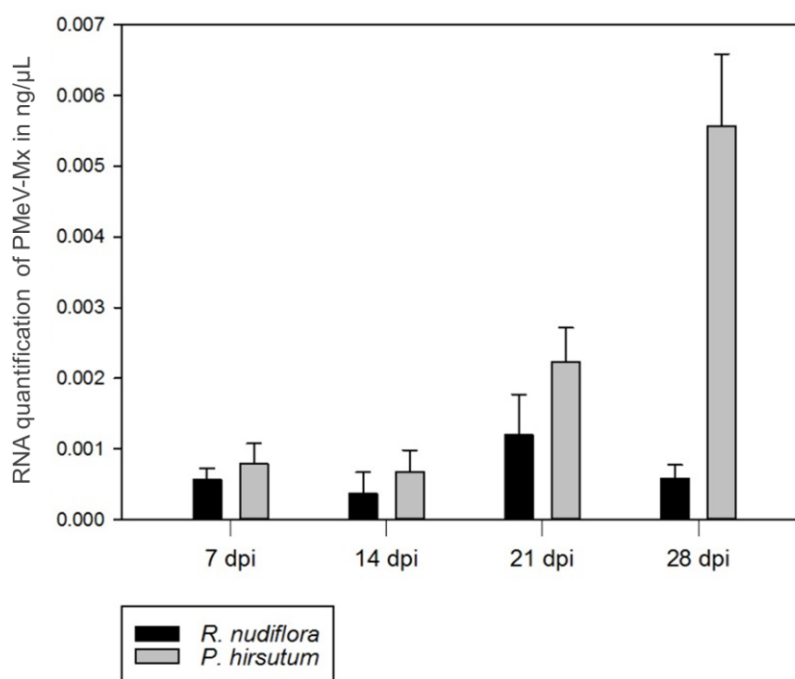


Figure 3.3 TaqMan® RT-qPCR of PMeV-Mx in *P. hirsutum* and *R. nudiflora* inoculated plants ($R^2 = 0.997$). Note the increasing in accumulation of PMeV-Mx-RNA (pg/ μL) at 7, 14, 21 and 28 dpi.

3.5. DISCUSSION

To understand the epidemiology of PSD in papaya fields and identify the possible sources of initial virus inoculum, 38 plant species belonging to 15 families growing on the edges and between papaya fields were sampled during 2015 and 2016 to be assayed for natural infection with PMeV-Mx. The presence PMeV-Mx infection was proven in 11 species belonging to the families *Acanthaceae*, *Fabaceae* and *Poaceae*. Our data demonstrated that the PMeV-Mx has a wide and diverse host range, including monocot and dicot plants. Under natural conditions, viruses have a limited and specific host range and are closely adapted to their hosts; in fact, species of the families that the virus infects naturally are more likely to be susceptible to the virus than species of other families (Dawson y Hilf, 1992; Hull, 2009). However, virus host ranges can result from multiple selection pressures, specializing to one or a few plant species or adapting to survive in many plant species, evolving across a wide host range and maintaining a wider population diversity (Dawson y Hilf, 1992). For example, *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Bromoviridae*) is a highly adaptable virus with a great capacity for evolutionary change, able to infect over 1000 species, including members of 85 plant families, exhibiting the broadest host range known to date (Roossinck, 2001). *Turnip mosaic virus* (TuMV, *Potyviridae*) evolved from a monocot-infecting virus to acquire the capacity of infecting dicot species of the genus *Brassica* and *Raphanus* (Garcia-Arenal *et al.*, 2013). *Tobacco rattle virus* (TRV, *Virgaviridae*) is also a widespread pathogen in the plant kingdom, with a host range of over 400 plant species from monocot and dicot groups (Otulak *et al.*, 2016). Even though the evolution favors specific host ranges (the co-evolution of pathogen and host could result in functional trade-offs that would limit it), the ability to infect different hosts conditions the epidemiology and provides the pathogen with more opportunities for transmission and survival (Malpica *et al.*, 2006).

To confirm PMeV infection, *D. aegyptium* and *P. hirsutum* (*Poaceae*) and *R. nudiflora* (*Acanthaceae*) plants were tested for PMeV-Mx susceptibility under experimental conditions through an infectivity test, which confirmed the presence of PMeV-Mx in two of the three inoculated weed species by RT-PCR. Quantification of PMeV-Mx-RNA by RT-qPCR in the axillary leaves of *P. hirsutum* and *R. nudiflora* showed that PMeV-Mx is able to replicate and move in these species. C_T values decreased as the days post-inoculation increased,

indicating that the viral load had increased over time in *P. hirsutum*. However, in *R. nudiflora*, although the viral titer increases over time until 21 dpi, the titer decreases to 28 dpi, suggesting a decrease in the replication rate. Nevertheless, the present investigation demonstrated that *P. hirsutum* and *R. nudiflora* supports replication and systemic accumulation of PMeV-Mx through injection of infected latex. Viruses' natural infection is preferred in infectivity tests and experimental inoculation because it provides a more accurate picture of cultivar behavior under natural conditions (Rubio *et al.*, 2003). However, in the case of PSD, the vector associated with the transmission has not yet been identified, and injection of infected latex is the only effective method of transmission, since it causes moderate tissue damage and places the injected particles adjacent to viable plant cells, a prerequisite for the establishment of plant virus infections (Rodrigues *et al.*, 2009).

Significantly, none of the experimentally inoculated plants of this species showed any symptoms of viral infection, although PMeV-Mx was detected in axillary leaves of all experimentally inoculated plants. In fact, these plants were kept in the greenhouse for another eight weeks, yet none of them displayed visible symptoms of viral infection. These results suggest that these species are symptomless hosts that appear to be partially resistant or tolerant to PMeV-Mx infection. Similar results were observed for infection of *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV, *Potyviridae*) in several cultivars of sweet potato, showing a natural resistance with only mild initial symptoms and low virus titers (Tugume *et al.*, 2008). The symptomless and systemic low-titered infection *Tobacco necrosis virus* (TNV, *Tombusviridae*) was also observed in *Arabidopsis thaliana* (Bacso *et al.*, 2016), and the systemic, low-titered and symptomless infection *Pelargonium line pattern virus* (PLPV, *Tombusviridae*) was found in its hosts (Pérez-Cañamas *et al.*, 2017). Plant virus resistance or tolerance is a highly complex process. Multiple factors and elaborate networks of genetic interactions determine its resistance or tolerance; for example, the presence of resistance genes, RNA silencing mechanisms, and the absence of specific host factors required for a virus to complete its infection cycle. All of these factors limit virus replication or movement and affect virus concentration and the virus infection extent in the host (Kombrink y Schmelzer, 2001; Pagan *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Mandadi y Scholthof, 2013; Galvez *et al.*, 2014; Bengyella *et al.*, 2015; Frech *et al.*,

2016). In addition, plant viruses in weed species are extremely common and usually asymptomatic (Roossinck, 2015). Some studies suggest that the negative impact of plant viruses on weed species could lead to the death of the infected individual, which might result in a natural selection for resistant or tolerant genotypes (Prendeville *et al.*, 2012).

Surprisingly, *D. aegyptium* plants inoculated with PMeV-Mx did not become infected under the experimental conditions of this study. The reason of this failure is unclear, considering that the virus was detected by RT-PCR in natural conditions. However, earlier studies show that some methods of experimental transmission of plant viruses are not efficient in certain host species, resulting in many “escapes” in the inoculation process (Mandal *et al.*, 2008), for example, the experimental insusceptibility of some plant species previously reported as well-known experimental hosts to *Tobacco streak virus* (TSV, *Bromoviridae*) (Vemana y Jain, 2010), or the inconsistency in the response of some rice cultivars to *Rice black streaked dwarf virus* (RBSDV, *Reoviridae*) infection between field and greenhouse experiments (Hajano *et al.*, 2016). Effectiveness of every infectivity test depends on a single factor or a combination of factors, such as variation in inoculum levels, environmental conditions, or specific virus-host interactions (Hajano *et al.*, 2016). All these factors influence the host susceptibility response, allowing the virus to spread systematically in the plant or only be replicated in the cells initially infected.

The results of this study indicate that the host range of PMeV is complex. PMeV-Mx host species pertain to highly heterogeneous species belonging to different plant families. The present study represents an approach to a possible host range of PMeV-Mx and the natural virus reservoirs in common weed species of Mexico. Such understanding of the key factors affecting the epidemiology of PSD may allow papaya producers and phytopathologists to design management strategies for this disease. Previously, the presence of dsRNA with a molecular weight similar to that associated with sticky disease was detected in samples of the *Poaceae* species *Brachiaria decumbens*, which commonly grow in the papaya orchards affected by the sticky disease in the south of Bahia, Brazil (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003). In addition, molecular and experimental evidence demonstrated that watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) is an alternative host for PMeV-Mx (Garcia-Camara *et al.*, 2017).

To the best of our knowledge, this is the first report on the natural infection of *Desmodium incanum* (Fabaceae), *Ruellia nudiflora* (Acanthaceae) and *Dactyloctenium aegyptium*, *Echinochloa colonum*, *Eleusine indica*, *Panicum hirsutum*, *P. hirticaule*, *Paspalum virgatum*, *Rhynchelytrum repens*, *Urochloa reptans*, and *U. fusca* (all belonging Poaceae family) by PMeV-Mx. These findings indicate that the new weed hosts of PMeV-Mx reported in this study may act as reservoirs and play a role as primary sources of infection, suggesting the need for regular assessment of this species in papaya fields.

A number of PMeV-infected weed plants identified in the present work are perennial plants, wherein PMeV-Mx could remain, ensuring host continuity in space and time, providing a source of infection for subsequent papaya crops. In fact, in the orchard at Alfredo Bonfil in Campeche, where all papaya plants were removed and burned after a full crop cycle, no care was taken to eliminate weeds, so the infection was quickly restored when starting a new crop cycle, demonstrating the importance of weed control in commercial plantations.

The findings presented here highlight the importance of weed species as potential virus reservoirs for PMeV-Mx and possibly other papaya viruses, implying the need for further investigations in order to assess the impact of common weed hosts of PMeV-Mx upon the virus epidemiology.

3.6. ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the “U Najil Tikin Xiw” herbarium from CICY and Paulino Simá Polanco for their technical assistance and plant species identification. This work was supported by grant 265330 from CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

CAPÍTULO 4. MOLECULAR AND EXPERIMENTAL EVIDENCE OF WATERMELON (CITRULLUS LANATUS) AS HOST OF THE MEXICAN VARIANT OF PAPAYA MELEIRA VIRUS

I. García-Cámara y D. Pérez-Brito y O. Moreno-Valenzuela y A. Magaña-Álvarez y P. M. B. Fernandes y Raul Tapia-Tussell

I. García-Cámara : D. Pérez-Brito : A. Magaña-Álvarez Laboratorio GeMBio, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C, Calle 43 #130, x 32 and 34, Col. Chuburná de Hidalgo, 97205 Mérida, Yucatán, Mexico

I. García-Cámara : O. Moreno-Valenzuela Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C, Calle 43 #130, x 32 and 34, Col. Chuburná de Hidalgo, 97205 Mérida, Yucatán, Mexico

P. M. B. Fernandes Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

R. Tapia-Tussell (*) Unidad de Energía Renovable, Centro de Investigación Científica de Yucatán AC, Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto, Km 5, Sierra Papacal, CP, 97302 Mérida, Yucatán, Mexico

e-mail: rtapia@cicy.mx

Eur J Plant Pathol

<https://doi.org/10.1007/s10658-017-1357-8>

4.1. ABSTRACT

Papaya sticky disease, caused by *Papaya meleira virus* (PMeV), results in complete crop loss in papaya orchards, because infected fruits are unacceptable for consumption. Little is known about sticky disease epidemiology, and the best available strategy for disease management is to rogue infected plants. Identification of alternative hosts for this virus is important for developing control strategies. In Mexico, papayas and watermelons are often cultivated in close proximity or overlapping cycles, which may favor virus interspecies transmission by putative insect vectors of PMeV. Watermelon seedlings (*Citrullus lanatus* Thunb.) were inoculated with latex from papayas infected with a Mexican variant of PMeV (PMeV-Mx), and infection was confirmed by reverse transcription-PCR (RT-PCR) and quantitative RT-PCR (RT-qPCR). Amplicons (491 bp) of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene of PMeV-Mx were detected in axillary leaves of all inoculated seedlings seven days post-inoculation (dpi). Circa 10 to 12 dpi, necrotic lesions were observed on the edges of the leaves. Absolute quantification of PMeVMx-RNA by RT-qPCR showed an increase in viral load over time (from 0.51 to 586.15 pg/ μ L), three to 14 dpi. Molecular and experimental evidence demonstrate is also a host for PMeV-Mx and may be an alternative host.

Keywords *Papaya meleira virus*; watermelon; reverse transcription-PCR; quantitative RT-PCR

4.2. INTRODUCTION

Papaya sticky disease (PSD), or “meleira”, is an important disease of papaya (*Carica papaya* L.) that causes considerable crop losses over a relatively short time. This virus was first reported in Brazil (Rodrigues *et al.*, 1989) and more recently in Mexico (Perez-Brito *et al.*, 2012). PSD is initially characterized by the spontaneous exudation of a fluid latex from diseased fruits. Oxidation of this fluids occur after atmosphere exposure causing necrotic lesions on fruit surfaces, rendering them unacceptable for commercial consumption (Tavares *et al.*, 2004; Abreu *et al.*, 2015). Additional symptoms have been observed in diseased plants in Mexico, including the presence of small internal nodules in fruit pulp, necrotic spots in petioles and latex within the fruit cavity (Tapia-Tussell *et al.*, 2015).

The causal agent of sticky disease was identified and named in Brazil as *Papaya meleira virus* (PMeV), an isometric virus with a double-stranded RNA (dsRNA) genome of approximately 12,000 base pairs (bp) (Tavares *et al.*, 2004). This feature was also reported in Mexico when this virus was first detected (Perez-Brito *et al.*, 2012). A band of 4.5 kb was always observed associated with the distinctive detection band of the virus. This band was detected consistently about a month before the 12 kb band, and showed the analyzed plant would be infected with the virus, this band was later related to the presence of the genome of an *Umbravirus* (Perez-Brito *et al.*, 2012; Perez-Brito, personal communication). In Brazil, sticky disease has recently been found in double infection with PMeV, which was identified as a plant virus of *Totiviridae*, and PMeV2, an umbra-like virus with an ssRNA genome (Antunes *et al.*, 2016). In Mexico a Mexican variant of PMeV (PMeV-Mx) has been also reported. A partial sequence of 1154-bp from a putative RdRp with a 79% identity with RdRp of Papaya virus Q (PpVQ), a new papaya virus reported in Ecuador (Quito-Avila *et al.*, 2015) and 71% identity with the RdRp's of PMeV2 and other members of the genus *Umbravirus* (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015; Antunes *et al.*, 2016). A pair of primers designed based on the PMeV-Mx sequence amplified products from both Brazilian and Mexican infected plants (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015).

PSD spreads rapidly, and certain agricultural practices, such as fruit harvesting, may be responsible for the spreading of this disease in orchards (Ventura *et al.*, 2004). Other studies examining modes of virus transmission have suggested alternative ways for spreading. PMeV is seed-borne, and transmission across generations may occur via contaminated seeds (Tapia-Tussell *et al.*, 2015). There are also evidences of transmission via an airborne insect vector of PMeV based on studies made about field spreading patterns of PSD (Rodrigues *et al.*, 1989; Abreu *et al.*, 2015). PMeV is also efficiently transmitted mechanically by injecting the latex of diseased plants into stems of healthy papayas (Rodrigues *et al.*, 2009). There is a limited understanding of PMeV viral epidemiology. Only one preliminary study assessing PMeV host range is reported: the presence of viral dsRNA of a similar molecular weight to that of PMeV in *Brachiaria decumbens* (Poaceae) in papaya orchards infected with sticky disease in Brazil (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003). The best available strategy to control and manage PMeV is destroying infected plants. Identification of alternative hosts for PMeV is also important to identify factors that influence viral epidemiology and for development of control strategies.

Watermelon is one of the most important cucurbit crops in the world, and Mexico is the second largest exporter (FAOSTAT 2016). In Mexico where our field studies are located, farmers often cultivate papaya orchards in proximity to watermelon plants and sometimes both crops are planted in the same lot of land to reduce cost, labor and better utilization of resources minimizing economic risks, by diversifying crop production. However, this farming practice has increased the risk of PMeV transmission and dissemination between plant species, perhaps via an airborne vector. The isolate P of *Papaya ringspot virus* (PRSV-P) isolate, a derivative of W isolate (PRSV-W), naturally infects plants in Cucurbitaceae and *C. papaya*. Once PRSV infects a cucurbit, its spread throughout the field quite rapidly (Gibbs *et al.*, 2008, Olarte *et al.*, 2011). We hypothesized watermelon hosts PMeV-Mx and the primary goal of this study is to demonstrate this association using sensitive and specific molecular assays.

4.3. MATERIALS AND METHODS

4.3.1. Seed source and germination process

Commercial seeds of *C. lanatus* 'Sentinel' (Seminis®, Mexico City, Mexico) were used for this study. Seeds were disinfested by dry heat at 70 °C for three days (Rees 1970) then submerged for 24 h in sterile water. The seeds were germinated in trays containing sterilized vermiculite and grown in complete darkness into insectproof cages.

4.3.2. Inoculation of watermelon plants with PMeV-Mx

Latex-containing virus particles were obtained by wounding the surfaces of immature green fruits from diseased papaya plants from San José Kuché, a municipality of Conkal in the State of Yucatan, Mexico. RNA was extracted from the PMeV-infected latex as described by Tavares *et al.*, (2004), followed by electrophoresis in 1% (w/v) agarose gels in 1× Tris–borate–EDTA buffer (TBE), in order to verify the presence of the two distinctive PMeV bands: PMeV dsRNA (9 kb) and PMeV2 ssRNA (4.5 kb). RT-PCR was also performed on total RNA using primers CB38 and CB39, specific to PMeV-Mx RNA-dependent RNA polymerase (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015).

Sixty watermelon seedlings were inoculated by injecting 20 µL of the diluted latex solution, 1:1 (v/v) in 1× phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4; using a sterile syringe into the stem near the apex (Abreu *et al.*, 2012), at the two- to four-true-leaf stages and placed in insect-proof cages, under normal daylight conditions (12 h photoperiod) with temperatures ranging from 23 to 25 °C. Six negative control watermelon seedlings were inoculated with latex from healthy fruit also diluted 1:1 (v/v) in PBS and were used as a negative control for reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Additional six blank controls watermelon seedlings were inoculated with PBS only. All plants were assessed for symptoms development, and the youngest leaves were sampled for RT-PCR at three, seven and 14 dpi to further confirm PMeV-Mx infection. The experiment was repeated three times.

4.3.3. Detection of PMeV-Mx by RT-PCR

Watermelon leaf samples were tested for the presence of PMeV-Mx by RT-PCR using primers specific to the PMeV-Mx RNA-dependent RNA polymerase gene to amplify a product of 491-bp (CB38: 5' AGCGCATCTCGTTCTGCCA 3' ; CB39: 5' GCCCGGATATACCGGCCT 3'). NCBI Accession KF781635.1 was used as template for primer design (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015). Total RNA was extracted from watermelon leaves according to the TRIzol® procedure (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Sap extracts were reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random primers were used according to the manufacturer's instructions. The obtained cDNA was amplified with Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using the following cycling conditions: 5 min of denaturation at 95 °C, followed by 40 cycles of 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 10 min. RT-PCR products were separated by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gels in 1× TBE, and stained with ethidium bromide to determine the presence or absence of the target bands.

4.3.4. Assessment of viral load by real-time RT-PCR

The PMeV-Mx viral load was determined by performing quantitative RT-PCR (RT-qPCR). Primers (PMeVF: 5' CGCAAACTAAGACGAGATTCAG 3'; PMeVR: 5' TGTATGACTGTGGGCTGGTTA 3'), TaqMan probe (5' CCCTCGTAGACTAGCCCCTCAGCCATC 3') and cycling conditions were designed specifically for this study, using Primer Design Ltd. (Southampton, UK), based on genomic regions of the PMeV-Mx RNA polymerase gene, to amplify a product of 86-bp. Total RNA was extracted from watermelon leaves as described above. RNA quality and quantity were determined using an Eppendorf BioPhotometer® 6131. Total RNA extracts were reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random primers according to the manufacturer's instructions, and the concentration of each sample was adjusted to 20 ng/μL. To estimate the concentration (ng/μL) of PMeV RNA by quantification, ten-fold serial dilutions of the Synthetic Positive Control Template for Standard Curve (Primer Design Ltd., Southampton, UK) were included for RT-qPCR to

obtain a standard curve. The standard curve template was an 86-bp product of the PMeV-Mx polymerase gene, and the serial dilution concentrations were confirmed with a spectrophotometer. For quantification, PMeV-Mx-RNA concentrations (pg/ μ L) were calculated based on the specific standard curve values generated in the reaction, which reproduced a linear relationship between the threshold cycle (C_T) value and the total target concentrations of the samples. Real-time RT-PCR was performed using a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK). Real-time RT-PCR was conducted in 48-well reaction plates using 20 μ L of a reaction mixture containing 10 μ L of TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Warrington, UK), 0.4 μ L each of primer (each at 0.2 μ M), 1.2 μ L of TaqMan® probe (0.75 μ M), 0.4 μ L of Rox reference dye and 3 μ L (20 ng/ml) of template cDNA for each sample. The thermal profile was set with initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 30 s. RNA from PMeV-Mx-infected papaya (positive control), RNA from healthy plants (negative control) and a non-template control (NTC) were included in each experiment. All samples were tested by triplicate wells, and sample thresholds, baseline values and reaction efficiency values were automatically calculated by StepOne™ Real-Time PCR System manager software (Applied Biosystems, Warrington, UK). Samples with C_T values over than 38 were considered negative. The actin gene was used as an internal control to verify the presence of intact RNA.

4.3.5. PMeV sequencing and analysis

RT-PCR products of 491-bp were purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) and were sequenced in both sense and antisense directions (Macrogen Inc., Seoul, South Korea) using the amplification primers. Sequences were analyzed using BLAST.

4.4. RESULTS

4.4.1. Screening watermelon for susceptibility to PMeV-Mx infection

In PSD infected papaya latex, the presence of both PMeV and PMeV2 was corroborated by agarose gel electrophoresis, visualizing two bands, one of 9 kb corresponding to PMeV

dsRNA and a second of 4.5 kb corresponding to PMeV2 ssRNA. The expected product (491 bp) corresponding to the RdRp gene of PMeV was detected in axillary leaves of all inoculated seedlings starting at seven dpi (Figure 4.1).

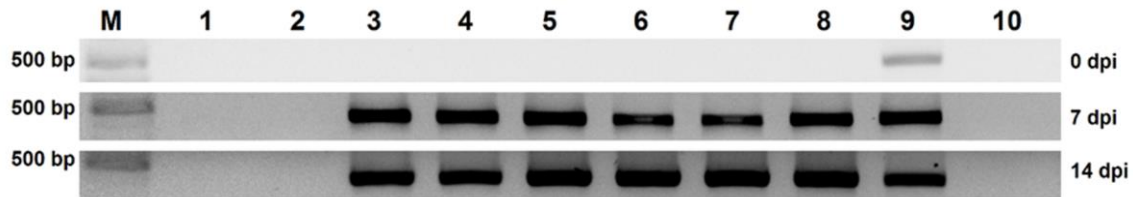


Figure 4.1 RT-PCR detection of PMeV-Mx in inoculated watermelon plants at 0 (top gel), 7 (middle gel) and 14 (bottom gel) days post inoculation (dpi). Lane M: 100 bp DNA ladder, lanes 1-2: Watermelon plant inoculated with healthy latex (negative control), lanes 3-8: Watermelon PMeV-inoculated plants, lane 9: Positive control, lane 10: Non-template control (NTC).

At seven and 14 dpi, a single product was purified and sequenced. Sequences were obtained and submitted in GenBank (Accession No. KY468507, KY468508, KY468509, KY468510). The identity of PCR products were each confirmed as the expected viral sequence, showing 99% identity with PMeV hypothetical protein and RdRp genes (KF214786.1) and 74% identity with Papaya virus Q (PpVQ) (KP165407.1) found in Ecuador, a newly reported virus infecting *C. papaya*, which alike PMeV-Mx, is related to members of the genus *Umbravirus*. The only symptoms observed in *C. lanatus* seedlings were necrotic lesions on the leaf tips and edges. This symptom was not observed in negative control plants inoculated with healthy latex and PBS. The virus induced necrotic lesions in all PMeV-inoculated plants between 10 and 12 dpi (Figure 4.2). All *C. lanatus* seedlings inoculated with PMeV-Mx died approximately 20-25 dpi.

4.4.2. Viral spread and replication in watermelon

PMeV-Mx was detected three dpi, and C_T values decreased in time, indicating increased viral load. C_T values ranged from 37 at three dpi to 25 at 14 dpi. Absolute quantification of PMeV-Mx RNA revealed virus accumulation and retention in watermelon tissues with estimated amounts of PMeV-Mx-RNA ranging from 0.510 pg/ μ L at three dpi to 586.154 pg/ μ L at 14 dpi (Figure 4.3), suggesting this virus is capable of replicating itself in watermelon cells and spreading in a systemic fashion.

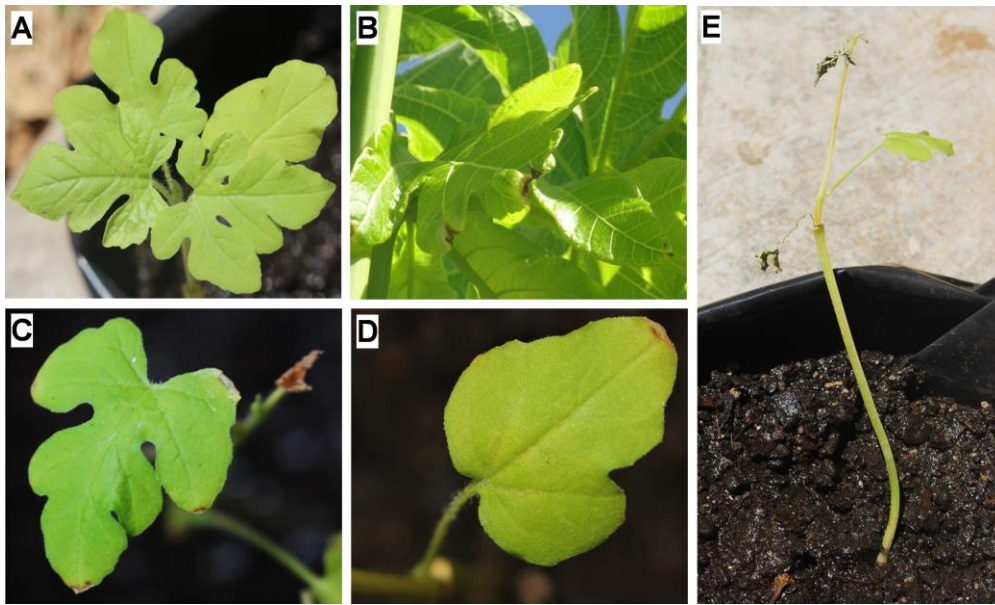


Figure 4.2 Symptoms of PMeV-Mx infection in watermelon. (a) Watermelon plant inoculated with healthy latex (negative control); (b) Necrotic lesions on tips and leaf edges of papaya infected with PMeV-Mx; (c-d) Necrotic lesions on tips and leaf edges of watermelon plants inoculated with PMeV-Mx 10 dpi; (e) Watermelon plant inoculated with PMeV at 14 dpi.

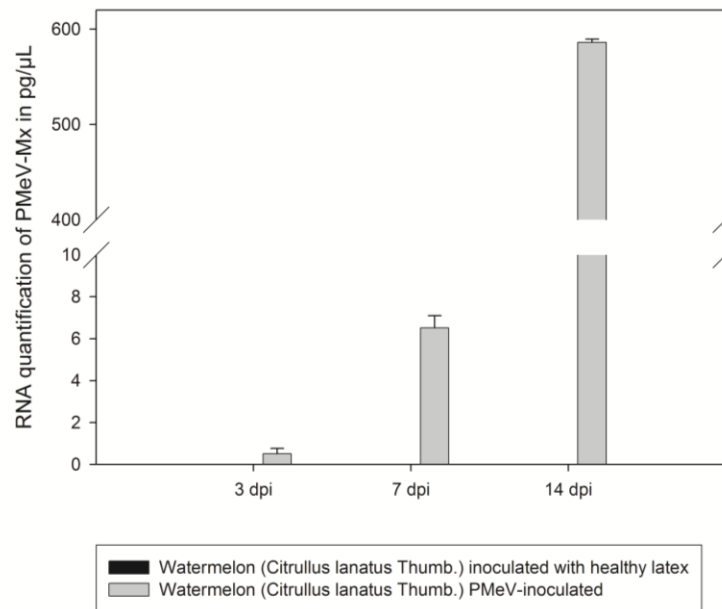


Figure 4.3 TaqMan® RT-qPCR of PMeV-Mx in inoculated watermelon seedlings ($R^2 = 0.997$). Note the increasing in accumulation of PMeV-Mx-RNA (pg/μL) at 3, 7 and 14 dpi.

4.5. DISCUSSION

During the summer of 2015, an epidemiological study searching for natural reservoirs of PMeV-Mx collected samples of watermelon plants from orchards located 0.5 Km from sticky disease papaya fields. RT-PCR analysis confirmed the infection of watermelon plants with PMeV-Mx in the selected samplings sites. Watermelon is an important summer crop worldwide and is prone to several viral infections responsible for crop loss, such as *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) and *Papaya Ringspot virus* watermelon isolate (PRSV-W) (OlarTE *et al.*, 2011; Coutts *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016). It had been suggested PRSV has emerged in cucurbits in Africa or Asia, and that the introduction of *C. papaya* to Asia and its subsequent establishment in India may have provided a new niche for this viral infection in papaya, deriving PRSV-P (OlarTE *et al.*, 2011). A similar process may have happened with PMeV-Mx and watermelon. Because *C. lanatus* is widely distributed in the region sampled in this study, and farmers commonly combine watermelon crops near papaya fields, airborne vectors may be involved in the transmission and dissemination of PMeV favoring the transmission of this disease from one crop to another. All together, these data suggest watermelon is also a host for PMeV-Mx.

Mechanical inoculation of PMeV-Mx induced necrotic lesions in all inoculated *C. lanatus* seedlings. Necrotic lesions have been previously observed in papaya crops in Brazil as an initial symptom of PSD (Ventura *et al.*, 2004). Necrotic lesions appear on the edges of young leaves of *C. papaya* cv. Golden as part of the hypersensitive response (HR) defense mechanism, whereby cells infected with pathogens, and often surrounding cells, are instructed to self-destruct by the host plant (Abreu *et al.*, 2015).

PSD is caused by an association between PMeV a dsRNAvirus related to *Totiviridae*, and PMeV2, a virus with a ssRNA genome related to the genus *Umbravirus* which has a high sequence similarity to PMeV-Mx and to PpVQ (Quito-Avila *et al.*, 2015). All of which suggests these viruses may be different isolates of a single *Umbravirus* or closely related to umbraviruses (Antunes *et al.*, 2016). This study confirmed the presence of PMeV-Mx by

RT-PCR in all inoculated watermelon seedlings; there is not a general RT-PCR detection method for PMeV as species because the primers currently used were designed based on the sequence of a Brazilian variant of PMeV and they do not detect the Mexican variant. Nonetheless, the watermelon seedlings tested in this study were inoculated with PSD infected papaya latex, and the presence of both PMeV and PMeV2 was corroborated by agarose gel electrophoresis. Moreover, umbraviruses are distinguishable from other viruses by their lack of a capsid protein (CP) gene. Umbraviruses depend on the presence of a helper virus. In this case, PMeV is the helper virus of PMeV2 (Antunes *et al.*, 2016) or PMeV-Mx, and the PMeV CP may form hybrid virus particles when encapsidating the umbraviral RNA. Encapsidation is indispensable for disease establishment. Specific primer design for the detection of the Mexican variant of PMeV is in progress. Not surprisingly, it was demonstrated PMeV-Mx replicates and moves throughout *C. lanatus*. The quantification of PMeV-Mx RNA by RT-qPCR in axillary leaves showed a decrease in C_T values in all inoculated seedlings as days post-inoculation increased, indicating increased viral loads in the plants over time.

In summary, *C. lanatus* is an alternative host of PMeV and may act as a reservoir of the virus, playing a role as a primary source of infection. Further studies will be necessary to describe the mode of transmission and the specific interactions between watermelon and PMeV-Mx since there is no insect vector reported to present for this virus; PMeV-Mx is only known being transmitted by seeds and by some agricultural practices (Ventura *et al.*, 2003; Tapia-Tussell *et al.*, 2015; Abreu *et al.*, 2015). This study provides relevant information demonstrating *C. lanatus* is an alternative host of PMeV in Mexico, contributing to our understanding of the epidemiology of this disease. These findings may serve as the basis for further epidemiological research to study whether PMeV-Mx is transmitted from watermelon to papaya through airborne vectors, assisting upon control measures to reduce the spreading this disease in papaya avoiding economic losses.

Compliance with Ethical Standards All the authors agree with the submission of this manuscript. This research did not involve human participants or animals.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

5.1. DISCUSIÓN

En Brasil y México, la Meleira o enfermedad pegajosa es una de las enfermedades más importantes del cultivo de papaya. El PMeV, agente causal de esta enfermedad, es capaz de dispersarse rápidamente, con incidencias de hasta el 100% cuando las fuentes de inóculo no son eliminadas del campo, ocasionando grandes pérdidas en la producción de este cultivo (Abreu *et al.*, 2015; Ventura *et al.*, 2004). Algunas prácticas agrícolas, como la cosecha de los frutos, pueden ser las responsables de la diseminación rápida de esta enfermedad en el campo (Ventura *et al.*, 2004). Además, el virus es transmitido eficientemente a través de semillas infectadas (Tapia-Tussell *et al.*, 2015). Sin embargo, el conocimiento acerca de su epidemiología es limitado.

Previamente, los estudios sobre el patrón de dispersión de esta enfermedad en el campo realizados en Brasil y México, sugirieron la participación de un vector en la transmisión del PMeV (Abreu *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2009). No obstante, a pesar de los esfuerzos, aún no se había encontrado un vector involucrado en la transmisión de este virus. Es por ello que el presente trabajo tuvo como objetivo principal, identificar a los posibles insectos vectores aéreos involucrados en la transmisión del PMeV. Es importante mencionar que este virus aún no ha sido clasificado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), por lo que no fue posible sugerir algún género/especie de vector aéreo involucrado en su transmisión, mediante los análisis de las especies de vectores de otros virus de plantas taxonómicamente cercanos. Por el contrario, fue necesario un análisis de la diversidad y abundancia de las especies de insectos presentes en plantaciones de papaya, para encontrar aquellas especies predominantes que pudieran estar involucradas en su transmisión. Lo anterior permitió establecer que los insectos más abundantes fueron los pertenecientes a la familia de las chicharritas (Hemiptera: Cicadellidae). Además, el PMeV fue detectado en seis especies o géneros de chicharritas (*Draeculacephala soluta* Gibson, *Agalliopsis novella* Say, *Xyphon* sp., *Hortensia* sp., *Agallia constricta* Van Duzee y *Empoasca papayae* Oman). Esta familia posee especies vectoras de al menos 31 especies de virus de plantas, por lo que es considerada como una de las familias con

mayor participación en la transmisión de virus de plntas (Ammar *et al.*, 2007; Hogenhout *et al.*, 2008; Nault, 1997; Nault *et al.*, 1989; Todd *et al.*, 2010).

El PMeV también se detectó en un género de pulgones (*Aphis* sp.). Sin embargo, los pulgones únicamente se encontraron en alta abundancia durante el mes de febrero del 2015. Previo al presente estudio, se detectó al PMeV en *Trialeurodes variabilis* (Aleyrodidae), especie de mosquita blanca con alta abundancia en plantaciones de papaya en Brasil, sin embargo, esta especie fue incapaz de transmitir experimentalmente al virus (Rodrigues *et al.*, 2009). En el presente estudio no se encontraron especies de mosquita blanca en ninguna de las plantaciones de papaya muestreadas. El presente estudio contribuyó también al conocimiento sobre las especies de insectos asociadas al cultivo de papaya en México, las cuales pueden participar en la transmisión de diferentes agentes fitopatógenos, pues hasta nuestro conocimiento actual, no existen estudios previos que presenten registros acerca de la diversidad y abundancia de insectos en plantaciones de papaya en México.

Empoasca papayae Oman (Hemiptera: Cicadellidae) fue la especie de chicharrita más abundante en las plantaciones de papaya incluidas en este estudio y mostró el título más alto de PMeV-Mx entre todas las especies evaluadas, por lo que fue seleccionada para los experimentos de transmisión. De acuerdo con los resultados, *E. papayae* es capaz de adquirir al PMeV a partir de plantas de papaya (*C. papaya* cv. Maradol) infectadas y transmitirlo a plantas sanas de papaya. El PMeV-Mx fue detectado en el 100% de las plantas expuestas a insectos adultos virulíferos, 21 días después de la exposición. Este es el primer reporte acerca de la transmisión del PMeV-Mx por un vector aéreo, y representa el inicio de la comprensión epidemiológica acerca de las interacciones específicas dentro del sistema virus-vector-planta.

Sin embargo, aún falta mucho por esclarecer al respecto. Por ejemplo, la biología de *E. papayae* es muy poco estudiada. Se sabe que esta especie representa un factor limitante en la producción de papaya, al producir daños por alimentación directa y ser capaz de transmitir fitopatógenos, como la rickettsia asociada a la sintomatología del Bunchy top y fitoplasmas 16SrI-B y 16SrII (Acosta *et al.*, 2017). *C. papaya* es su única especie

hospedante, por lo que es considerada una especie monófaga, aunque existen otras especies del género extremadamente polífagas. Por tanto, se requieren estudios que analicen la gama de hospedantes de esta especie y que evalúen diversos parámetros ambientales que pudieran afectar su comportamiento, impactando sobre su dinámica poblacional, así como sobre la eficiencia en la transmisión del PMeV. La comprensión de este sistema permitirá la planeación e implementación de estrategias adecuadas para el control de esta enfermedad en campo.

A pesar de que la identificación de los hospedantes alternativos del PMeV es esencial en la comprensión de la epidemiología de esta enfermedad, únicamente existe un estudio al respecto, el cual evaluó la presencia del virus en 47 especies de arvenses presentes en plantaciones de papaya infectadas con PMeV, y se reportó solo en *Brachiaria decumbens* (Poaceae) y *C. papaya* (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003). Para identificar posibles fuentes primarias de infección, en el presente estudio, se muestrearon y evaluaron 38 especies de arvenses, presentes en áreas de cultivo de papaya. La presencia del PMeV-Mx se comprobó en 11 especies de arvenses, pertenecientes a las familias Acanthaceae, Fabaceae y Poaceae. Además, la infección fue confirmada a través de un ensayo de inoculación, en dos de estas especies de arvenses, *Panicum hirsutum* (Poaceae) y *Ruellia nudiflora* (Acanthaceae); en ambas se confirmó la replicación y el movimiento del virus dentro de sus tejidos, a pesar de ser hospederos asintomáticos del PMeV-Mx.

Lo anterior significa que el rango de hospedantes de este virus es complejo, pues incluye especies altamente heterogéneas, pertenecientes a diferentes familias, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, lo que propicia al virus, mayores oportunidades de permanecer y asegurar su continuidad. Los nuevos hospedantes alternativos del PMeV-Mx aquí descritos, son capaces de participar en la epidemiología de la enfermedad, como reservorios en los que el virus puede permanecer entre un ciclo productivo de papaya y otro, lo que significa una fuente de infección para cultivos subsecuentes. Por lo anterior, se sugiere el monitoreo de estas especies y su eliminación en el campo. Es importante mencionar que a pesar de se considera a *E. papayae* como una especie monófaga, aún se requiere estudiar su gama de hospedantes y determinar si es capaz de alimentarse de alguna de estas especies de arvenses que son reservorios del virus.

Además, tampoco se descarta la posibilidad de que exista algún otro vector involucrado en la transmisión del PMeV.

La evidencia molecular y experimental de este estudio también demostró que la sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) es un hospedante alternativo del PMeV-Mx, dentro del cual, el virus fue capaz de replicarse, y aumentó su título en los días posteriores a la inoculación. Además, el PMeV-Mx es capaz de moverse hacia otros tejidos de la planta, diferentes al sitio de inoculación, pues la infección se confirmó en las hojas axilares de las plantas inoculadas, a partir de los siete días posteriores a la inoculación. Finalmente, todas las plantas inoculadas mostraron lesiones necróticas en los bordes de las hojas a los 10-12 días posteriores a la inoculación, síntoma que había sido descrito previamente en *C. papaya* cv. Golden., como parte del mecanismo de defensa de respuesta hipersensible (Abreu *et al.*, 2015).

Por lo anterior, la sandía puede actuar como un reservorio del virus, e incluso participar como una fuente primaria de infección. Lo anterior es de gran importancia porque México es el segundo exportador de este cultivo y las plantaciones de sandía, por lo menos en el sureste del país, suelen localizarse muy cerca de las plantaciones de papaya; incluso puede encontrarse a ambos cultivos dentro de una misma huerta, con la finalidad de reducir costos y aprovechar los recursos de una mejor manera. En un principio, esta práctica pudo favorecer la transmisión y diseminación del PMeV entre estas especies, tal vez mediante la existencia de un posible vector aéreo del PMeV y mediante un proceso similar al que ocurrió con el *Papaya ringspot virus* (PRSV), el cual se transmitió de cucurbitáceas hacia papaya, de donde se generó el PRSV-P (Olarde *et al.*, al. 2011). Sin embargo, aún falta esclarecer la epidemiología de este patosistema.

En la actualidad, la mejor estrategia para controlar la enfermedad es la eliminación de las plantas infectadas. La comprensión de los factores en la epidemiología de esta enfermedad es muy importante, ya que permitirá la propuesta de nuevas estrategias de control en campo enfocadas en los insectos vectores y los hospedantes alternos.

5.2. CONCLUSIONES GENERALES

- La familia Cicadellidae (Hemíptera) fue la más diversa y abundante entre todas las familias de insectos colectados en plantaciones de papaya cv. Maradol en la región sur-sureste de México.
- *Empoasca papayae* Oman (Hemiptera: Cicadelliade) fue la especie más abundante y con el título de PMeV-Mx más alto, entre los siete géneros/especies de la familia Cicadellidae que resultaron portadores del PMeV-Mx.
- El PMeV-Mx fue detectado y cuantificado en el 100% de las plantas de *C. papaya* cv. Maradol expuestas a insectos virulíferos de *E. papayae*, 14 días posteriores a la inoculación, por lo que se concluye que este insecto es un vector aéreo del PMeV-Mx.
- Las plantas de papaya mostraron síntomas de la enfermedad pegajosa, cinco meses después de la exposición a insectos virulíferos de *E. papayae*.
- De las 38 especies de arvenses que se colectaron e identificaron en las plantaciones de papaya cv. Maradol, 11 especies resultaron positivas al PMeV-Mx por RT-PCR y pertenecen a las familias Poaceae, Acanthaceae y Fabaceae.
- El ensayo de inoculación confirmó la presencia del PMeV-Mx en las arvenses *Panicum hirsutum* (Poaceae) y *Ruellia nudiflora* (Acanthaceae), 21 días posteriores a la inoculación, lo cual confirmó que estas especies son hospedantes alternativos del virus.
- Sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) es un hospedero alternativo de PMeV-Mx, pues este virus fue detectado en las hojas axilares de esta especie, siete días posteriores a la inoculación.

5.3. PERSPECTIVAS

La biología de *Empoasca papayae*, vector del PMeV, *E. papayae*, no está bien documentada, por lo que se requieren estudios que evalúen las asociaciones entre esta especie de chicharrita y sus posibles plantas hospedantes, sus preferencias alimentarias y su dinámica poblacional. Es necesario comprender cómo diferentes parámetros ambientales (temperatura, precipitaciones, presión atmosférica, intensidad lumínica, duración del día, humedad relativa, viento), pueden determinar el comportamiento de este vector y, en consecuencia, la eficiencia en la transmisión del PMeV, su rápida dispersión y su incidencia en el campo. Además, es indispensable esclarecer las interacciones moleculares específicas entre el PMeV y *E. papayae*, lo cual permitirá determinar el tipo de transmisión de este virus y su persistencia dentro del vector. Este conocimiento permitirá implementar estrategias de manejo fitosanitario y determinar, por ejemplo, cuales son aquellas especies de arvenses hospedantes del vector, que deben eliminarse del campo, cuándo aplicar insecticidas, cuáles son los enemigos naturales del vector y cómo pueden ser utilizados, entre otros enfoques.

El presente estudio proporciona información relevante acerca del rango de hospederos del PMeV, incluyendo sandía, la cual demuestra que esta especie, de gran importancia económica, es un hospedero alternativo del PMeV. Estos hallazgos pueden servir como base para investigaciones epidemiológicas adicionales, que permitan conocer si el PMeV-Mx se transmite desde el cultivo de sandía al cultivo de papaya a través de algún vector aéreo. Además, es necesario realizar más estudios que describan las interacciones específicas entre sandía y PMeV, donde se identifiquen las moléculas que participan en el proceso de infección en este hospedante, las cuales incluyan la replicación y la movilidad del virus.

Actualmente, no existe un método de detección general para el PMeV por RT-PCR, ya que los iniciadores fueron diseñados con base en la secuencia de la variante brasileña y no detectan a la variante mexicana. Por lo que es necesario determinar la secuencia completa de la variante mexicana del PMeV, lo cual permita el desarrollo de un método de detección general para este virus.

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, P.M.V., T.F.S. Antunes, A. Magaña-Alvarez, D. Pérez-Brito, R. Tapia-Tussell, J.A. Ventura, A.A.R. Fernandes y P.M.B. Fernandes (2015). A current overview of the Papaya meleira virus, an unusual plant virus. *Viruses*, 7, 1853-1870.
- Abreu, P.M.V., J.G. Piccina, S.P. Rodrigues, D.S. Bussa, J.A. Ventura y P.M.B. Fernandes (2012). Molecular diagnosis of Papaya meleira virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 180, 11-17.
- Acosta, K., B. Piñol, Y. Arocha, M. Wilson, E. Boa, y J. Lucas (2010). Transmission of the phytoplasma associated with Bunchy Top Symptom of papaya by *Empoasca papayae* Oman. *Journal of Phytopathology*, 158, 194-196.
- Acosta, K.I., L. Zamora, B. Piñol, M.L. Quiñones, P.L. Ramos, M. Luis, N.E. Leyva-Lopez, y Y. Arocha (2017). *Empoasca papayae* Oman, 1937 (Hemiptera: Cicadellidae) the simultaneous vector of phytoplasmas and rickettsia associated with “Bunchy Top Symptom” in Cuba. *Anales de Biología*, 39, 35-42.
- Ammar, E.D. (1994). Propagative transmission of plant and animal viruses by insects: Factors affecting vector specificity and competence. *Advances in Disease Vector Research*, 10, 289-332.
- Ammar, E.D., D. Gargani, J.M. Lett y M. Peterschmitt (2009). Large accumulations of maize streak virus in the filter chamber and midgut cells of the leafhopper vector *Cicadulina mbila*. *Archives of Virology*, 154, 255-262.
- Ammar, E.D., R.E. Gingery, R.E. y L.R. Nault (1992). Cytopathology and ultrastructure of mild and severe strains of maize chlorotic dwarf virus in maize and johnsongrass. *Canadian Journal of Botany*, 71, 718-724.

- Ammar, E.D., U. Jarlfors y T.P. Pirone (1994). Association of potyvirus helper component protein with virions and the cuticle lining the maxillary food canal and foregut of an aphid vector. *Phytopathology*, 84, 1054-1060.
- Ammar, E.D., E.A. Khelifa, A. Mahmoud, S.E. Abol-Ela y M. Peterschmitt (2007). Evidence for multiplication of the leafhopper-borne maize yellow stripe virus in its vector using ELISA and dot-blot hybridization. *Archives of Virology*, 152, 489-494.
- Andret-Link, P. y M. Fuchs (2005). Transmission specificity of plant viruses by vectors. *Journal of Plant Pathology*, 87, 153-165.
- Antunes, T.F.S., R.J.V. Amaral, J.A. Ventura, M.T. Godinho, J.G. Amaral, F.O. Souza, P.A. Zerbini, F.M. Zerbini y P.M.B. Fernandes (2016). The dsRNA Virus Papaya meleira virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease. *PLoS ONE*. 11: e0155240.
- Araújo, M.M.M., E.T. Tavares, F.R. da Silva, V.L.A. Marinho y M.T. Souza (2007). Molecular detection of Papaya meleira virus in the latex of carica papaya by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 146, 305-310.
- Awmack, C.S. y S.R. Leather (2007). Growth and Development, en: Aphids as crop pests, van Emden, H. y R. Harrington. (ed). CAB International, Wallingford. pp. 135-151.
- Backus, E., M. Serrano, y C. Ranger (2005). Mechanisms of Hopperburn: An overview of insect taxonomy, behavior, and physiology. *Annual Review of Entomology*, 50, 125-151.
- Bacso, R., A. Kunstler y L. Kiraly (2016). Tobacco necrosis virus replication and spread in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia: a potential system for studying plant defense reactions to symptomless virus infections. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 1-7.

- Badillo, V.M. (1993). Caricaceae. Segundo Esquema. Revista de la Facultad de Agronomía, 43, 1-111.
- Basu, A.N. (1995). *Bemisia tabaci* (Gennadius) crop pest and principal whitefly vector of plant viruses. Westview Press, Oxford. pp. 22.
- Bedford, I.D., R.W. Briddon, J.K. Brown, R.C. Rosell y P.G. Markham (1994). Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology*, 125, 311-325.
- Bengyella, L., S.D. Waikhom, F. Allie y C. Rey (2015). Virus tolerance and recovery from viral induced-symptoms in plants are associated with transcriptome reprogramming. *Plant molecular biology*, 89, 243-252.
- Blackman, R.L. y V.F. Eastop (2000). *Aphids on the World's Crops. An Identification and Information Guide*. CAB International, Wallingford. pp. 104
- Blanc, S., M. Drucker y M. Uzest, (2014). Localizing Viruses in Their Insect Vectors. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 403-425.
- Bosco, D. y R. Tedeschi (2013). Insect vector transmission assays, en: *Phytoplasma: Methods and Protocols*, Dickinson, M. y J. Hodgetts. (ed). Humana Press, Totowa. pp. 73-85.
- Bosque-Pérez, N.A., y I.W. Buddenhagen (1999). Biology of *Cicadulina* leafhoppers and epidemiology of Maize streak virus disease in West Africa. *South African Journal of Plant and Soil*, 16, 50-55.
- Braendle, C., G.K. Davis, J.A. Brisson y D.L. Stern (2006). Wing dimorphism in aphids. *Heredity*, 97, 192-199.
- Brault, V., E. Herrbach y C. Reinbold (2007). Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron*, 38, 302-312.

- Brown, D.J. y S.A. MacFarlane (2001). 'Worms' that transmit viruses. *Biologist*, 48, 35-40.
- Carr, M.K.V. (2014). The water relations and irrigation requirements of papaya (*Carica papaya* L.): a review. *Experimental Agriculture*, 50, 270-283.
- Carvalho, F.A. y S.S. Renner (2012). A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65, 46-53.
- Chen, B. y R.I.B. Francki (1990). Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *Journal of General Virology*, 71, 939-944.
- Chen, Y., J. Evans y M. Feldlaufer (2006). Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92, 152-159.
- Conti, M. (1980). Vector relationships and other characteristics of barley yellow striate mosaic virus (BYSMV). *Annals of Applied Biology*, 95, 83-92.
- Correa, F.J.F., B.J.D.C. Franco, H.S. Watanabe, M.Y. Sakay y E.M.A. Yamashita (1988). Estudo preliminary sobre exsudacao do latex do mamoeiro-Teixeira de Freitas. 2º Simposio Brasileiro da Cultura do Mamoeiro. Jacoticabal: UNESP, 409-428.
- Coutts, B.A., M.A. Kehoe y R.A.C. Jones (2015). Minimising losses caused by Zucchini yellow mosaic virus in vegetable cucurbit crops in tropical, sub-tropical and Mediterranean environments through cultural methods and host resistance. *Virus Research*, 159,141-160.
- Cranston, P.S. y P.J. Gullan (2003). Phylogeny of insects, en: *Encyclopedia of Insects*, Resh, V.H. y R.T. Cardé. (ed). Academic Press, Burlington. pp. 780-793.
- Creamer, R., X. He y W.E. Styer (1997). Transmission of sorghum stunt mosaic rhabdovirus by the leafhopper vector, *Graminella sonora* (Homoptera: Cicadellidae). *Plant Dis.* 81:63-65.

- Cvrković, T., J. Jović, M. Mitrović, O. Krstić y I. Toševski (2014). Experimental and molecular evidence of *Reptalus panzeri* as a natural vector of bois noir. *Plant Pathology*, 63, 42-53.
- Czaplewski, C., Z. Grzonka, M. Jaskolski, F. Kasprzykowski y M. Kozk (1999). Binding modes of a new epoxysuccinyl-peptide inhibitory of cysteine proteases. Where and how do cysteine proteases express their selectivity? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1431, 290–305.
- Daltro, C. B., E. F. M., Abreu, F. J. L., Aragão, y E. C., Andrade (2014). Genetic diversity studies of Papaya meleira virus. *Tropical Plant Pathology*, 39 (1), 104-108.
- Dawson, W.O. y M.E. Hilf (1992). Host-range determinants of plant viruses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 527-55.
- Dietrich, C.H. (2013). Overview of the phylogeny, taxonomy and diversity of the leafhopper (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadomorpha: Membracoidea: Cicadellidae) vectors of plant pathogens, en: *Proceedings of the 2013 International Symposium on Insect Vectors and Insect-Borne Diseases*, Chang, C.J., C.Y. Lee y H.T.S. Hsien-Tzung. (ed). Taiwan Agricultural Research Institute, Taiwan. pp. 47-70.
- Doods, J.A., T.J. Morris y R.L. Jordan (1984). Plant viral double stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology*, 22, 1151-1168.
- Doyle, J.J. y J.L. Doyle (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19, 11-15.
- Duffus, J.E. (1987). Whitefly transmission of plant viruses. *Current Topics in Vector Research*, 4, 73-91.
- El Moussaoui, A., M. Nijs, C. Paul, R. Wintjens, J. Vincentelli, M. Azarkan y Y. Looze (2001). Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 556–570.

- FAOSTAT, 2018. Food and agriculture data. [Online] (Actualizado 2017)
Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
[Acceso 11 julio 2018].
- Folmer, O., W. Black, R. Hoeh y R. Vrijenhoek (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3, 294-299.
- Frank, D.L. y O.E. Liburd (2005). Effects of living and synthetic mulch on the population dynamics of whiteflies and aphids, their associated natural enemies, and insect-transmitted plant diseases in zucchini. *Environmental Entomology*, 34, 857-865.
- Franz, A., K.M. Makkouk y H.J. Vetten (1998). Acquisition, retention and transmission of Faba bean necrotic yellows virus by two of its aphid vectors, *Aphis craccivora* (Koch) and *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Journal of Phytopathology*, 146, 347-355.
- French, E., B.S. Kim y A.S. Iyer-Pascuzzi (2016). Mechanisms of quantitative disease resistance in plants. *Seminars in Cell y Developmental Biology*, 56, 201-208.
- Fukushi, T. (1935). Multiplication of virus in its insect vector. *Proceedings of the Japan Academy*, 11, 301-303.
- Galetto, L., D. Bosco, R. Balestrini, A. Genre, J. Fletcher y C. Marzachi (2011). The major antigenic membrane protein of 'Candidatus Phytoplasma asteris' selectively interacts with ATP synthase and actin of leafhopper vectors. *PLoS One* 6:e22571.
- Galvez, L.C., J. Banerjee, H. Pinar y A. Mitra (2014). Engineered plant virus resistance. *Plant Science*, 228, 11-25.
- Garcia-Arenal, F. y A. Fraile (2013). Trade-offs in host range evolution of plant viruses. *Plant Pathology*, 62, 2-9.
- Garcia-Camara, I., D. Perez-Brito, O.A. Moreno-Valenzuela, A. Magaña-Álvarez, P.M.B. Fernandes, R. Tapia-Tussell (2017). Molecular and experimental evidence of

- Watermelon (*Citrullus lanatus*) as host of the Mexican variant of Papaya meleira virus. *European Journal of Plant Pathology*, 151, 117-123.
- Gibbs, A.J., K. Ohshima, M.J. Phillips y M.J. Gibbs (2008). The prehistory of potyviruses: their initial radiation was during the dawn of agriculture. *PLoS ONE*, 3, e2523.
- Gildow, F.E. y S.M. Gray (1993). The aphid salivary gland basal lamina as a selective barrier associated with vector-specific transmission of Barley yellow dwarf luteoviruses. *Phytopathology*, 83, 1293-1302.
- Gill, R.J. (1990). The morphology of whiteflies, en: *Whiteflies, their Bionomics, Pest Status and Management*, Gerling D. (ed). Intercept Press, Andover. pp 13-46.
- Gingery, R.E., R.J. Anderson y M.G. Redinbaugh (2004). Effect of environmental conditions and leafhopper gender on Maize chlorotic dwarf virus transmission by *Graminella nigrifrons* (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*, 97, 768-773.
- Girousse, C., B. Moulia, W. Silk y J.L. Bonnemain (2005). Aphid Infestation Causes Different Changes in Carbon and Nitrogen Allocation in Alfalfa Stems as Well as Different Inhibitions of Longitudinal and Radial Expansion Plant Physiology. *Plant physiology*, 137, 1474-1484.
- Goggin, F.L. (2007). Plant-aphid interactions: Molecular and ecological perspectives. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 399-408.
- Govier, D.A. y B. Kassanis (1974). A virus induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations. *Virology*, 61, 420-426.
- Guzmán, E., R. Gómez, H.A.J. Pohlen, J.C. Álvarez, J.M. Pat y V. Geissen (2012). La producción de papaya en Tabasco y los retos del desarrollo sustentable. *El Cotidiano*, 147, 99-106.

- Hajano, J.U.D., H.B. Zhanga, Y.D. Renc, C.T. Luc y X.F. Wanga (2016). Screening of rice (*Oryza sativa*) cultivars for resistance to rice black streaked dwarf virus using quantitative PCR and visual disease assessment. *Plant Pathology*, 65, 1509-1517.
- Hamilton, K.J. y R.F. Whitcomb (2010). Leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae): a Major Family Adapted to Grassland Habitats, en: *Arthropods of Canadian Grasslands (Volume 1): Ecology and Interactions in Grassland Habitats*, Shorthouse, J.D. y K.D. Floate. (ed). Biological Survey of Canada Monograph Series, Ottawa. pp. 169–197.
- Hampton, R.O. y K.A. Weber (1983). Pea streak virus transmission from alfalfa to peas: colonies for ability to transmit PSV virus-aphid and virus-host relationships. *Plant Disease*, 67, 305-307.
- Harris, K.F. (1977). An ingestion-egestion hypothesis of non circulative virus transmission, en: *Aphids as Virus Vectors*, Harris, K.F. y K. Maramorosch. (ed). Academic press, New York. pp. 166-208.
- Hogenhout, S.A., D. Ammar, A.E. Whitfield y M.G. Redinbaugh (2008) Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 327-359.
- Hull, R. (2009). *Comparative Plant Virology*. Academic Press, San Diego. pp. 38-40.
- Jones, D.R. (2002). Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 195-219.
- Jones, R.A.C. (2014). Trends in plant virus epidemiology: Opportunities from new or improved technologies. *Virus Research*, 186, 3-19.
- Katis, N.I., J.A. Tsitsipis, M. Stevens y G. Powell (2007). Transmission of Plant Viruses, en: *Aphids as crop pests*, van Emden, H. y R. Harrington. (ed). CAB International, Wallingford. pp. 353-377.

- Kitajima, E.W., C.H. Rodrigues, J.S. Silveira, F.L. Alves, J.A. Ventura, F.J.L. Aragão y L.H.R. Oliveira (1993). Association of isometric virus like particles, restricted to laticifers, with “meleira” (“sticky disease”) of papaya (*Carica papaya*). *Fitopatologia Brasileira*, 18, 118-122.
- Kombrink, E. y E. Schmelzer (2001). The Hypersensitive Response and its Role in Local and Systemic Disease Resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 69-78.
- Lastra, R. y E. Quintero (1981). Papaya apical necrosis, a new disease associated with a rhabdovirus. *Plant Disease*, 65, 439-440.
- Liburd, O.E., T.W. Nyoike y J.M. Razzi (2008). Biology and Management of Aphids in Sustainable Field Production of Cucurbits. University of Florida's Institute of Food and Agricultural Sciences, Gainesville. pp. 3.
- Lima, R.C.A., J.A.A. Lima, M.T. Souza, G. Pio-Ribeiro y G.P. Andrade (2001). Etiology and control strategies of papaya virus diseases in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 26, 689-702.
- Liu, L., Q. Gu, R. Ijaz, J. Zhang y Z. Ye (2016). Generation of transgenic watermelon resistance to *Cucumber mosaic virus* facilitated by an effective *Agrobacterium*-mediated transformation method. *Scientia Horticulturae*, 205, 32-38.
- Lung, M.C.Y. y T.P. Pirone (1974). Acquisition factor required for aphid transmission of purified cauliflower mosaic virus. *Virology*, 60, 260-264.
- Maciel-Zambolim, E., S. Kunieda-Alonso, K. Matsuoka, M.G. De Carvalho, F.M. Zerbini (2003). Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. *Plant Pathology*, 52, 389-94.
- Malpica, J.M., S. Sacristan, A. Fraile y F. Garcia-Arenal (2006). Association and host selectivity in multi-host pathogens. *PLoS ONE* 1(1): e41.

- Mandadi, K.K. y K.G. Scholthof (2013). Plant Immune Responses Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease? *The Plant Cell*, 25, 1489-1505.
- Mandal, B., A.S. Csinos, N. Martinez-Ochoa y H.R. Pappu (2008). A rapid and efficient inoculation method for Tomato spotted wilt tospovirus. *Journal of Virological Methods*, 149, 195-198.
- Martorell, L.F. y J. Adsuar (1952). Insects associated with papaya virus diseases in the Antilles and Florida. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 36, 319-329.
- Ming, R., Q. Yu, P.H. Moore, R.E. Paull, N.J. Chen, M. Wang, Y.J. Zhu, M.A. Schuler, J. Jiang, A.H. Paterson (2012). Genome of papaya, a fast growing tropical fruit tree. *Tree Genetics y Genomes*, 8, 445-462.
- Morinaka, T., M. Putta, D. Chettanachit, A. Parejarearn, S. Disthaporn, T. Omura y H. Inoue (1982). Transmission of rice gall dwarf virus by cicadellid leafhoppers *Recilia dorsalis* and *Nephotettix nigropictus* in Thailand. *Plant Disease*, 66, 703-704.
- Mound, L.A. y S.H. Halsey (1978). Whiteflies of the world, a systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data. *British Museum (Natural History)*, London. pp. 124-135.
- Mukhopadhyay, S. (2010). Plant Virus Epidemiology and Ecology, en: *Plant Virus, Vector*, Mukhopadhyay, S. (ed). Science Publishers, New Hampshire. pp. 175-250.
- Nakagawa, J., Y. Takayawa, Y. Suzakawa (1987). Exsudacao do latex pelo mamoeiro: estudo da ocorrencia en Texeira de Freitas, BA, in: *Anais*, 9º, Congresso Brasileiro de Fruticultura, Campinas. pp. 555-559.
- Nault, L.R. (1997). Arthropod Transmission of plant viruses: A new synthesis. *Ann. Entomological Society of America*, 90, 521-541.

- Nault, L.R. y E.D. Ammar (1989). Leafhopper and planthopper transmission of plant-viruses. *Annual Review of Entomology*, 34, 503-29.
- Nault, L.R., R.E. Gingery y D.T. Gordon (1980). Leafhopper transmission and host range of Maize rayado fino virus. *Phytopathology*, 70, 709-712.
- Navas-Castillo, J., E. Fiallo-Olivé y S. Sánchez-Campos (2011). Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 219-248.
- Ng, J.C.K. y B.W. Falk (2006). Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 183-212.
- Ng, J.C.K. y K.L. Perry (2004). Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular plant pathology*, 5, 505-511.
- Nielson, M.W. (1968). The leafhopper vectors of phytopathogenic viruses (Homoptera: Cicadellidae) taxonomy, biology and virus transmission. United States Department of Agriculture. pp. 1-386.
- Nielson, M.W. y W.J. Knight (2000). Distributional patterns and possible origin of leafhoppers (Homoptera, Cicadellidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 17, 81-156.
- Olarte, X.A., G. Fermin y J. Tabima (2011). Phylogeography and molecular epidemiology of Papaya ringspot virus. *Virus Research*, 159, 132-140.
- Otsuki, N., N.H. Dang, E. Kumagai, A. Kondo, S. Iwata y C. Morimoto (2010). Aqueous extracts of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 760–767.
- Otulak, K., E. Koziel y G. Garbaczewska (2016). Ultrastructural Impact of Tobacco Rattle Virus on Tobacco and Pepper Ovary and Anther Tissues. *Journal of phytopathology*, 164, 226–241.

- Pagan, I., C. Alonso-Blanco y F. Garcia-Arenal (2008). Host responses in life-history traits and tolerance to virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Pathogens* 4(8): e1000124.
- Palacios, I., M. Drucker, S. Blanc, S. Leite, A. Moreno y A. Fereres (2002). Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *Journal of General Virology*, 83, 3163-3171.
- Pantoja, A., P. Follet y J.A. Villanueva (2002). Pests of Papaya, en: *Tropical Fruit Pests and Pollinators: Biology, Economic Importance, Natural Enemies and Control*, Peña, J., J. Sharp y M. Wysoki. (ed). CAB International, Londres. pp. 131-156.
- Parizipour, M.G., S.A.A. Behjatnia, A. Afsharifar y K. Izadpanah (2016). Natural hosts and efficiency of leafhopper vector in transmission of wheat dwarf virus. *Journal of Plant Pathology*, 98, 483-492.
- Pereira, A.J., P. Alfenas-Zerbini, R.S. Cascardo, E.C. Andrade y F. Murilo-Zerbini (2012). Analysis of the full-length genome sequence of papaya lethal yellowing virus (PLYV), determined by deep sequencing, confirms its classification in the genus *Sobemovirus*. *Archives of Virology*, 157, 2009–2011.
- Pérez-Brito, D., R. Tapia-Tussell, A. Cortés-Velázquez, A. Quijano-Ramayo, A. Nexticapan-Garcez, R. Martín-Mex (2012). First report of Papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. *African Journal of Biotechnology*, 11, 13564-13570.
- Perez-Cañamas, M., M. Blanco-Perez, J. Forment, C. Hernández (2017). *Nicotiana benthamiana* plants asymptotically infected by Pelargonium line pattern virus show unusually high accumulation of viral small RNAs that is neither associated with DCL induction nor RDR6 activity. *Virology*, 501, 136-146.
- Pirone, T.P. y S. Blanc (1996). Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 227-247.

- Pirone, T.P. y K.F. Harris (1977). Nonpersistent transmission of plant viruses by aphids. *Annual Review of Phytopathology*, 15, 55-73.
- Power, A.G. (2000). Insect transmission of plant viruses: a constraint on virus variability. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 336-340.
- Prendeville, H., X. Ye, J. Morris y D. Pilson (2012). Virus infections in wild plant populations are both frequent and often unapparent. *American Journal of Botany*, 99, 1033-1042.
- Pu, L., G. Xie, C. Ji, B. Ling, M. Zhang, D. Xu y G. Zhou (2012). Transmission characteristics of Southern rice black-streaked dwarf virus by rice planthoppers. *Crop Protection*, 41, 71-76.
- Quito-Avila, D.F., R.A. Alvarez, M.A. Ibarra y R.R. Martin (2015). Detection and partial genome sequence of a new umbra- like virus of papaya discovered in Ecuador. *European Journal of Plant Pathology*, 143, 199-204.
- Redak, R.A., A.H. Purcell, J.R.S. Lopes, M.J. Blua, R.F. Mizell y P.C. Andersen (2004). The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Review of Entomology*, 49, 243-270.
- Rees, A. R. (1970). Effect of heat-treatment for virus attenuation on tomato seed viability. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 45, 33-40.
- Reynaud, B. y M. Peterschmitt (1992). A study of the mode of transmission of MSV by *Cicadulina mbila* using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of Applied Biology*, 121, 85-94.
- Rodrigues, C.H., J.A. Ventura y L.A. Maffia (1989). Distribuição e transmissão da meleira em pomares de mamão no Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, 14, 118.
- Rodrigues, S.P., M. Da Cunha, J.A. Ventura y P.M.B. Fernandes (2009a). Effects of the Papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. *Plant Cell Reports*, 28, 861-871.

- Rodrigues, S.P., J.S. Andrade, J.A. Ventura, G.G. Lindsey y P.M.B. Fernandes (2009b). Papaya meleira virus is neither transmitted by infection at wound sites nor by the whitefly *Trialeurodes variabilis*. *Journal of Plant Pathology*, 1, 87-91.
- Roossinck, M.J. (2001). Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology*, 2, 59-63.
- Roossinck, M.J. (2015). Plants, viruses and the environment: ecology and mutualism. *Virology*, 479, 271-277.
- Rubio, L., J.R. Herrero, J. Sarrio, P. Moreno y J. Guerri (2003). A new approach to evaluate relative resistance and tolerance of tomato cultivars to begomoviruses causing the tomato yellow leaf curl disease in Spain. *Plant Pathology*, 52, 763-769.
- Saengyot, S. y I. Burikam (2011). Host plants and natural enemies of papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science*, 44, 197-205.
- Sánchez-Campos, S., J. Navas-Castillo, R. Camero, C. Soria, J.A. Díaz y E. Moriones (1999). Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology*, 89, 1038-1043.
- Sarwar, M. (2015). Mites (Acarina) as Vectors of Plant Pathogens and Relation of These Pests to Plant Diseases. *Agricultural and Biological Sciences Journal*, 1, 150-156.
- SENASICA, 2017. Amplificación de la región mtADN CO-I, para la identificación de insectos por PCR punto final. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. pp. 19.
- Seigler, D.S., G.F. Pauli, A. Nahrstedt y R. Leen (2002). Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. *Phytochemistry*, 69, 873-882.

- Shields, E.J. y A.M. Testa (1999). Fall migratory flight initiation of the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae): observations in the lower atmosphere using remote piloted vehicles. *Agricultural and Forest Meteorology*, 97, 317-330.
- SIAP, 2017. Agricultura [Online] (Actualizado 2017)
Disponibile en: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
[Acceso 20 mayo 2017].
- Soto, M.J., L.F. Chen, Y.S. Seo y R.L. Gilbertson (2005). Identification of regions of the Beet mild curly top virus (family Geminiviridae) capsid protein involved in systemic infection, virion formation and leafhopper transmission. *Virology*, 341, 257-270.
- Sylvester, E.S. (1956). Beet yellows virus transmission by the green peach aphid. *Journal of Economic Entomology*, 49, 789-800.
- Tagu, D., J. Klingler, A. Moya, J.C. Simon (2005). Early Progress in Aphid Genomics and Consequences for Plant–Aphid Interactions Studies. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 701-708.
- Tapia-Tussell, R., A. Magaña-Alvarez, A. Cortez-Velazquez., G. Itza-Kuk, A. Nexticapan-Garcez, A. Quijano-Ramayo, R. Martin-Mex y D. Perez-Brito (2015). Seed transmission of Papaya meleira virus in papaya (*Carica papaya*) cv. Maradol. *Plant Pathology*, 64, 272-275.
- Tavares, E.T., J.S. Tatagiba, J.A. Ventura y M.T. Souza (2004). Two new systems for early diagnosis of Papaya Sticky Disease. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 563–566.
- Todd, J.C., E.D. Ammar, M.G. Redinbaugh, C. Hoy y S.A. Hogenhout (2010). Plant host range and leafhopper transmission of Maize fine streak virus. *Phytopathology*, 100, 1138-1145.

- Tugume, A.K., S.B. Mukasa y J.P.T. Valkonen (2008). Natural wild hosts of Sweet potato feathery mottle virus show spatial differences in virus incidence and virus-like diseases in Uganda. *Phytopathology*, 98, 640-652.
- USDA, 2018. Food Composition Databases [Online] (Actualizado 2018)
Disponibile en: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>
[Acceso 11 julio 2018].
- Uzest, M., D. Gargani, M. Drucker, E. Hébrard, E. Garzo, T. Candresse, A. Fereres y S. Blanc (2007). A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 17959-17964.
- van den Heuvel, J.F., M. Verbeek y F. van der Wilk (1994). Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of Potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *The Journal of General Virology*, 75, 2559-2565.
- Vemana, K. y R.K. Jain (2010). New experimental hosts of Tobacco streak virus and absence of true seed transmission in leguminous hosts. *Indian Journal of Virology*, 21, 117-127.
- Ventura, J.A., H. Costa, J.S. Tatagiba, J.S. Andrade y D.S. Martins (2003). Meleira do mamoeiro: etiologia, sintomas e epidemiologia, en: *Papaya Brasil: Qualidade do mamão para o mercado interno*, Martins, D.S. (ed). INCAPER, Vitória. pp. 267-276.
- Ventura, J.A., H. Costa y J.S. Tatagiba (2004). Papaya Diseases and Integrated Control, en: *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II*, Naqvi, S.A.M.H. (ed). Springer, Dordrecht. pp. 201-268.
- Vidal, C.A., F.F. Laranjeira, A.S. Nascimento y T.C. Habibe (2004). Distribuição Espacial da Meleira do Mamoeiro em Zonas de Trópico Úmido e Trópico Semi-Árido. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 276-281.

- Vidal, C.A., A.S. Nascimento y T.C. Habibe (2005). Transmissão do vírus da meleira do mamoeiro (papaya sticky disease virus) por insectos. *Magistra*, Cruz das Almas-BA, 17, 101-106.
- Vidal, C.A., A.S. Nascimento y T.C. Habibe (2003). Transmissão do vírus da meleira do mamoeiro por insetos, en: *Papaya Brasil: Qualidade do Mamão Para o Mercado Interno*, Martin, D.S. (ed). Incaper, Vitória. pp. 612-615.
- Vidal, C.A., A.S. Nascimento, C.J. Barbosa, O.M. Marques y T.C. Habibe (2000). Experimental transmission of “sticky disease” of papaya by *Bemisia argentifolli* (Bellows y Perring), en: *21st International Congress of Entomology*, Foz do Iguaçu. pp. 819.
- Wang, M.B., C. Masuta, N.A. Smith y H. Shimura (2012). RNA silencing and plant viral diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 25, 1275-1285.
- Wang, H., P.A Gurusinge y B.W. Falk (1999). Systemic insecticides and plant age affect beet curly top virus transmission to selected host plants. *Plant Disease*, 83, 351-355.
- Wang, Y., Q. Mao, W. Liu, T. Mar, T. Wei, Y. Liu y X. Wang (2014). Localization and distribution of wheat dwarf virus in its vector leafhopper, *Psammotettix alienus*. *Phytopathology*, 104, 897-904.
- Watanabe, S., D. Borthakur y A. Bressan (2013). Lack of evidence for an interaction between *Buchnera GroEL* and Banana bunchy top virus (Nanoviridae). *Virus Research*, 177, 98-102.
- Watson, M.A. y F.M. Roberts (1939). A comparative study of the transmission of *Hyoscyamus virus 3*, *Potato virus Y* and *Cucumber virus 1* by the vectors *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflex* (Buckton), and *Macrosiphum gei* (Koch). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 127, 543-576.

- Weber, K.A. y R.O. Hampton (1980). Transmission of two purified carlaviruses by the pea aphid. *Phytopathology*, 70, 631-633.
- Wei, T., H. Chen, T. Ichiki-Uehara, H. Hibino y T. Omura (2007). Entry of Rice dwarf virus into cultured cells of its insect vector involves clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology*, 81, 7811-7815.
- Williams, I.S. y A.F.G. Dixon (2007). Life cycles and polymorphis, en: *Aphids as crop pests*, van Emden, H. y R. Harrington. (ed). CAB International, Wallingford. pp. 69-86.
- Wylie, S.J., M. Adams, C. Chalam, J. Kreuze, J.J. López-Moya, K. Ohshima, S. Praveen, F. Rabenstein, D. Stenger, A. Wang, F.M. Zerbini y ICTV Report Consortium (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae. *Journal of General Virology*, 98, 352-354.
- Yamashita, S., Y. Doi y K. Yora (1977). Some Properties and Intracellular Appearance of Rice Waika Virus. *Japanese Journal of Phytopathology*, 43, 278-290.
- Yang, X., T. Zhang, B. Chen y G. Zhou (2017). Transmission biology of Rice stripe mosaic virus by an efficient insect vector *Recilia dorsalis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-7.
- Zahniser, J.N. y C.H. Dietrich (2013). A review of the tribes of Deltocephalinae (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae). *European Journal of Taxonomy*, 45, 1-21.
- Zamudio-Moreno, E., J.H. Ramírez-Prado, O.A. Moreno-Valenzuela y L.A. López-Ochoa (2015). Early diagnosis of a Mexican variant of Papaya meleira virus (PMeV-Mx) by RT-PCR. *Genetics and Molecular Research*, 14, 1145-1154.
- Zerbini, F.M., R.W. Briddon, A. Idris, D.P. Martin, E. Moriones, J. Navas-Castillo, R. Rivera-Bustamante, P. Roumagnac, A. Varsani y ICTV Report Consortium

(2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. *Journal of General Virology*, 98, 131–133.