CICY

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Estudio de la expresión diferencial de genes involucrados en la respuesta de *Carica papaya* al virus de la meleira y de las alteraciones nanoestructurales en hojas y látex.

Tesis que presenta

ANUAR AHMED MAGAÑA ÁLVAREZ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Febrero del 2017

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CICY

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Anuar Ahmed Magaña Álvarez, titulado "Estudio de la expresión diferencial de genes involucrados en la respuesta de *Carica papaya* al virus de la meleira y de las alteraciones nanoestructurales en hojas y látex." fue realizado en el laboratorio GeMBio del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Fitopatología Molecular, bajo la codirección del Dr. Inocencio Higuera Ciapara y la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito, dentro de la Opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro. Así mismo, parte de este trabajo fue llevado a cabo en el Núcleo de Biotecnología, de la Universidad Federal de Espíritu Santo en Brasil, bajo la asesoría de la Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes.

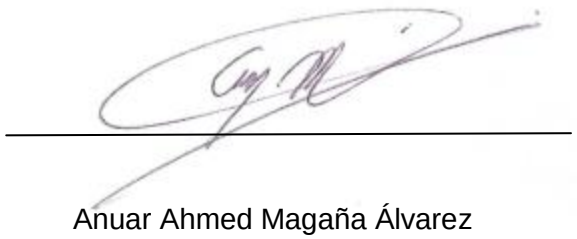
Atentamente:

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México; a 13 de Febrero del 2017

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 en el Núcleo de Biotecnología de la Universidade Federal do Espírito Santo en Brasil, 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 y Universidad. 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 a la Universidad Federal de Espíritu Santo en Brasil, y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán 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



Anuar Ahmed Magaña Álvarez

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Inocencio Higuera Ciapara, por su valiosa asesoría en la elaboración de la tesis, por todo su apoyo y por la confianza brindada.

A la Dra. Daisy Pérez Brito, por su asesoría en la elaboración, redacción y revisión de este trabajo, así como por su dirección en el establecimiento de las metodologías empleadas.

A la Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes, por la asesoría para la elaboración de esta tesis, por su dirección en el establecimiento de las metodologías empleadas y por su inmenso apoyo durante la estancia de investigación, realizada en Brasil.

Al Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes, por su asesoría en el uso del Microscopio de Fuerza atómica y por su ayuda en la interpretación de los datos, asi como su gran apoyo durante mi estancia en Brasil.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell, por su inmensa ayuda en la fase experimental de este trabajo, así como en la redacción y revisión de la tesis.

Al Dr. Rafael Antonio Rojas Herrera, por su valioso apoyo durante todo mi proceso académico y por sus enseñanzas.

Al Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández y al Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela por su gran ayuda y sus valiosos comentarios sobre la tesis, así como sus consejos durante mi proceso académico.

A la Dra. Laura Silva Rosales, por su gentil apoyo y asesoría durante la estancia realizada en el “Laboratorio de Interacciones Planta-Virus” del CINVESTAV Unidad Irapuato.

Al Dr. Eduardo de Almeida Soares y a la Dra. Tathiana Ferreira Sá Antunes, por su inestimable ayuda y asesoría durante mi estancia en Brasil.

Al M. C. Jean · Jean Carlos Vencioneck Dutra y al Biol. Tarcio Carneiro, por su inmenso apoyo en la elaboración del artículo científico.

A la M. C. Leidy J. Madroñero, por su gran amistad y apoyo durante mi estancia.

A Sinara Dias, por su apoyo y consejos durante mi estancia en Brasil.

A Yuliana Acosta Mex, por su apoyo, consejos y motivación en esta travesía.

Al I.Q.I. Alberto Cortés Velázquez, por su apoyo técnico en la fase experimental y en la fase de campo, así como sus comentarios en el escrito del documento y de la presentación.

A los M. C. Ángel Nexticapán Garcés, M.C. Andrés Quijano Ramayo, Al M. C. Rodolfo Martín Mex, por la asesoría sobre el manejo integrado de plagas durante todos los experimentos, así como los comentarios en la elaboración de esta tesis.

A la LAE. Bertha Arely Ramírez González, por su gentil apoyo en la estructuración electrónica de este trabajo.

A la M. C. Teresita de Jesús Valencia Yah, por su apoyo en el diseño de la presentación y consejos durante el doctorado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., en especial al laboratorio GeMBio, por proporcionarme los equipos y materiales necesarios en el desarrollo del trabajo.

Al posgrado en Ciencias Biológicas, opción Biotecnología, por su inmenso apoyo, durante mi formación académica.

Al Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio de la Universidade Federal do Espiríto Santo, por proporcionar las instalaciones y el equipo de microscopía de fuerza atómica, así como su apoyo durante mi estancia.

Al Programa de pós-graduação em biotecnología de la Universidade Federal do Espiríto Santo, por el apoyo recibido durante mi estancia académica realizada en Brasil.

A los proyectos, Genômica, Proteômica e Metabolômica relacionada aos mecanismos de resistência de fruteiras tropicais a fitopatógenos" aprovado no EDITAL CNPq/FAPES Nº

012/2009 – PRONEX, processo nº 48497231/10; "Genômica, proteômica e metabolômica relacionada aos mecanismos de resistência de fruteiras tropicais a fitopatógenos" aprovado no Edital UFES 08/2012 - Fomento à Cooperação Internacional; "Análise Comparativa do vírus causador da meleira do mamoeiro no Brasil e no México para a Obtençao de cultivares resistentes" aprovado no Edital UFES 03/2014 - Fomento à Cooperação Internacional y al Proinnova Num. 209868, por el financiamiento otorgado para el desarrollo de está tesis y durante mi estancia académica en Brasil.

A CONACYT, por la beca de manutención número **255389** y por la beca mixta otorgada durante mi estancia en el extranjero.

A la Beca-Movilidad 2015 del CICY, por el apoyo económico otorgado durante mi estancia en el CINVESTAV, Unidad Irapuato.

A mi Comité Tutoral: Dr. Inocencio Higuera Ciapara, Dra. Daisy Pérez Brito, Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes, Dr. Raúl Tapia Tussell y Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela, por las observaciones y comentarios realizados en todo el proceso de la tesis.

A mi comité predoctoral: Dr. Inocencio Higuera Ciapara, Dra. Daisy Pérez Brito, Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes, Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández, Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela, Dr.Rafael Antonio Rojas Herrera y el Dr. Raúl Tapia Tussell, por sus comentarios para el fortalecimiento de mi desarrollo académico.

A mi Comité Revisor: Dr. Inocencio Higuera Ciapara, Dra. Daisy Pérez Brito, Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes, Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández, Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela, Dr.Antonio Alberto Ribeiro Fernandes y el Dr. Raúl Tapia Tussell, por la atenta lectura de este trabajo y por sus atinadas correcciones.

A todos los integrantes del laboratorio GeMBio.

A todos los que de una forma u otra han contribuido a la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres y a mi gran familia…

ÍNDICE GENERAL

RECONOCIMIENTO II

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **XIII**

ÍNDICE DE CUADROS ..... **XVI**

ABREVIATURAS ..... **XVII**

RESUMEN ..... **IX**

ABSTRACT ..... **X**

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES GENERALES **1**

1.1. INTRODUCCIÓN 1

1.2. CULTIVO DE PAPAYA EN MÉXICO 4

1.3. PRODUCCIÓN DE PAPAYA EN EL MUNDO Y EN MÉXICO 4

1.4. PROBLEMÁTICA FITOSANITARIA Y VIRUS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE *C. PAPAYA* 5

1.4.1. Papaya Ringspot Virus (PRSV) *6*

1.4.2. Papaya lethal yellowing virus (PLYV) *7*

1.4.3. Papaya apical necrosis virus (PANV) *8*

1.4.4. Papaya meleira virus *9*

1.5. PAPAYA MELEIRA VIRUS, ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN. 9

1.5.1. Etiología *10*

1.5.2. Síntomas *11*

1.5.3. Distribución del PMeV *12*

1.5.4. Transmisión del PMeV. *13*

1.6. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS A PATÓGENOS 13

1.7. MECANISMOS DE DEFENSA PASIVA O PREFORMADA 14

1.8. MECANISMO DE DEFENSA ACTIVA 14

1.8.1. Respuesta hipersensible (HR) *15*

1.8.2. Resistencia sistémica adquirida (SAR) *16*

1.8.3. Proteínas relacionadas con patogénesis (PR) *17*

1.8.4. Mecanismo de infección del PMeV *18*

1.9. ESTUDIOS DE LA INTERACCIÓN ENTRE *C. PAPAYA* Y EL PMEV 20

1.10. ESTUDIOS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN PLANTAS 22

1.11. ESTUDIOS DE ALTERACIONES A NIVEL HISTOLÓGICO EN PLANTAS COMO RESPUESTA AL ATAQUE DE FITOPATÓGENOS 25

1.12. HIPÓTESIS 26
1.13. OBJETIVOS 27
1.13.1. General *27*
1.13.2. Específicos *27*
1.14. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 28
1.14.1. Estudio de los niveles de expresión de genes relacionados con patogénesis en C. papaya variedad Maradol infectada con PMeV *28*
1.14.2. Análisis de las alteraciones físicas en hojas y látex de papaya infectada con PMeV *29*
1.15. JUSTIFICACIÓN 30
CAPÍTULO 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESION DIFERENCIAL DE GENES INVOLUCRADOS EN EL MECANISMO DE DEFENSA DE *C. PAPAYA* INFECTADA CON EL *PAPAYA MELEIRA* VIRUS (PMEV) **31**
2.1. INTRODUCCIÓN 31
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS 32
2.2.1. Material Vegetal *32*
2.2.1.1. Selección y germinación de semillas 32
2.2.2. Inoculación de las plantas con látex de plantas enfermas y colecta de muestras *32*
2.2.3. Extracción de RNA *33*
2.2.4. Síntesis de cDNA (Transcripción Reversa) *33*
2.2.5. Determinación del mejor gen candidato de referencia para el análisis de expresión *33*
2.2.6. Análisis de la expresión génica por RT- PCRq *35*
2.2.7. Método para la determinación de la expresión relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *36*
2.3. RESULTADOS 38
2.3.1. Análisis y determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos *38*
2.3.2. Análisis de la expresión de genes *43*
2.3.3. Mapas de calor *48*
2.4. DISCUSIÓN 52
CAPÍTULO 3. PHYSICAL CHARACTERISTICS OF THE LEAVES AND LATEX OF PAPAYA PLANTS INFECTED WITH THE PAPAYA MELEIRA VIRUS. **59**
3.1. ABSTRACT 60
3.2. INTRODUCTION 61
3.3. RESULTS 62

3.3.1. Topographical Analysis of the Leaf Midribs and Latex *62*
3.3.2. Mechanical properties of the Leaf midribs and Latex *64*
3.3.3. Latex examination by Scanning Electron Microscopy (SEM) *66*
3.4. DISCUSSION 67
3.5. MATERIALS AND METHODS 70
3.5.1. Leaf Midrib and Latex Collection *70*
3.5.2. Image Acquisition *70*
3.5.3. Statistical Analysis *71*
3.6. ACKNOWLEDGMENTS 71
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES 73
4.1. DISCUSIÓN GENERAL 73
4.2. CONCLUSIONES 77
4.3. PERSPECTIVAS 78
4.4. REFERENCIAS 79
4.5. ANEXOS 99
4.5.1. Anexo 1. ..... *99*
4.5.2. Anexo 2. ..... *100*
4.5.3. Anexo 3 ..... *101*

Índice de figuras

Figura 1-1 *Principales síntomas del PMeV: a) Exudación espontánea; b) Frutos Manchados; c) pequeñas manchas en la pulpa; d) Manchas necróticas en el peciolo.* *12*

Figura 2-1 *Curva de amplificación y curva de disociación de los genes de referencia endógenos candidatos. A) Gen ACTIN. B) Gen B4FP. C) Gen eIF4. D) Gen CYP.* *39*

Figura 2-2 *Valores de la estabilidad de los genes candidatos de referencia de acuerdo al índice Best Keeper*..... *41*

Figura 2-3 *Valores promedios de la estabilidad de los genes candidatos de referencia con el índice geNorm.* *42*

Figura 2-4 *Valores de la estabilidad de los genes candidatos de referencia con el índice RefFinder* *43*

Figura 2-5 *Cuantificación de la expresión relativa del gen PR1 de C. papaya en los diferentes días posteriores a la inoculación (dpi). Las barras representan el error estándar*..... *44*

Figura 2-6 *Cuantificación de la expresión relativa del gen PR5 de C. papaya en los diferentes días posteriores a la inoculación (dpi). Las barras representan el error estándar.* *45*

Figura 2-7 *Cuantificación de la expresión relativa del gen PR5 de C. papaya en los diferentes días posteriores a la inoculación (dpi). Las barras representan el error estándar.* *46*

Figura 2-8 *Cuantificación de la expresión relativa del gen POD de C. papaya en los diferentes días posteriores a la inoculación (dpi). Las barras representan el error estándar.* *47*

Figura 2-9 *Cuantificación de la expresión relativa del gen POD-12 de C. papaya en los diferentes días posteriores a la inoculación (dpi). Las barras representan el error estándar.* *48*

Figura 2-10 *Mapa de calor de la expresión relativa de los genes PR y POD en los diferentes días posteriores a la inoculación de PMeV en C. papaya.* *49*

Figura 2-11 *Comparación de la presencia de los A) síntomas de la enfermedad de la meleira durante los días posteriores a la inoculación y B) la expresión relativa de los genes analizados.* *51*

Figura 3-1 *Representative two-dimensional atomic force microscopy (AFM) images and roughness profiles of the papaya leaf midribs (**A**,**B**) and latex (**C**,**D**) of healthy (**A**,**C**) and PMeV-infected papaya plants (**B**,**D**). Superficial differences between the samples from the healthy and infected*

plants. The infected samples exhibit valleys (red arrows) and peaks (blue arrows) that were not observed in the samples from the healthy plants. *62*

Figura 3-2 *Representative three-dimensional AFM images of the leaf midribs (**A**,**B**) and latex (**C**,**D**) of healthy (**A**,**C**) and PMeV-infected papaya plants (**B**,**D**). The microstructures of the healthy leaf midribs and latex (**A**, **C**) show smooth surfaces, whereas the infected leaf midribs and latex have rough surfaces (**B**,**D**).* *63*

Figura 3-3 *Structural roughness parameter Ra of the leaf midribs (**A**) and latex (**B**) of healthy and diseased papaya plants. The roughness (Ra) is the arithmetic mean of the deviations in the profile curve with respect to the midline of the basic length. The error bars represent the variations between biological replicates. The difference between the means is statistically significant (Mann–Whitney test, p < 0.05).* *64*

Figura 3-4 *AFM maps and histograms of the adhesion force between the tip and the sample surface of the leaf midribs (**A**,**B**) and latex (**C**,**D**) of healthy (**A**,**C**) and diseased papaya plants (**B**,**D**). The vertical axis shows the frequency of the adhesion force in a 1000-nm lateral scan of 256 force curves, and the insets are the corresponding force maps.* *65*

Figura 3-5 *Average adhesion forces of the leaf midribs (**A**,**B**) and latex (**C**,**D**) of healthy (**A**,**C**) and PMeV-infected papaya plants (**B**,**D**). The graphs show that the midribs and latex of the healthy plants have a greater adhesion force than those from the infected plants. The error bars represent the variations between biological replicates. The difference between means is statistically significant (Mann–Whitney test, p < 0.05).* *66*

Figura 3-6 *Scanning electron microscopy (SEM) images of the latex from healthy (**A**) and PMeV-infected papaya fruits (**B**). The samples of healthy plants' latex shows more united and compact latex particles than those from infected plants, which appeared relatively sparse.* *67*

Figura 3-7 *High-magnification SEM images of the latex of (**A**) healthy and (**B**) and PMeV-infected papaya fruits. In the infected latex small circles ranging from 40 to 50 nm, alterations in the structure of the latex and possible latex degradation are evident; these alterations were not observed in healthy latex.* *67*

Figura 4-1 *Diagnóstico molecular del látex inoculado en las plantas. MM: Marcado molecular de 1kb. Línea 1: RNA viral del látex inoculado en las plantas mostrando las dos bandas correspondientes al PMeV (8 Kb) y PMeV2 (4.5 Kb); Línea 2: Amplificación del RNA del látex inoculado obtenida con los iniciadores CB38/CB39. Tamaño del amplicon de aprox. 500 pb correspondiente al PMeV.* *99*

Figura 4-2 *Diagnóstico molecular con los iniciadores CB38/CB39 de las plantas utilizadas en este estudio, en los diferentes días posteriores a la inoculación (dpi). Tamaño del amplicón de aprox. 500 pb correspondiente al PMeV.* 100

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1-1 *Principales Estados productores de papaya en México hasta el 2016 (SIAP, 2016). 5*

Cuadro 1-2 *Proteínas relacionadas con patogénesis y su función. 17*

Cuadro 2-1 *Genes de referencia (housekeeping) usados en este trabajo. 34*

Cuadro 2-2 *Genes de C. papaya para el análisis de la expresión diferencial por RT-PCRq. 36*

Cuadro 2-3 *Análisis estadístico con el "índice CP de Best keeper" 40*

Cuadro 2-4 *Valor de M de cada de los genes de referencia calculados por GeNorm 42*

Cuadro 4-1 *Detección y cuantificación absoluta del PMeV por PCRq en los días posteriores a la inoculación (dpi). 101*

ABREVIATURAS

RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
PMeV	Papaya Meleira Virus
PCRq	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa
RNAds	Ácido ribonucleico de doble cadena
Kda	KiloDalton
Nm	nanómetros
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
µL	microlitro
mL	mililitros
mM	milimolar
µM	micromolar
p/v	Peso/volumen
cDNA	DNA complementario

RESUMEN

México es uno de los principales productores y exportadores de papaya a nivel mundial. Este cultivo es afectado por la enfermedad conocida como Meleira de la papaya, cuyos síntomas provocan la pérdida del valor comercial de los frutos. El agente causal de esta enfermedad es el *Papaya Meleira Virus* (PMeV) que sólo ha sido reportado en Brasil y México, donde ha causado grandes pérdidas. Aunque se han hecho varios estudios epidemiológicos, todavía no hay suficiente información sobre la interaccion del virus con la papaya a nivel genético y nanoestructural que sustente la implementación de programas de mejoramiento genético y de control efectivo de la enfermedad. Para este estudio se inocularon en condiciones controladas plantas de papaya Maradol con látex infectado con PMeV y se tomaron muestras a los 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 45 días después de la inoculación (dpi). Se evaluaron la expresión de los genes relacionados con patogénesis (*PR)* y peroxidasas (*POD)*, así como las alteraciones nanoestructurales en hojas y latex mediante microscopia de fuerza atómica. Se demostró que el PMeV induce la expresión de los genes *PR* y *POD a* partir de los 10 dpi y que los máximos niveles de expresión se obtienen a los 20 dpi, por lo que se considera que estos genes están involucrados en los mecanismos de defensa de la planta. También se demostró que el PMeV provoca alteraciones naoestructurales en las hojas y latex de papaya.

ABSTRACT

Mexico is among the main producers and exporters of papaya worldwide. This crop is severely affected by the disease known as *sticky disease* or *Meleira*, which symptoms cause the loss of the commercial value of the fruits. The causal agent of this disease is the *Papaya Meleira Virus* (PMeV) which has only been reported in Brazil and Mexico, where it has caused great losses. Although several epidemiological studies had been accomplished, up to this moment there isn't information enough on the interaction virus-papaya at genic and nanostructural levels, for sustaining the implementation of genetic melioration and effective control of the disease. For this study, Maradol papaya plants were inoculated under controlled conditions with PMeV infected latex and samples were taken at 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 45 days post inoculation (dpi). The expression of genes related to pathogenesis (PR) and and peroxidases (POD), as well as nanostructural alterations in leaves and latex were evaluated by atomic force microscopy. It was demonstrated that PMeV induced the expression of the PR and POD genes from 10 dpi and the maximum expression levels were attained at 20 dpi, so it is considered these genes are involved in the defense mechanisms of this plant. It was also demonstrated that PMeV causes non-structural alterations in the leaves and latex of papaya.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. Introducción

En México, el cultivo de papaya es atractivo para el agricultor, por su rentabilidad, período corto entre siembra y cosecha, así como su alto rendimiento por hectárea. Sin embargo, la producción de esta fruta es afectada por diversos problemas fitosanitarios, entre los cuales destacan las enfermedades ocasionadas por virus. Dentro de éstas, la Meleira o *sticky disease,* sobresale por sus daños a la calidad de la fruta y por las pérdidas en cosecha que ha ocasionado en los dos países donde se ha reportado (Brasil y México) (Ventura, 2004; Araujo *et al.,* 2007; Pérez-Brito *et al*., 2012).

El PMeV fue descrito inicialmente como un virus con un genoma de RNA de doble cadena (dsRNA), con un tamaño aproximado de 12 Kb (Kitajima *et al*, 1993; Maciel-Zambolim *et al.*, 2003). Sin embargo, recientemente ha sido reportado en Brasil, que la meleira es causada por dos virus: "PMeV" que tiene similitud con miembros de la familia *Totiviridae,* y cuyo genoma es de 8 Kb, y "PMeV2" que es un Umbravirus, con un genoma de RNA de cadena sencilla (ssRNA), con un tamaño aproximado de 4.5 Kb (Sá-Antunes *et al.,* 2016). En México, aunque se han encontrado los dos genomas mencionados, aún no se ha llevado a cabo la secuenciación del PMeV variante mexicana (PMeV-Mx) (Zamudio-Moreno *et al.,* 2015).

Se considera que las prácticas agrícolas, principalmente durante el mantenimiento del cultivo y la cosecha de los frutos, son responsables de la propagación de la enfermedad dentro de los huertos, dado que la dispersión de la meleira generalmente se produce a lo largo de las líneas del cultivo (Ventura *et al.,* 2004; Abreu *et al.,* 2015).

Se han hecho algunos estudios epidemiológicos para determinar las formas de transmisión del PMeV, en ellos, la posible participación de insectos como vectores, se ha considerado sobre la base de estudios iniciales, sobre el patrón de propagación en campo de esta enfermedad, especialmente con evidencia de la existencia de un vector aéreo asociado con la misma (Rodrigues *et al.* 1989; Vidal *et al.,* 2005). Además, este virus se

encuentra en las semillas y puede ser transmitido a la siguiente generación a través de semillas contaminadas (Tapia-Tussell *et al.,* 2014). También existe un estudio preliminar que evaluó el rango de posibles hospedadores de PMeV, en el cual se detectó la presencia de RNAds viral, con un peso molecular similar al PMeV, en la especie *Brachiaria decumbens* de la familia *Poaceae*, en huertos de papaya afectados por meleira en Brasil (Maciel-Zambolin *et al.,* 2003).

En cuanto a la interacción hospedero-patógeno, a nivel molecular, se realizaron estudios proteómicos en hojas y látex de *C. papaya* variedad Golden, donde se identificaron 122 proteínas en el látex, que se relacionaron con la respuesta de la planta al estrés ocasionado por el PMeV, y se encontró que la actividad proteolítica del látex se redujo debido a la disminución de las proteasas-cisteínas (quimiopapayina) (Rodrigues *et al*., 2012).

Posteriormente, en plantas de papaya variedad Golden, infectadas con PMeV se identificaron un total de 462 microRNAs, de los cuales, once, estaban implicados en la degradación del proteosoma y se observó que su expresión varió inversamente proporcional a la concentración del virus, esto es, que aumentó en respuesta a bajos títulos virales en la planta (Abreu *et al.,* 2014).

Así mismo, al analizar los cambios químicos y bioquímicos en el látex de papayas var. Golden, enfermas con meleira, se determinó que la disminución del contenido de azúcares y el aumento en el agua de los conductos laticíferos, alteran la morfología del látex infectado, lo que ocasiona la exudación espontánea en el fruto (Rodrigues *et al.,* 2009).

Sin embargo, hasta la fecha, en nuestro conocimiento, no existe un trabajo que analice, a nivel nanoestructural, los cambios mecánicos y superficiales que puedan presentarse en las hojas y el látex de plantas de papaya infectadas con PMeV.

Sin embargo, hasta la fecha, en nuestro conocimiento, no existen trabajos de este tipo en la var. Maradol, que es la más cultivada en México, y cuyos síntomas ante la infección con

PMeV difieren en cierta medida con los observados en la var. Golden de Brasil. De acuerdo a lo anterior, se necesitan más estudios sobre la enfermedad de la Meleira, desde el punto de vista de la respuesta de la planta a la infección, por lo que es de suma importancia conocer los genes que se expresan y se relacionan con los mecanismos de defensa de la planta ante este virus. Por ello, el presente trabajo se enfocó en conocer la expresión de los genes involucrados en los mecanismos de defensa de *C. papaya* ante la meleira, así como las alteraciones nanoestructurales que se presentan en el látex y las hojas ante la infección viral, esto con la finalidad de entender de una mejor manera los mecanismos de defensa de la planta, lo cual ayudará a los fitomejoradores en la búsqueda de nuevas variedades con resistencia a este virus, y permitirá a los productores implementar estrategias de manejo fitosanitario enfocadas al control y a la prevención de la diseminación de la meleira de la papaya.

1.2. Cultivo de papaya en México

La papaya (*Carica papaya* L.) es una planta dicotiledónea y polígama, ya que puede presentar flores masculinas, femeninas y hermafroditas en una misma planta. Esta especie es originaria de América Central y del sur de México (Malo *et al.,* 1994).

Esta especie pertenece a la familia *Caricaceae,* que está formada por seis géneros, dentro de los cuales destaca el género *Carica,* por ser el más importante a nivel económico y C. *papaya* por ser la especie del mismo más cultivada a nivel mundial (Nishijima *et al.* 1998).

La importancia económica del cultivo de papaya, se debe a la demanda que tiene su fruto para consumo en estado fresco (la mayor parte de la producción) o en forma procesada tales como: jugos, mermeladas, entre otros. También de esta planta se puede extraer la papaína, enzima proteolítica, que es utilizada en la industria alimenticia como ablandador de carnes, y para la clarificación de la cerveza y otras bebidas. En los laboratorios oftalmológicos se aprovecha para elaborar un producto para la limpieza de lentes de contacto (Pantoja *et al*., 2002). Así mismo, de los tallos y las hojas se obtienen pequeñas cantidades de carpaína (alcaloide estimulante del ritmo cardíaco) que se emplea en la industria farmacéutica, donde además se elaboran otros productos para tratar males hepáticos, problemas digestivos y dolores lumbares. También en la industria cosmética, se aprovecha su poder cicatrizante y para desmanchar (Mandujano, 2007).

1.3. Producción de papaya en el mundo y en México

La producción de papaya en el mundo se estima en alrededor de 12 millones de toneladas por año, y los principales países productores son India, Brasil, Indonesia, Republica Dominicana, Nigeria y México (FAOSTAT, 2016).

Entre los países con mayor volumen de exportación de esta fruta, destacan México y Brasil, ubicandose el primero, como el principal país exportador de papaya en el mundo (SIAP, 2016), lo cual le da sustento aproximadamente a mil productores que se dedican a

este cultivo. Los principales estados productores de papaya en México se poresentan a continuación (Cuadro 1.1).

Cuadro 1-1 Principales Estados productores de papaya en México hasta el 2016 (SIAP, 2016).

Posición	Estado	Producción (Miles de pesos)
1	Oaxaca	1,266,257.71
2	Chiapas	707,369.48
3	Colima	582,240.50
4	Veracruz	377,706.27
5	Michoacán	224,174.65
6	Guerrero	179,838.57
7	Jalisco	140,303.14
8	Quintana Roo	100,816.72
9	Campeche	99,188.26
10	Yucatán	82,005.48

1.4. Problemática fitosanitaria y virus que afectan al cultivo de *C. papaya*

La producción de papaya a nivel mundial se enfrenta a diversos factores que afectan la plantación y la calidad de los frutos poscosecha, principalmente los de carácter fitosanitario, destacando las pérdidas ocasionadas por hongos, virus, bacterias y plagas (Ventura *et al.*, 2004).

En lo que respecta a los virus en papaya, estos pueden causar graves reducciones en la producción y pueden llegar a devastar la plantación. En la actualidad, en todo el mundo, se han reportado más de diez diferentes virus en el cultivo de papaya, pero sólo a cuatro

de éstos se les considera de mayor importancia: el virus de la mancha anular de la papaya o *Papaya ringspot virus* (PRSV), el virus del amarillamiento letal de la papaya o *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), el virus de la necrosis apical o *Papaya apical necrosis virus* (PANV) y el virus que causa la enfermedad conocida como meleira (PMeV). (Ventura *et al*., 2004).

1.4.1. Papaya Ringspot Virus (PRSV)

El *Papaya Ringspot Virus* está clasificado dentro de la familia *Potyviridae*, género *Potyvirus*, este virus afecta tanto a papaya como a cucurbitáceas. Existen dos variantes del mismo: una es la variante del *PRSV*-P que infecta tanto a papaya como cucurbitáceas y la otra es la variante *PRSV-W* que sólo afecta a las cucurbitáceas, pero no a la papaya. El genoma del *PRSV* es de RNA monocatenario de sentido positivo y tiene una longitud de 10,326 nucleótidos, seguida por una secuencia de poli-A. Los viriones del *PRSV* son partículas filamentosas y flexibles, que miden de 760-800 nm de longitud por 12 nm de diámetro. Al igual que otros potyviruses, el PRSV se transmite de una manera no persistente por varias especies de áfidos.

Los primeros síntomas de la enfermedad provocada por el *PRSV* aparecen en las hojas jóvenes como mosaicos y clorosis, seguidos por manchas en el peciolo, deformaciones foliares y anillos cloróticos en los frutos, lo que resulta en una disminución en la tasa de crecimiento de las plantas, la pérdida de vigor y del rendimiento.

Se ha reportado que este virus se puede transmitir de forma mecánica y por injertos. Sin embargo, el principal mecanismo de transmisión es por medio de áfidos. No se ha reportado la transmisión a través de la semilla. La infección puede ocurrir rápidamente cuando las plantaciones están cercanas a otras que tienen la enfermedad. La cual es considerada como una de las más destructivas del cultivo de papaya y está ampliamente distribuida en las zonas productoras de esta fruta (Ventura, 2004).

Papaya ringspot virus tiene una alta tasa de diseminación, ya que las plantas de una plantación comercial puede infectarse en un período de 3-7 meses, esto se ha visto en

plantaciones que presentan altas poblaciones de áfidos. Las plantas pueden estar infectadas en cualquier fase del desarrollo vegetativo, y los síntomas aparecen generalemente de 2 a 3 semanas después de la inoculación del virus. Las plantas infectadas a una edad muy temprana nunca producen fruta, pero rara vez mueren prematuramente. Sin embargo, existen informes de que algunos aislamientos de Taiwán causan el marchitamiento y, a veces, la muerte de las plantas (Nishijima *et al.,* 1989).

1.4.2. Papaya lethal yellowing virus (PLYV)

El virus del amarillamiento letal de la papaya, es una enfermedad que sólo ha sido reportada en Brasil. Este virus fue inicialmente considerado como un posible miembro de la familia *Tombusviridae*, género *Carmovirus*, pero estudios moleculares recientes mostraron homología con la Familia *Sobemoviridae* y el género *Sobemovirus* (Lima *et al.,* 2013).

El agente causal de esta enfermedad, es un virus de RNA de cadena sencilla (ssRNA), cuya cápside está formada por una proteína de aproximadamente de 34,7 kDa. Tiene partículas isométricas, de diámetro de 29-32 nm. Dichas partículas han sido observadas en su mayoría en el citoplasma y en vacuolas de las células de hojas y frutos de plantas infectadas, así como también, se han podido detectar en raíces secas y hojas en condiciones de laboratorio, esto demuestra que las partículas virales del *PLYV* son muy estables (Lima *et al.,* 2013).

Los síntomas característicos de esta enfermedad son: amarillamiento de las hojas jóvenes, lesiones necróticas en los pecíolos de las hojas y manchas cloróticas y redondas en las frutas. Conforme evoluciona la enfermedad, se puede observar enrollamiento de las hojas, que pueden llegar a marchitarse y secarse, desencadenando la muerte de la planta (Ventura, 2004).

También en los frutos se puede observar la presencia de manchas circulares de color verdoso, que conforme madura el fruto, adquieren una coloración amarillenta. Algunos estudios han demostrado que la maduración de los frutos de plantas infectadas, se

retrasa y la pulpa se vuelve dura, lo que reduce el valor comercial del fruto (Lima *et al.,* 2013).

Como la mayoría de otras especies de virus pertenecientes al género *Sobemovirus, PLYV* infecta unicamente a las especies de la familia *Caricácea*, no sólo a las variedades comerciales de papaya, sino también a *Jacaratia heterophylla, J. spinosa, Vasconcellea cauliflora, V. monoica y V. quercifolia* (Lima *et al.,* 2013).

Aunque todavía no se ha identificado un vector natural que transmita el PLYV, el virus se pude transmitir de manera mecánica, aunque se ha reportado la presencia del mismo en la superficie de las semillas provenientes de frutos infectados, aunque no fue detectado en el embrión y tampoco fue transmitido por semillas colectadas de frutos infectados. También se ha observado que el PLYV tiene la capacidad de sobrevivir en el suelo de campos infectados, por lo que generalmente ocurre la infección de plántulas sanas cuando se cultivan en suelos donde existieron plantas enfermas (Lima *et al.,* 2013; Ventura, 2004).

1.4.3. Papaya apical necrosis virus (PANV)

El primer reporte de la necrosis apical de la papaya se dió en Venezuela en 1981 y y posteriormente se reportó en Brasil, Cuba, Estados Unidos, México, y algunas partes de África (Tennant *et al.,* 2007). Esta enfermedad es causada por un *Rhabdovirus,* cuyo genoma es de RNA monocatenario y presenta partículas baciliformes encapsidadas, de un tamaño que va de 200 a 500 nanómetros de largo y de 50 a 95 nm de ancho, con una membrana nuclear que las envuelve. Las partículas se acumulan en el espacio perinuclear y en el núcleo de las células del parénquima generalmente en el floema.

Su transmisión es de forma persistente y el principal vector se ha identificado como la especie *Empoasca papayae*. Hasta ahora no se ha demostrado la transmisión mecánica de este virus en las plantaciones de papaya (Tennant *et al.,* 2007). Los síntomas que produce esta enfermedad son: clorosis de las hojas jóvenes, pecíolos cortos y endurecidos con líneas verdes paralelas, curvatura pronunciada y necrosis del borde de

las hojas, flores femeninas abortadas y muerte apical de la planta (Texeira da Silva *et al*., 2007; Tennant *et al.,* 2007; Ventura, 2004).

1.4.4. Papaya meleira virus

La enfermedad conocida como Meleira, sticky disease o "lloroso", es un problema importante en el cultivo de papaya (*Carica papaya* L.), ya que puede ser capaz de causar la pérdida total de la producción en tan solo cuatro meses (Perez-Brito *et al*; 2012). Inicialmente se reportó que el agente causal de la enfermedad era un virus de dsRNA, que presentaba partículas isómetricas de 50 nm (Kitajima *et al*, 1993). En 2003, mediante los postulados de Koch se demostró que los síntomas ocasionados por la meleira, eran por la presencia del virus de la meleira de la Papaya (PMeV) cuyo genoma era dsRNA, con un tamaño de aproximadamente 12 Kb (Maciel-Zambolim *et al*, 2003).

Estudios realizados en Brasil recientemente, demostraron que la enfermedad de la Meleira está asociada con una doble infección viral, ocasionada por dos virus asociados. El primero, denominado "PMeV", fue indentificado como un virus perteneciente a la familia *Totiviridae*, cuyo genoma es de 8 Kb; y el otro virus que fue denominado "PMeV2", tiene un genoma de ssRNA, de aproximadamente 4.5 Kb y mostró identidad con un Umbravirus, que ya había sido reportado en plantas de papaya en Ecuador. Esto fue demostrado al realizar la purificación de partículas virales y estudiar más profundamente los RNA de ambos virus que estaban presentes en el látex de plantas var. Golden, con síntomas característicos de la enfermedad (Sá Antunes *et al*., 2016).

1.5. Papaya Meleira Virus, origen y distribución.

La Meleira fue detectada por productores en huertos comerciales de Brasil en la década de 1970, sin embargo fue hasta diez años después, cuando la enfermedad mostró una mayor incidencia, que se iniciaron los estudios sobre ella (Lima *et al.,* 2001). Desde entonces se considera uno de los principales problemas fitosanitarios de este cultivo en ese país, debido a que en áreas afectadas por el virus se alcanzó hasta el 100% de

incidencia. En la actualidad esta enfermedad afecta a todos los estados de Brasil donde se produce la papaya (Ventura*,* 2004).

En México, en el año del 2008, se observaron síntomas similares al del PMeV, pero fue hasta su posterior diagnóstico molecular, mediante la extracción de los ácidos nucleicos que se confirmó por primera vez la presencia del PMeV en México. En la actualidad se ha encontrado en siete estados productores de papaya (Campeche, Jalisco, Quintana Roo, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y Yucatán) (Pérez-Brito *et al.,* 2012) y posteriormente en el estado de Chiapas (Dra. Daisy Pérez-Brito, comunicación personal).

1.5.1. Etiología

En un principio, los síntomas de la enfermedad se atribuyeron a la deficiencia en la absorción de calcio y boro, o al desbalance de estos elementos en el suelo, y también se asociaron con estrés hídrico (Correa *et al.,* 1988; Nakagawa *et al.,* 1987). La primera evidencia de que esta enfermedad era de etiología viral, fue mostrada por Kitajima *et al.,* (1993), mediante un análisis de microscopía electrónica, donde se observó en el látex de tallos y frutos, la presencia de partículas virales isométricas, de 50 nm de diámetro. Pero esto no fue confirmado hasta diez años después, cuando se purificó el virus y se obtuvo la reproducción de los síntomas en plantas sanas, a través de los postulados de Koch. En este estudio posterior, se determinó que las partículas virales isométricas eran de dos tipos: “llenas” de 42 nm y “vacías” de 38 nm; y que el genoma viral consistía en una sola molécula de RNAde doble cadena (dsRNA) de 12 kb, así mismo que las proteínas de la cápside variaban en tamaño de 14.4 a 45 KDa. Este virus, que sólo se puede detectar en el látex, aún no ha sido clasificado, y se considera que podría representar un nuevo grupo de virus, del cual no se ha encontrado similitud entre los virus que infectan a procariotes y eucariotes (Maciel-Zambolim *et al*., 2003).

Recientemente, en Brasil, se demostró que la etiología viral de esta enfermedad es causada por un complejo viral conformado por dos virus. El primer virus fue denominado “PMeV” cuyo genoma es de RNAds y de un tamaño aproximado de 8 Kb. Este virus contiene dos ORF (*open reading frame)* putativos (*ORF1* y *ORF2*) que mostraron

similaridad con las proteínas de la cápside y la RNA dependiente de RNA polimerasa (RdRp's) respectivamente con micovirus tentativamente clasificados en la familia *Totiviridae*. El segundo virus denominado “PMeV2” cuyo genoma es de RNAss, de un tamaño aproximado de 4.5 Kb, contiene dos *ORF* putativos (ORF1 y *ORF* 2) que mostraron 48% y 73% de identidad, respectivamente con las proteínas correspondientes del Virus Q de la papaya, un *Umbravirus* descrito recientemente que infecta a plantas de papaya en Ecuador (Sá Antunes *et al*., 2016).

1.5.2. Síntomas

El primer síntoma se observa después de la fructificación, y se caracteriza por la exudación espontánea de látex acuoso, que debido a la oxidación pronto oscurece, y por lo cual la superficie del fruto presenta costras de color café. El látex de los frutos infectados se caracteriza por escurrir con mayor facilidad, y demorar en solidificarse, en comparación con el látex de frutos sanos. Otros síntomas observables en las plantas enfermas, son la presencia de manchas necróticas en los pecíolos, en los bordes de las hojas nuevas y la presencia de pequeñas manchas internas en la pulpa de los frutos así como “mapeo” en el fruto (Figura 1.1) (Pérez-Brito *et al.,* 2012; Rodrigues *et al,* 2009; Maciel-Zambolim *et al.,* 2003).

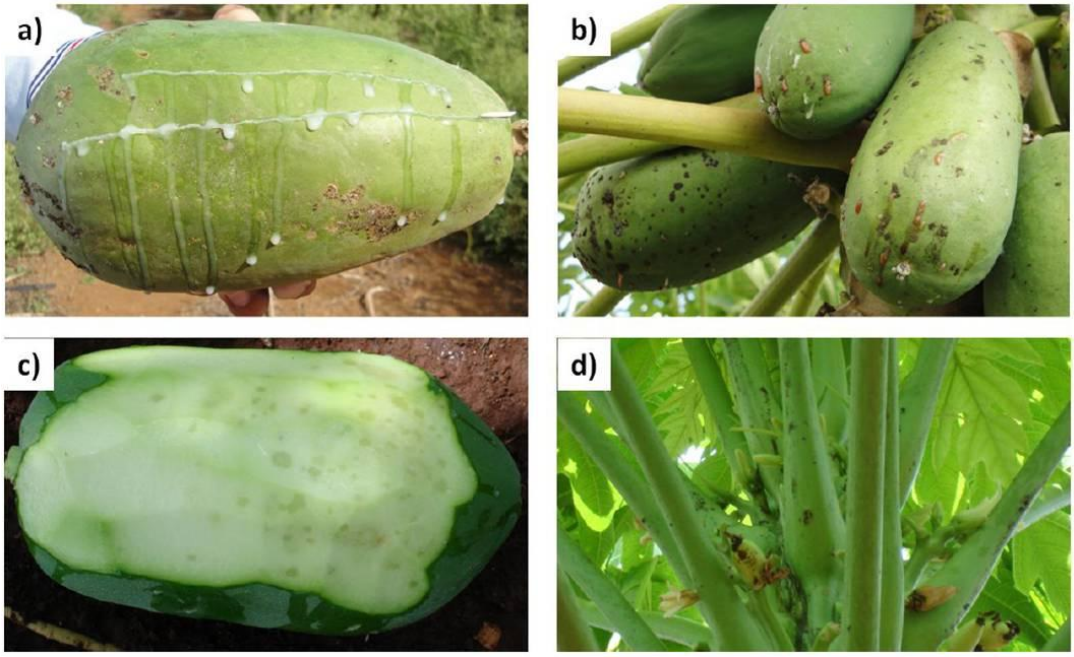


Figura 1-1 Principales síntomas del PMeV: a) Exudación espontánea; b) Frutos Manchados; c) pequeñas manchas en la pulpa; d) Manchas necróticas en el peciolo.

1.5.3. Distribución del PMeV

En un trabajo sobre la evolución temporal de la Meleira, se detectó un aumento en el porcentaje de plantas sintomáticas, especialmente con necrosis en las hojas, conforme las temperaturas medias disminuían en la región de estudio (Tagitaba *et al.,* 2002). En cuanto a la distribución espacial de la enfermedad, se ha usado la técnica de secuencias ordinarias, para mostrar que las epidemias comienzan de manera aleatoria, pero tienden a la agregación dentro de las líneas de la plantación. El estudio del progreso y diseminación del patógeno es esencial para la correcta caracterización del mismo. El análisis del arreglo espacial permite entender la etiología, así como evaluar la eficiencia de la dispersión del patógeno y generar información sobre la influencia de los factores culturales, biológicos y ambientales sobre los patógenos y/o las enfermedades (Rodrigues *et al* 1989).

1.5.4. Transmisión del PMeV.

Al observar la distribución de las plantas infectadas en huertas comerciales en Brasil, se sugirió que el PMeV podría ser transmitido por algún vector o durante las labores agrícolas (Ventura, 2004). Para conocer si el virus era transmitido por vectores, Vidal *et al.,* (2005), evaluaron la infección de las plantas de papaya con varias especies de insectos en condiciones de campo. Las plantas que desarrollaron los síntomas de la enfermedad y de las que se recuperó el RNA de doble cadena, fueron las expuestas a la mosca blanca *Bemisia tabaci* Biotipo B, lo cual indicó la posible transmisión del virus por vectores, específicamente por el insecto mencionado, aunque no se determinó la presencia del virus en dicha especie. También se han realizado estudios sobre la transmisión de PMeV por *Trialeurodes variabilis*, dando como resultado que esta mosquita no transmite el virus de plantas enfermas a plantas sanas y tampoco se determinó la presencia del virus en el insecto (Rodrigues *et al.,* 2009b).

En México, se ha reportado que PMeV sí es transmitido por semilla, con una tasa de transmisión del 81%. La presencia del virus en semillas provenientes de frutos diagnosticados positivos a PMeV reduce de un 20% hasta un 30% el porcentaje de germinación (Tapia-Tussell *et al*., 2014). Además, existe la posibilidad de que algún insecto vector esté diseminando la enfermedad en las plantaciones comerciales de papaya, así como de que hayan hospederos alternativos para el virus (Maciel-Zambolim *et al*; 2003).

1.6. Mecanismos de defensa en plantas a patógenos

Las plantas están expuestas a un gran número de fitopatógenos, sin embargo, a pesar de ser sésiles y de carecer de sistema inmune, la muerte por enfermedad es una situación excepcional. Esto hace pensar que han desarrollado sistemas de defensa altamente efectivos para detener o contrarrestar la infección (Wenham *et al.,* 1986). Entre los mecanismos de defensa que usan comúnmente las plantas, están los que evitan la entrada del patógeno a los tejidos, mediante barreras físicas y compuestos químicos

preformados (Gururani *et al*., 2012; Durrant y Dong, 2004; Vallad y Goodman 2004; Mouch-Mani y Slurenko *et al.,* 1996; Carver *et al.,* 1994;).

Los mecanismos de defensa que las plantas han desarrollado se clasifican en: 1) defensas pasivas o preformadas y 2) defensas activas.

1.7. Mecanismos de defensa pasiva o preformada

Se refiere a las estructuras físicas y químicas propias de la planta, que ésta ha desarrollado sin ningún tipo de estímulo, con la finalidad de evitar posibles infecciones de patógenos. Estas estructuras físicas y químicas son: las ceras, la cutícula en hojas y frutos, los revestimientos de las puntas de los meristemos, tricomas, así como sustancias químicas que actúan como inhibidores de diversas infecciones, tales como los compuestos fenólicos, lignina, taninos, antocianinas, lectinas, alcaloides, entre otros. (Madriz, 2002; Cuartero *et al*., 1999).

1.8. Mecanismo de defensa activa

Los mecanismos de defensa activa se expresan en dos niveles, uno es la respuesta de forma local que estimula la síntesis de fitoalexinas, desencadenando una muerte celular, que se denomina “respuesta hipersensible” (Kushalappa *et al,* 2016; Wen, 2013; Vivanco *et al.,* 2005; Durrant y Dong, 2004). El otro nivel se refiere a los efectos posteriores a la respuesta hipersensible, que son sistémicos, se manifiestan a distancia y se estimulan por la señalización secundaria de la apoptosis, o por células que activan genes involucrados en los mecanismos de defensa; y con esto se desencadenan reacciones bioquímicas en las células, que producen sustancias tóxicas contra los patógenos, para inhibir su desarrollo en la planta infectada. Este tipo de mecanismo sólo se activa como respuesta al ataque de patógenos, y se conoce como “resistencia sistémica adquirida” (Gebrie, 2016; Espinas *et al*., 2016; Cuartero *et al*., 2012; Madriz, 2002).

1.8.1. Respuesta hipersensible (HR)

El mecanismo de defensa conocida como “respuesta hipersensible” ocurre cuando el patógeno ocasiona un daño, que ocasiona una muerte celular local en las primeras horas después de la infección. Este proceso de muerte celular programada, es ocasionado por la variación del flujo iónico y las reacciones de oxidación, que la planta emite ante la presencia del patógeno (Thakur y Sohal, 2013; Sanzón Gómez y Zavaleta Mejía, 2011; Asai y Yoshioka, 2009;). La respuesta hipersensible se da por la interacción entre el patógeno y la célula vegetal, dicha interacción produce una cascada de eventos que incluyen la activación de diferentes rutas de transducción de señales en la célula invadida. La respuesta hipersensible es provocada por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) o estrés oxidativo como: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); flujos iónicos como H_2, K y Ca_2; así como el incremento del oxido nítrico (NO) (Wen, 2013; Sanzón Gómez y Zavaleta Mejía, 2001; Laloi *et al*, 2004).

En la respuesta hipersensible de las plantas ante la infección de un patógeno, también se involucra la síntesis de antioxidantes enzimáticos como: las catalasas, las peroxidasas y la glutation reductasa, así como también las enzimas involucradas en las rutas del metabolismo secundario (Laloi *et al*, 2004). Se sintetizan compuestos con propiedades antimicrobianas, tales como: fenoles, fitoalexinas y ligninas, que refuerzan y protegen a las paredes celulares contra la actividad de enzimas que las degradan, o que interfieren con la actividad de éstas últimas, como las proteínas inhibidoras de poligalacturonasas y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Pieterse *et al.,* 2014; Sanzón y Zavaleta, 2011; Schacht *et al.*, 2011; Godínez-Vidal *et al*., 2008; Sels *et al*., 2008).

También las plantas al estar ante la presencia de los patógenos, activan la producción de moléculas, tales como las cinasas y fosfatasas, que transmiten señales que activan los factores de transcripción que regulan la expresión de genes, así como de proteínas relacionadas con patogénesis (Shah *et al,* 2014; Sanzón Gómez y Zavaleta Mejía, 2011; Laloi, 2004).

1.8.2. Resistencia sistémica adquirida (SAR)

La resistencia sistémica adquirida (SAR) por sus siglas en inglés, se caracteriza por ser un mecanismo de defensa inducida, que confiere protección de larga duración. Ésta no sólo ocurre donde existe el contacto con el patógeno, sino que se extiende a áreas distales y a otros órganos de la planta. Este tipo de resistencia es contra un amplio espectro de patógenos (Shah y Zeier, 2013; Fu y Dong, 2013; Conrath *et al.,* 2006; Vallad y Goodman, 2004;)

Para que se lleve a cabo la resistencia sistémica adquirida, se requiere del ácido salicílico (SA), que funciona como una molécula señal y que se asocia con la acumulación de proteínas relacionadas con patogénesis, dichas proteínas son las que contribuyen a la resistencia de la planta ante los patógenos. Estudios realizados en *Arabidopsis*, han demostrado que la vía del isocorismato es la principal fuente de SA durante la SAR, desencadenando que la proteína reguladora NPR1 se mueva al núcleo para interactuar con factores de transcripción TGA, para inducir la expresión de los genes de defensa (Oliveira *et al.,*2016; Shah y Zeier, 2013; Durrant y Dong, 2004).

Molecularmente, la resistencia sistémica adquirida se caracteriza por la expresión de un gran número de genes y proteínas relacionadas con la patogénesis (genes PR), tanto en los tejidos locales como en forma sistémica, esto se debe a que las proteínas PR tienen propiedades antimicrobianas (Mengiste, 2012; Durrant y Dong, 2004).

Tomando en cuenta lo anterior, los genes PR son piezas claves para activar la resistencia sistémica adquirida ante la infección por patógenos, por lo que desde hace algún tiempo dichos genes, son marcadores moleculares muy utilizados para estudiar y entender los mecanismos de defensa de las plantas en contra de los patógenos (Ebrahim *et al*., 2011; Durrant y Dong, 2004).

1.8.3. Proteínas relacionadas con patogénesis (PR)

Las proteínas de resistencia son inducidas por el ataque de patógenos, aunque se ha visto su expresión en plantas sanas, pero a niveles bajos, los cuales se incrementan al comenzar una infección. También se ha visto que su nivel de producción puede variar de acuerdo al órgano afectado de la planta (Shah *et al.,* 2014; Sels *et al.*, 2008).

Hasta el momento se han identificado alrededor de 14 familias de proteínas PR. En el Cuadro 1-2 se muestran algunas proteínas PR y su función ante la infección por patógenos (Ebrahim *et al*., 2011; Dickson, 2005).

Cuadro 1-2 Proteínas relacionadas con patogénesis y su función.

Proteínas relacionadas con patogénesis (PR)	**Función**
Quitinasas (PR-3, 4, 8 y 11)	Hidrolizan la quitina de las paredes de hongos, generan oligosacáridos que pueden funcionar como elicitores
Glucanasas (PR-2), Proteinasas (PR-7) y RNAsas (PR-10)	Hidrolasas que actúan contra bacterias y Oomycetes
Proteínas (PR-1)	Se relaciona con la degradación del patógeno dentro de la célula vegetal
Inhibidoras de proteasas (PR-6)	Actúan sobre los factores de patogenicidad del agente infeccioso, es decir, se producen para impedir la acción de las proteasas de los patógenos.
Peroxidasas (PR-9, PR-15 y 16)	Están involucradas en el endurecimiento de la pared celular, participan en la reacción del oxalato con el oxígeno para formar CO_2 y peróxido de hidrógeno

1.8.4. Mecanismo de infección del PMeV

Entre las sustancias que actúan como defensa en las plantas está el látex, que es un fluido complejo producido por diferentes familias de plantas, como por ejemplo las Euforbiáceas. Esta sustancia es de consistencia "lechosa", y coagula cuando se expone al aire. Típicamente tiene color blanco, pero éste puede variar en cantidad y en color, de acuerdo a la especie (Metcalf, 1967). Un caso específico es *Carica papaya*, que contiene látex en sus frutos y en el tallo, donde se han encontrado títulos muy altos de proteasas, que son tóxicas para algunos insectos, así como un medio hostil para los virus. Sin embargo, PMeV se detectó en los conductos laticíferos de la papaya, esto es algo inusual, ya que se han realizado estudios donde mencionan que las proteasas y cisteínas que están presentes en el látex son usadas por las plantas como mecanismos de defensa anti-virales (Konno *et al.,* 2004).

Las plantas infectadas con el PMeV, producen una exudación espontánea y el látex no coagula fácilmente en comparación con las sanas, esto es debido a que las células de látex en las plantas enfermas presentan una reducción en número y su morfología es diferente, por lo que la coagulación es más retardada, lo cual puede deberse posiblemente, a que el PMeV se une a las proteínas y bloquea los receptores que están involucrados en la agregación de las células de látex, lo que provoca que no coagule (Rodrigues *et al.,* 2012 y Rodrigues *et al.,* 2009).

Estudios realizados en el látex de papaya var. Golden con PMeV, han demostrado que existen cambios bioquímicos en éste, ya que hay una disminución de aproximadamente la mitad de la concentración de azúcares, en comparación con el látex de plantas sanas (Rodrigues *et al.,* 2009). La infección de PMeV provoca un aumento en el nivel de potasio en el látex, lo que a su vez eleva la absorción de agua en los tejidos, lo cual ocasiona la ruptura espontánea de los conductos laticíferos y conlleva a la exudación del látex en los tejidos infectados (Bouteau *et al.,* 1999). Todos los cambios fisiológicos y bioquímicos anteriores (en la forma de las partículas del látex, disminución del contenido de azúcares y aumento en el agua de los conductos laticíferos) explican la principal sintomatología de la enfermedad (Bouteau *et al.,* 1999).

También se han encontrado en los conductos laticíferos de plantas positivas a PMeV, una elevada producción de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), lo cual se considera una señal de las infecciones virales en plantas. La producción del H_2O_2, se localizó en células adyacentes al floema, que se relacionan con el transporte sistémico y en respuesta a diferentes tipos de estrés (Orozco-Cardenas *et al.,* 2001). El hecho de que el PMeV sea capaz de colonizar los conductos laticíferos de papaya, podría considerarse una estrategia del virus para desplazarse dentro de la planta, así como para infectar a otras células. Mientras que la exudación espontanea del látex, le podría proporcionar al PMeV un mecanismo de transporte que permite la dispersión del virus en las plantaciones enfermas (Rodrigues *et al.,* 2011).

Se ha demostrado en Brasil, que la enfermedad de la Meleira está asociada a dos virus, y que uno de ellos se asocia a miembros de la familia *Totiviridae*. Hasta ahora son muy pocos los estudios realizados sobre virus de dicha familia que infecten a las plantas, sin embargo, en China se ha encontrado un virus dsRNA con características similares a los miembros de los Totivirus que infectan plantas de maíz (Chen *et al.,* 2015). También en un estudio realizado en Japón, se determinó que en muestras de plantas del trébol rojo infectadas con mildiu, estaban presentes partículas virales de un Totivirus. Dichos resultados fueron corroborados en condiciones de laboratorio y campo, esto demostró que los miembros de la familia *Totiviridae* tienen la capacidad de infectar a las plantas y no sólo a hongos y protozoarios como es lo generalmente reportado para ellos (Kondo *et al.,* 2016). Sin embargo, no existe información sobre el mecanismo de infección de los miembros de la familia *Totiviridae* en las plantas.

El otro virus que conforma el complejo viral de la enfermedad de la Meleira, es un *Umbravirus*. Los miembros de los *Umbravirus* se caracterizan por no tener el gen que codifica la proteína de la cápside (CP), por lo que no forman partículas virales convencionales. Dichos virus necesitan de la presencia de un virus auxiliar, generalmente un miembro de la familia *Luteoviridae*, para que la CP del virus auxiliar forme las partículas de virus híbridos que encapsidan al ARN del Umbravirus y que pueda ser transmitido a otras plantas (Taliansky y Robinson, 2003). Tomando en cuenta lo anterior,

se propuso que el PMeV es el virus auxiliar del virus PMeV2, por lo que la CP del virus PMeV forma las partículas de los virus híbridos que encapsulan al ssRNA del PMeV2 (Sá Antunes *et al.,* 2016).

Por lo anterior es importante profundizar en los mecanismos de infección del PMeV, ya que por la composición de este patógeno y las particularidades de los virus que provocan la enfermedad, se evidencia que es un fenómeno complejo e inusual en las interacciones planta –patógeno.

1.9. Estudios de la interacción entre *C. papaya* y el PMeV

El genoma de la papaya ha sido secuenciado en su totalidad, por lo que se ha convertido en un modelo útil de estudio (Ming *et al.,* 2008), ya que esto ha permitido, entre otros aspectos, conocer los mecanismos de defensa de esta planta ante la infección por patógenos (Ventura *et al.,* 2004).

Dado que el PMeV es un virus inusual y el único que se ha encontrado confinado en los tubos laticíferos de la papaya, se ha convertido en un objeto de estudio interesante para diversos grupos de investigación en Brasil y México.

La acumulación de agua y minerales (K y P) provocada por el virus en el látex, así como el aumento en la acumulación de cristales de oxalato de calcio y producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en los conductos laticíferos, se considera que activa los mecanismos de defensa de manera sistémica (SAR) en papaya ante el PMeV. Pero hasta ahora, poco se sabe acerca de la participación de la defensa de la planta durante esta infección viral (Rodrigues *et al.,* 2009).

Con el uso de la proteómica se ha podido conocer un poco de la interacción entre la papaya y el PMeV. En el 2011, Rodrigues y col, publicaron resultados del análisis proteómico en hojas de plantas de papaya infectadas con PMeV, mediante electroforesis de 2-D y con la ayuda de espectrometría de masas, pudieron observar las diferencias entre las proteínas que se expresan en las hojas de plantas infectadas y sanas de la var.

Golden. Los resultados de dicho trabajo, mostraron que se inducían proteínas relacionadas con el estrés en plantas infectadas y se reprimían proteínas relacionadas con el metabolismo en plantas sanas. Las proteínas que se reportaron fueron la calreticulina, proteasoma 20S y subunidades de RPT5a, proteínas que son inducidas durante la enfermedad, y representan los primeros marcadores moleculares candidatos, que pueden resultar útiles para profundizar en la interacción entre la planta y este virus.

En otro estudio proteómico realizado en látex de *C. papaya*, se encontraron 122 proteínas que no habían sido halladas antes y que están involucradas en las respuestas a estrés. También se evaluó la proteómica del látex de *C. papaya* var. Golden infectada con PMeV y los resultados obtenidos, señalaron diez proteínas que se expresaron ante la presencia del virus, de las cuales, nueve fueron proteasas cisteína (quimopapaína) y una serina proteinasa. Esto después fue confirmado por ensayos enzimáticos, que mostraron una reducción de la cisteína-proteasa asociada a la actividad proteolítica en el látex de papaya infectado por el PMeV (Rodrigues *et al.,* 2012).

En el 2014, en Brasil, en un estudio, en donde se buscaba comprender la interacción virus-planta entre PMeV y *C. papaya* var. Golden, así como los mecanismos implicados en la aparición de los síntomas de la enfermedad, se demostró que los microRNAs se dirigen a los complejos del proteosoma 20S y 26S. Estos complejos están relacionados con la degradación del proteosoma, en respuesta a la infección del PMeV. La expresión de cada uno de los miRNAs en las hojas de papaya sanas e infectadas, se comparó utilizando PCR en tiempo real. En este trabajo, se evidenció que el PMeV utiliza el sistema ubiquitina-proteosoma [(UPS), por sus siglas en ingles], de la planta, como una estrategia para favorecer su replicación, así como también modificar la acumulación de miRNAs, que modulan importantes genes de defensa, que se expresan durante la aparición de los síntomas de la meleira (Abreu *et al.,* 2014).

Así mismo, en otro estudio, se encontró que plantas de papaya infectadas con PMeV durante la prefloración, reducen la actividad de caspasas y presentan cambios en las proteínas asociadas con la pared celular, limitando la activación completa de la respuesta de defensa, específicamente la respuesta hipersensible (muerte celular). También se

demostró que las plantas de papaya limitaban el movimiento viral en sus órganos. Dichos fenómenos en su conjunto contribuyen a la resistencia de *C. papaya* contra PMeV en la etapa de pre-floración (Soares *et al.,* 2016). Estos resultados complementaron y apoyaron la hipótesis de trabajos previos, en donde se determinó que la presencia del PMeV en papaya, aumenta la fotosíntesis y reduce la actividad del complejo del proteosoma 26S, asi como la reestructuración en la pared celular.

1.10. Estudios de la expresión génica en plantas

La PCR cuantitativa (PCRq), es una herramienta muy utilizada para el diagnóstico molecular, en diferentes esferas de investigación (Bustin, 2000), así como para amplificar y cuantificar moléculas de cDNA específicas con el fin de conocer la expresión genética de diferentes células o tejidos (Heid *et al.*, 1996).

La cuantificación de la expresión génica se ve afectada por varios factores, tales como: la cantidad de material inicial, la calidad del RNA, la eficiencia de la síntesis de cDNA, el rendimiento del iniciador empleado y los métodos que se usan para el análisis estadístico (Suslov y Steindler, 2005; Bustin y Nolan, 2004). Para cuantificar de forma adecuada la expresión de un gen de referencia endógeno o “housekeeping”, se requiere tener un control interno, que es procesado en paralelo con el gen de interés, esto con la finalidad de normalizar los datos obtenidos del análisis de la expresión génica (Vandesompele, 2002).

La estrategia de normalización, es la más utilizada para seleccionar un buen gen endógeno. Dicha estrategia consiste en evaluar y validar la expresión de genes candidatos de referencia, en condiciones experimentales específicas. Para obtener los mejores resultados, se sugiere evaluar como mínimo tres genes candidatos de referencia (Huggett *et al*., 2005; Schmittgen y Zakrajsek 2000).

La extracción de RNA, seguida de la síntesis de ADNc a partir del ARNm, utilizando una transcriptasa inversa, son pasos cruciales para realizar la PCRq. Una vez obtenido el cDNA, se procede a realizar la PCRq, en donde se podrá amplificar y detectar en tiempo

real el fragmento o gen de interés, esto se lleva a cabo mediante la señal de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de cDNA producida en cada ciclo (Suslov y Steindler, 2005).

Las amplificaciones de los fragmentos de interés quedan registradas formando una curva de fluorescencia, obtenida mediante una ecuación logística similar a la que describe el crecimiento bacteriano (Wang *et al.*, 1989). En esta curva, se fija un punto por encima de la línea base, que se denomina umbral del ciclo. Los valores umbral del ciclo (Cq value) se determinan identificando el ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente atraviesa el punto umbral, por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción, dichos valores son los que se utilizarán para calcular la expresión génica relativa.

Por otra parte, al representar gráficamente la fluorescencia detectada en función de la temperatura se obtienen curvas de fusión. Ririe *et al.* (1997) determinaron que la forma y posición de esta curva depende del contenido de GC/AT y de la longitud de la secuencia, concluyendo que en muchos casos elimina la necesidad de realizar geles de electroforesis, ya que en ellas se pueden diferenciar los productos específicos de la PCR de dímeros de iniciadores y amplificaciones inespecíficas.

En función de los objetivos del estudio, se pueden llevar a cabo diferentes estrategias de cuantificación. Una de ellas es la cuantificación absoluta, mediante la cual es posible conocer el número de copias de RNAm de un gen, relacionando la señal de fluorescencia obtenida con un número de copias fijo, de una secuencia estándar, utilizando una curva de calibración. Estas curvas son muy reproducibles y permiten la generación de datos específicos y sensibles, pero deben ser rigurosamente validadas, ya que la cuantificación de la expresión genética dependerá exclusivamente de la precisión de los estándares empleados (Pfaffl, 2004).

En otros casos, el objetivo no es determinar de forma absoluta el número de moléculas de RNAm, sino detectar diferencias cuantitativas en la expresión de varios genes, en distintas situaciones, lo que se conoce como cuantificación relativa. Esta técnica se utiliza

para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de un gen en estudio, en comparación con uno o más genes de referencia (Pfaffl, 2004). Estos genes, comúnmente llamados housekeeping o controles endógenos, son elegidos porque su expresión es constante en todas las condiciones del estudio, y actúan como control interno, eliminando la variación debida a posibles diferencias producidas por la degradación parcial del RNA en alguna muestra, distinta eficiencia en la transcripción inversa, errores de pipeteo, etc. (Hernández *et al.*, 1994).

Algunos de los controles internos más utilizados son la β-actina, ciclofilina, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, hipoxantina guanina, fosforibosil-transferasa y 18S del RNA ribosomal (Huggett *et al.*, 2005). En un estudio en *C. papaya* en donde se evaluaron diferentes genes de referencia, se demostró que los "housekeeping o genes endogenos" *EIF* (Factor de iniciación eucariotica 4A), *TBP1* (proteína 1 de unión a la caja TATA) y *TBP2* (TATA proteína 2 de unión a la caja TATA), fueron los genes endógenos que mostraron mayor estabilidad bajo diferentes tratamientos experimentales (Zhu *et al.,* 2012).

En la actualidad, existen diferentes modelos matemáticos para el cálculo de la expresión relativa, que se basan en la comparación de los valores Cq obtenidos en cada condición del estudio, normalizados con los controles internos. Uno de los métodos más utilizados es el $2^{-\Delta\Delta}$Cq, desarrollado por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, Forster City, CA), que asume una eficiencia del 100% en todas las reacciones. Otros métodos, como el propuesto por (Pfaffl, 2001) sí tienen en cuenta la eficiencia de la reacción, tanto para el gen objetivo como para el gen de referencia.

Otra técnica, que se utiliza mucho para este tipo de estudios, son los mapas de calor (*heat map*), que son una representación gráfica (2D) de datos, en la que los valores individuales contenidos en una matriz se representan como colores. En el caso del análisis de la expresión de genes, las filas representan los genes analizados y las columnas los tratamientos (Eisen *et al*., 1998).

1.11. Estudios de alteraciones a nivel histológico en plantas como respuesta al ataque de fitopatógenos

Diversos estudios se han realizado para conocer las alteraciones a nivel histológico que ocasionan los patógenos a las plantas. Uno de ellos estuvo enfocado en los daños que causa la bacteria *Streptomyces* en látex de caucho, en donde se encontró que dicho patógeno metaboliza los biopolímeros del látex y desencadena la degradación de los isoprenos, glicolípidos y lipopéptidos, compuestos importantes para la formación del caucho, ocasionando severos cambios en la estructura de este fluido. (Yikmis y Steinbuchel, 2012; Gallert, C. 2000;).

Aquije y col. en 2010, a través de la microscopía de fuerza atómica, mostraron la integridad estructural de las hojas de cultivares de piña resistentes a *Fusarium*. Este trabajo demostró que existen compuestos fenólicos, tales como ácido felúrico y p-cumárico, unidos a la pared celular de las hojas de piña, que reducen la penetración y permiten una respuesta más rápida y efectiva ante la presencia del hongo en las variedades resistentes, característica que no presentan las variedades susceptibles.

En lo que respecta a estudios sobre las alteraciones a nivel histológico que provoca el PMeV en papaya, Rodrigues *et al.,* (2009) analizaron la morfología de las partículas de látex de esta planta, usando un microscopio electrónico de barrido (MEB). En las micrografías se pudo observar que la infección del PMeV reduce notablemente la cantidad de polímeros de látex y altera su morfología, provocando una estructura más dispersa.

1.12. Hipótesis

El *Papaya Meleira Virus* (PMeV) en su interacción con la variedad Maradol, produce cambios en la expresión de los genes involucrados en los mecanismos de defensa de la planta y provoca alteraciones nanoestructurales en las hojas y el látex de *Carica papaya*.

1.13. Objetivos

1.13.1. General

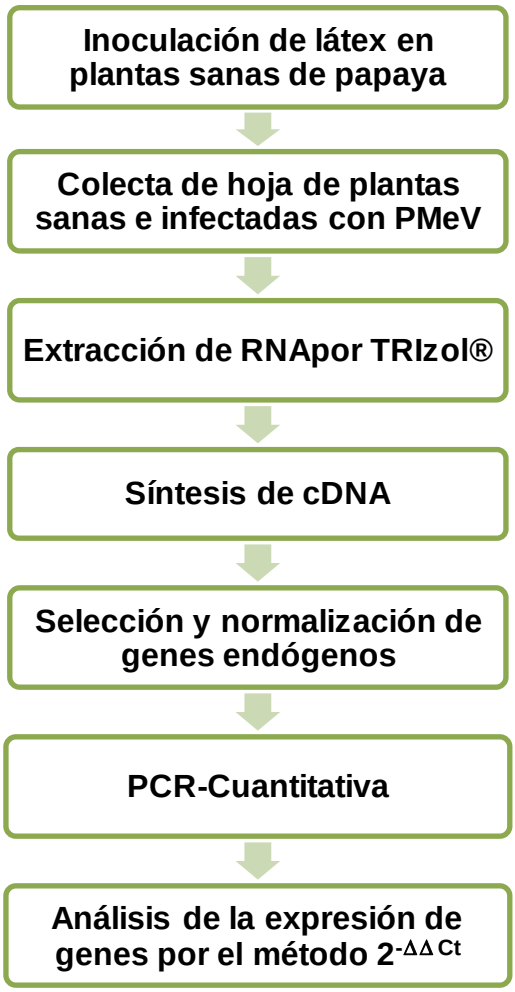
Evaluar la expresión de genes relacionados con patogénesis (*PR*) y su papel en los mecanismos de defensa de *Carica papaya* infectada con PMeV, así como analizar las alteraciones nanoestructurales en hojas y látex de papaya ante la enfermedad.

1.13.2. Específicos

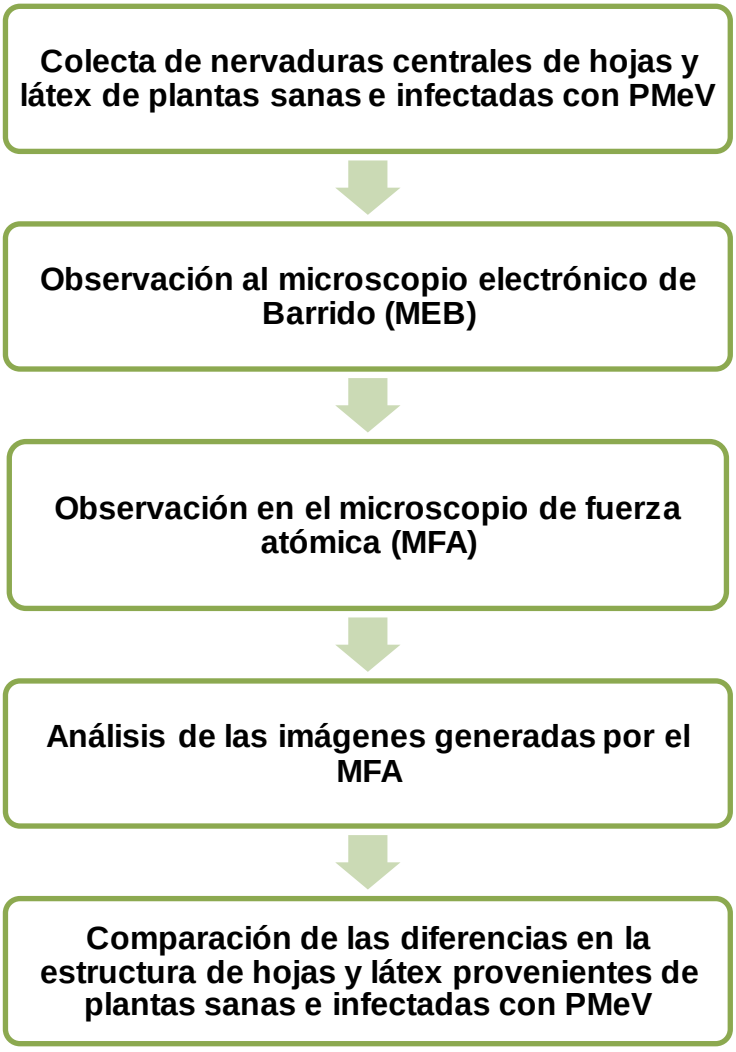
- Analizar los niveles de expresión de genes relacionados con patogénesis de *C. papaya* variedad Maradol infectada con PMeV.
- Identificar las alteraciones físicas en hojas y látex de *C. papaya* de la variedad Maradol infectadas con PMeV.
- Determinar la fuerza de adhesión en hojas y látex de *C. papaya* de la variedad Maradol infectada con PMeV.
- Inferir las posibles causas de las alteraciones en hojas y látex con la expresión de genes relacionados con los mecanismos de defensa de papaya ante PMeV.

1.14. Estrategia Experimental.

1.14.1. Estudio de los niveles de expresión de genes relacionados con patogénesis en C. papaya variedad Maradol infectada con PMeV



1.14.2. Análisis de las alteraciones físicas en hojas y látex de papaya infectada con PMeV



1.15. Justificación

El virus de PMeV, que ha sido reportado en Brasil y México, ha demostrado tener una rápida dispersión y ha provocado importantes pérdidas en el cultivo de papaya en ambos países. Hay muy pocos estudios que analicen a nivel molecular la interacción PMeV-papaya, y la consecuente respuesta de la planta. De ahí la importancia de este estudio, que se enfocó en el análisis de la expresión de genes de la planta ante el virus y en los cambios nanoestructurales en el látex y hojas de papaya variedad Maradol, infectada con PMeV, lo cual brindará información valiosa para futuros programas de mejoramiento genético de papaya.

CAPÍTULO 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESION DIFERENCIAL DE GENES INVOLUCRADOS EN EL MECANISMO DE DEFENSA DE *C. papaya* INFECTADA CON EL *Papaya Meleira* virus (PMeV)

2.1. Introducción

Los mecanismos de defensa que las plantas desencadenan ante el estrés biótico, pueden ser generales o específicos. Ellos han sido intensamente estudiados y se ha reconocido que un mejor conocimiento tanto del patógeno como de la planta, nos permitirá desarrollar nuevos enfoques para contribuir a la durabilidad de la resistencia de las plantas a sus patógenos, así como contar con mejores estrategias de control para la prevención de enfermedades en cultivos de importancia económica (Rodrigues *et al.,* 2009a; Silva *et al.,* 2006; Rodrigues *et al.,* 2006).

Los mecanismos de defensas locales y sistémicos, se producen por la activación o supresión de la expresión de los genes relacionados con patogénesis, para enfrentar y combatir las infecciones ocasionadas por los diferentes estreses (Larson *et al.,* 2008; Lee *et al.,* 2006).

El PMeV, que es el agente causal de la enfermedad Meleira en la papaya, es el único virus que se ha encontrado en los conductos laticíferos de dicha planta. Hasta el momento no se conoce ningún cultivar de papaya que sea resistente a PMeV. Por lo que es de suma importancia, realizar la búsqueda de genes que puedan estar asociados a la resistencia de plantas de papaya a este virus, lo cual nos permitirá conocer más sobre la interacción y los mecanismos de defensa en esta relación hospedero-patógeno, esto con la finalidad de implementar a futuro, programas de mejoramiento genético para encontrar plantas de papaya resistentes o al menos tolerantes al PMeV.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Material Vegetal

2.2.1.1. Selección y germinación de semillas

Se seleccionaron 100 semillas comerciales de la variedad Maradol. A todas las semillas se les removió el mucílago y se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 10%. Luego se remojaron durante 3 días en agua estéril, a la que se le añadieron dos fungicidas: Alliete ® (Fosetyl-Al 1gr/ L.) y Derosal ® (Carbendazim 1ml/ L).

Estas semillas ya tratadas, se colocaron en charolas de germinación, con sustrato de vermiculita, en completa oscuridad. Las plántulas obtenidas se fertilizaron cada dos días con Polyfeed ® Triple 19 (0.19gr/L) y con MKP ® fosfato monopotásico 0-52-34 (1gr/L) hasta su trasplante a la casa sombra.

Se sembraron 16 plántulas, en dos casas sombras independientes, con malla antiáfidos (40 x 25 hilos/pulgada cuadrada, bicolor, ancho 4.10m). El marco de plantación fue de dos hileras, con una distancia de 1.5 m entre cada una de las plantas. Las papayas fueron fertilizadas, y se llevaron a cabo acciones preventivas para evitar la presencia de fitopatógenos que pudieran afectar los resultados. Estas prácticas se realizaron cada semana, para mantener el área experimental en óptimas condiciones y tener un control fitosanitario adecuado. También se realizó la aplicación de insecticidas sistémicos durante el experimento, para garantizar que no existiera ningún tipo de insectos ni posible transmisión de enfermedades por esta vía. Después de cuatro meses de trasplantadas, se les realizó el diagnóstico molecular con los inicidadores CB38/CB39 (Zamudio-Moreno *et al* 2015), con el objetivo de verificar que las plantas estaban libres de PMeV.

2.2.2. Inoculación de las plantas con látex de plantas enfermas y colecta de muestras

Para el análisis de la expresión génica, se inocularon 16 plantas de papaya, según se describe a continuación: 1) ocho plantas fueron inoculadas con 20 μL de látex infectado

(que corresponde a 5 μg de RNA viral) y que presentaba las dos bandas correspondientes a los virus PMeV y PMeV2 (Ver Anexo 1), diluido en amortiguador PBS, pH 7.0 (1:1, v/v); (2) el resto de las plantas se inocularon con 20 μL de Buffer PBS, pH 7.0 como control negativo. Las inoculaciones se realizaron en el ápice de las plantas, con la ayuda de jeringas estériles de 1 mL (Abreu *et al.*, 2012).

La toma de muestras de las hojas de papaya se hizo a los 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 45 dpi. Se realizó el diagnóstico molecular de cada una de las plantas analizadas, para detectar la presencia del virus (Ver anexo 2). Para ello, las hojas se colocaron inmediatamente después de colectadas, en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para la posterior extracción de RNA total.

2.2.3. Extracción de RNA

El RNA total fue extraído utilizando el reactivo TRIzol® (Life Technologies, California, USA), de acuerdo a las condiciones recomendadas por el proveedor.

El RNA total se cuantificó en un NanoDrop 2000 (ThermoScientific, California, USA) y su integridad se verificó en un gel de agarosa al 0.8 % (p/v) con buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, teñido con bromuro de etidio. Las imágenes fueron capturadas en un fotodocumentador (Gel Doc, Biorad).

2.2.4. Síntesis de cDNA (Transcripción Reversa)

La síntesis de la primera hebra de cDNA se obtuvo utilizando el RNA mensajero como molde y 500 ng/mL de oligo $(dT)_{12-18}$ (Invitrogen, Carlsbad, USA) con la enzima SuperScript II RT (Invitrogen, Carlsbad, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor.

2.2.5. Determinación del mejor gen candidato de referencia para el análisis de expresión

En el Cuadro 2-1 se describen los cuatro posibles genes candidatos que se utilizaron en este estudio.

Cuadro 2-1 Genes de referencia (housekeeping) usados en este trabajo.

Gen de referencia (housekeeping)	Secuencias de los iniciadores (F/R)(5`-3`)	Referencia
Actina 2 *(ACTIN)*	TTTCCAAGGGTGAGTATGATGAG/ ACACAGGACACAAAAGCCAACTA	Zhu *et al.*, 2012
Ciclofilina *(CYP)*	TGGAGCTATTCGCGGATACG/ CGTGCACAGAGCCCTGAAG	
Factor de iniciación de la traducción eucariótica 4E *(eIF4)*	GAGGCAGGCAAGAGAAGATAGC/ TGAGCAGCCTCGTTTGCA	
Proteínas de la familia mitocondrial- 7 Banda *(B4FP)*	TCTGTTTTCATTCCCCATGGA/ CGTCCCTGATCTGTGAAGCA	

Para determinar el mejor gen de referencia, se tomó en cuenta la especificidad de la amplificación, por medio del análisis de la curva de fusión (curva de melting), descartando del estudio aquellos genes con una mala amplificación, baja eficiencia de reacción o formación de dímeros. Todas las muestras (de los diferentes tiempos de muestreo) fueron evaluadas con los diferentes genes candidatos de referencia, esto para validar que no se alterara la expresión durante el experimento y elegir el gen más estable. La elección de los mejores genes candidatos a genes de referencia, se hizo de acuerdo a las herramientas informáticas Best keeper v1 (Pfaffl *et al*., 2004) geNorm 3.5 (Vandesompele *et al*., 2002) y RefFinder (Andersen *et al*., 2004).

Con el análisis estadístico descriptivo Best keeper v1 mediante el "índice CP" (Cálculo del promedio geométrico de los genes de referencia más estables) se determinó la variabilidad de expresión mediante la estimación de la desvíación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) de cada gen y luego se realizaron comparaciones en pares considerando un gen de referencia ideal que selecciona el programa *Best keeper.*

Por su parte, geNorm es una aplicación para Microsoft Excel que permite ordenar los genes bajo estudio asignándoles un índice de estabilidad M (Vandesompele *et al*., 2002).

Para confirmar los resultados obtenidos con las herramientas informáticas de *Best Keeper* y *geNorm*, se utilizó la herramienta informática del *RefFinder* (http://www.leonxie.com/referencegene.php) diseñada para evaluar y seleccionar genes de referencia a partir de diferentes datos experimentales. Esta herramienta integra los principales programas computacionales disponibles actualmente (*geNorm, Normfinder, Best Keeper* y el método Delta Ct comparativo) lo que permite comparar y clasificar diferentes genes de referencia candidatos (Andersen *et al*., 2004).

2.2.6. Análisis de la expresión génica por RT- PCRq

Para este estudio, se utilizaron los iniciadores de los diferentes genes de *C. papaya,* que se conoce que están involucrados en los mecanismos de defensa (Cuadro 2-2). La colecta del día cero, fue usada como muestra de referencia en este trabajo. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μL, que contenía 1X de master mix Maxima SYBR Green/Rox qPCR (TermoScientific, California, USA), 1 μM de cada iniciador y 2 μL de cDNA, en un termociclador Applied Biosystems StepOne™ (California, USA).

Las condiciones de amplificación, tanto para los genes de referencia, como para los genes de interés, fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos a 95 ºC por 3 segundos y un alineamiento a 60 ºC durante 30 segundos, con una curva de melting con incrementos de 0.5°C cada 5 s, en un gradiente lineal de 65 a 95 °C.

Cuadro 2-2 Genes de *C. papaya* para el análisis de la expresión diferencial por RT-PCRq.

ID Gen	Descripción	Clave	Secuencias de los iniciadores (F/R)(5`-3`)
evm.model.supercontig_12.208	Osmotina 34	*PR5*	AATGGGCCTTGTCCAGTTTTT/ CCACAGTTGCCAGAGTTGCA
evm.model.supercontig_20.79	Proteína relacionada con patogénesis 1	*PR1*	CGCCAACCAACGCAAAG/ CGTAAGGACCACCGGAGTGT
evm.model.supercontig_58.133	Inhibidor de serina proteasa de látex	*PR6*	CCTTGCAGCGATGTGGGTAT/ TCCTCTTTAAGTACCAGACGCCTAA
evm.model.supercontig_1127.3	Peroxidasa	*POD*	GAGCTAACCCGTTTGAATGAAGA/ GCCCTCAGGATGGAAGCAA
evm.model.supercontig_49.84	Peroxidasa 12	*POD 12*	TGGACACCGTCGACATGGTA/ AGTGGCCAATTCCGATGGT

2.2.7. Método para la determinación de la expresión relativa 2 $^{-\Delta\Delta Ct}$

Los valores de los Ct y el análisis de expresión relativa de los genes bajo estudio, se llevó a cabo usando el software Applied Biosystems StepOne™. El nivel de transcripción del gen fue expresado como Cantidades Relativas (CR), a partir del análisis del gen de referencia (ecuación 1) y de la Expresión Relativa (ER) del gen de interés (ecuación 2). Los datos fueron cuantificados con respecto al control según el método ΔΔCt (Livak y Schmittgen, 2001).

Ecuación (1) $CR= 2^{-\Delta CqE}$

Ecuación (2) $ER= 2^{-\Delta\Delta CqE}$

En el caso del análisis con los mapas de calor, las filas representan los genes analizados y las columnas diferentes días post inoculación. El color e intensidad depende del nivel de expresión de los genes bajo estudio.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Análisis y determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos

Los valores de Ct de los cuatro genes de referencia estuvieron en un rango de 20 (para el gen *B4FP)* a 24 (para el gen *ACTIN)*. La eficiencia de la amplificación de la PCRq de los cuatro genes de referencia varió de 90,1% a 97%. De acuerdo a los valores de eficiencia de la reacción, los cuatro genes presentaron una buena amplificación para las muestras analizadas, lo que fue validado por los diferentes programas estadísticos que analizan la estabilidad de los genes candidatos de referencia y que fueron utilizados como se describe en materiales y metódos (2.2.5).

Todos los genes candidatos mostraron una buena amplificación, como se aprecia en las curvas de amplificación y disociación de cada uno de ellos (Figura 2-1). El análisis de las curvas de disociación mostró que los genes *CYP* y *elf4* formaron dímeros a las temperaturas (78ºC Y 75ºC respectivamente) (Figura 2-1C y D). A diferencia de los genes *ACTIN* y *B4FP* (Figura 2-1A y B) que sólo mostraron un producto de amplificación a una temperatura de disociación de 78.53º C y 78.41º C, respectivamente.

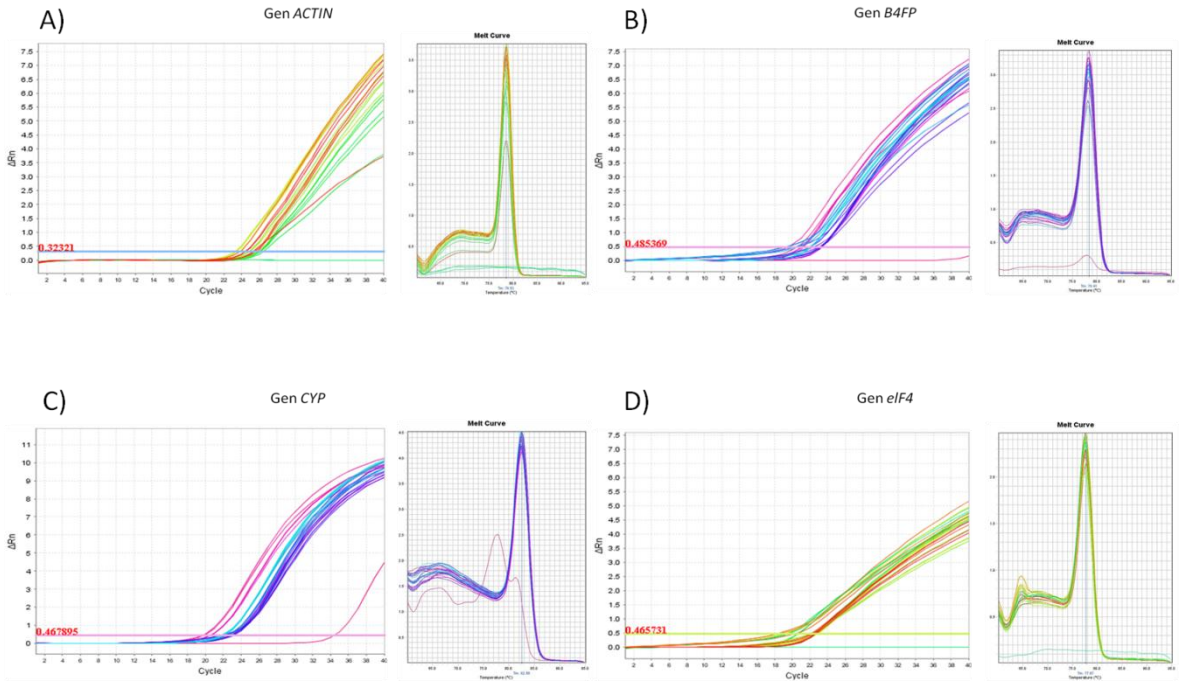


Figura 2-1 Curva de amplificación y curva de disociación de los genes de referencia endógenos candidatos. A) Gen *ACTIN.* B) Gen *B4FP*. C) Gen *elF4*. D) Gen *CYP*.

En el Cuadro 2-3 se muestran los valores estadísticos obtenidos para cada uno de los genes candidatos a genes de referencia, de acuerdo al programa *Best keeper*, para llevar a cabo el estudio de la expresión diferencial de genes.

Cuadro 2-3 Análisis estadístico con el "índice CP de *Best keeper"*

	GENES CANDIDATOS				
	ACTIN	*CYP*	*elf4*	*B4FP*	*BEST KEEPER (ACTIN, CYP, elF4, B4FP)*
N	23	23	23	23	23
GM [CP]	19.39	23.20	19.39	21.67	19.41
AM [CP]	19.48	23.22	19.48	21.70	22.47
Min [CP]	16	21	16	20	18.75
Max [CP]	21	24	21	23	22.25
SD [± CP]	1.46	0.82	1.46	0.84	0.36
CV [% CP]	7.51	3.52	7.51	3.87	2.2

CP: Punto de cruce; N: número de muestras; GM [CP]: media geométrica de CP; AM [CP]: media aritmética de CP; Min [CP] y Max [CP]: valores extremos de CP; SD [± CP]: desviación estándar de CP; CV [%CP]: coeficiente de variación expresado como porcentaje del nivel CP.

De acuerdo a los estadísticos obtenidos de cada uno de los cuatro genes considerados estables y al cálculo del índice CP de *Best Keeper*, los genes candidatos tuvieron un coeficiente de variación de 2.2 y una desviación estándar de 0.36, considerándose estables al analizarlos en conjunto.

Las correlaciones entre las parejas de genes candidatos y de éstos con el índice CP resultaron significativas ($p<0,05$), sin embargo, el comportamiento de cada uno de los genes fue diferente. Esto se puede observar en la Figura 2-2, en donde los genes *CYP* y *elF4* presentaron una mayor estabilidad, en comparación con los otros dos genes analizados (*B4FP* y *ACTIN)* por la herramienta del *Best Keeper*.

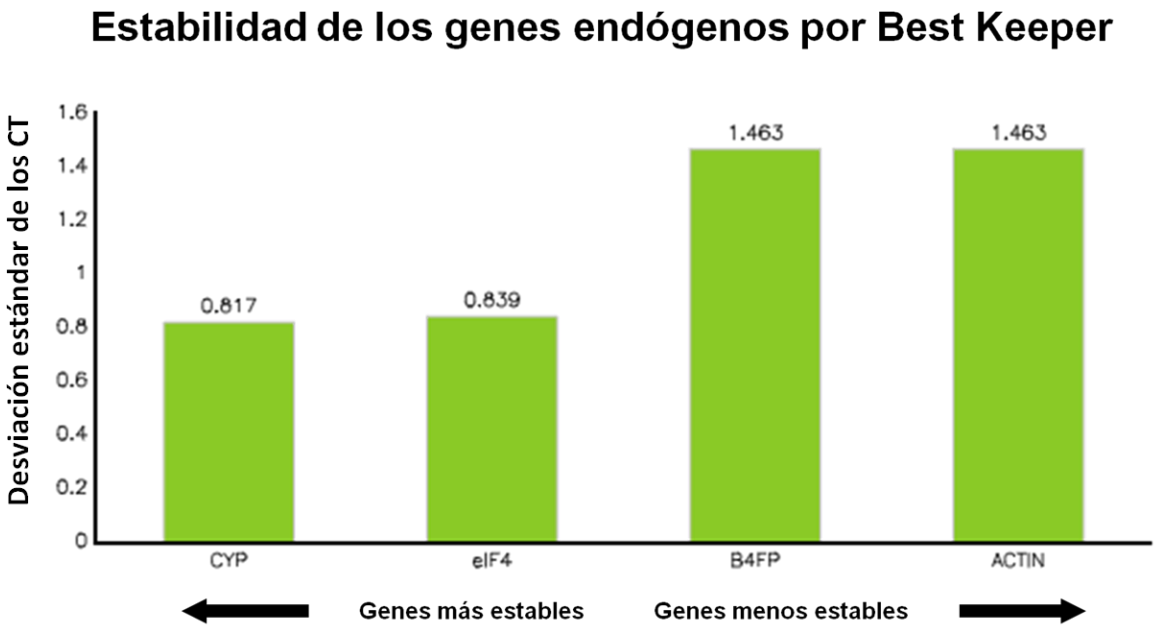


Figura 2-2 Valores de la estabilidad de los genes candidatos de referencia de acuerdo al índice Best Keeper

Al ordenar los genes bajo estudio de acuerdo con el índice de estabilidad M (Cuadro 2-4), (Figura 2-3) se observó que el gen más estable fue el *B4FP*, seguido de los genes *CYP*, *eIF4* y *ACTIN*. Sin embargo, según esta herramienta, todos los genes evaluados son adecuados, ya que mostraron valores de M < 1.2. Siguiendo este criterio y de acuerdo a los datos presentados por dicho programa, todos los genes propuestos podrían ser lo suficientemente estables para poder utilizarlos como genes de referencia.

Cuadro 2-4 Valor de *M* de cada de los genes de referencia calculados por GeNorm

Genes de referencia candidatos	Valor de *M* por geNorm
Actina *(ACTIN)*	0.83
Ciclofilina (*CYP*)	0.84
Factor de iniciación de la traducción de eucariotas 4E *(eIF4)*	0.828
Proteínas de la familia mitocondrial-7 banda (*B4FP)*	1.1

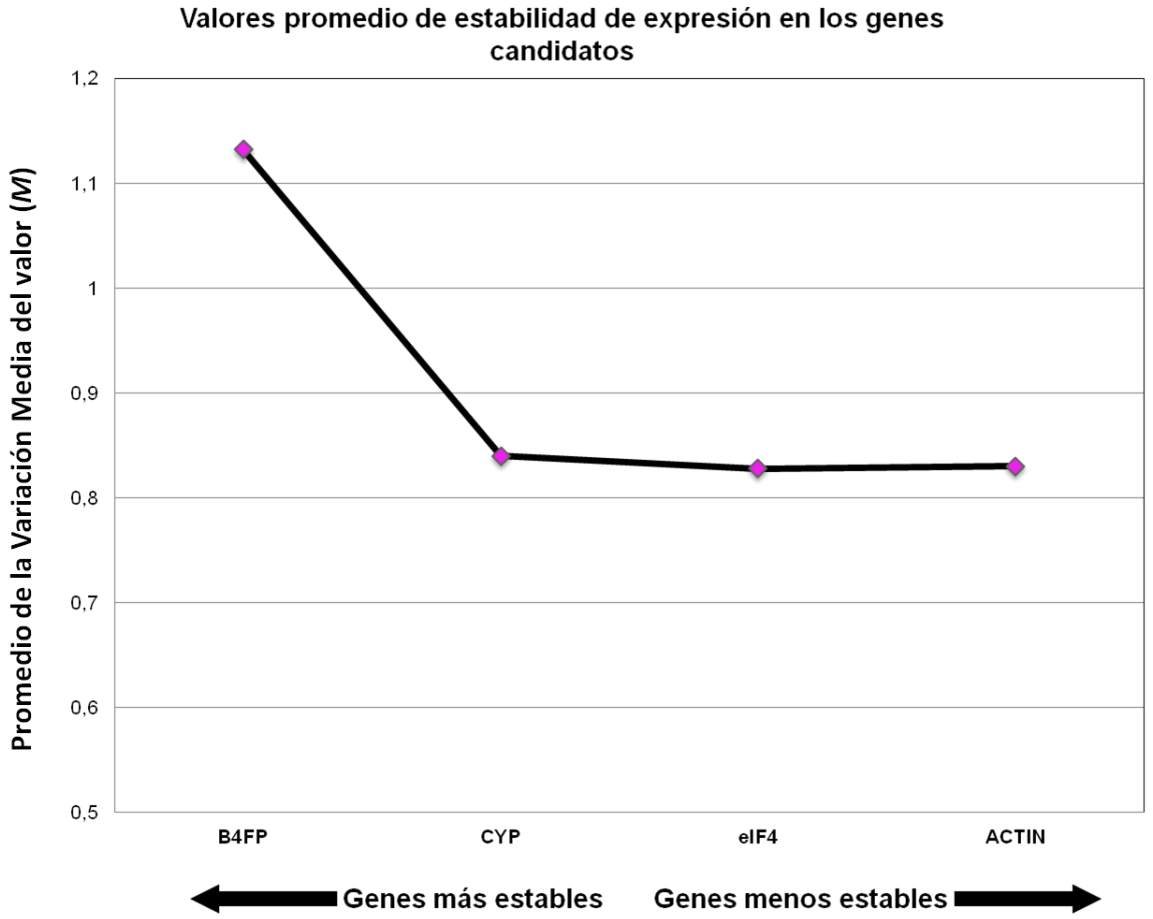


Figura 2-3 Valores promedios de la estabilidad de los genes candidatos de referencia con el índice geNorm.

Los resultados obtenidos con el programa *RefFinder* (Figura 2-4), tuvieron una ligera diferencia con la clasificación general de los genes candidatos analizados por el *Best Kepper*. Sin embargo, el resumen general de la clasificación de los genes candidatos colocó al gen *B4FP* como el más estable, validando de esta forma los resultados obtenidos por el *geNorm*.

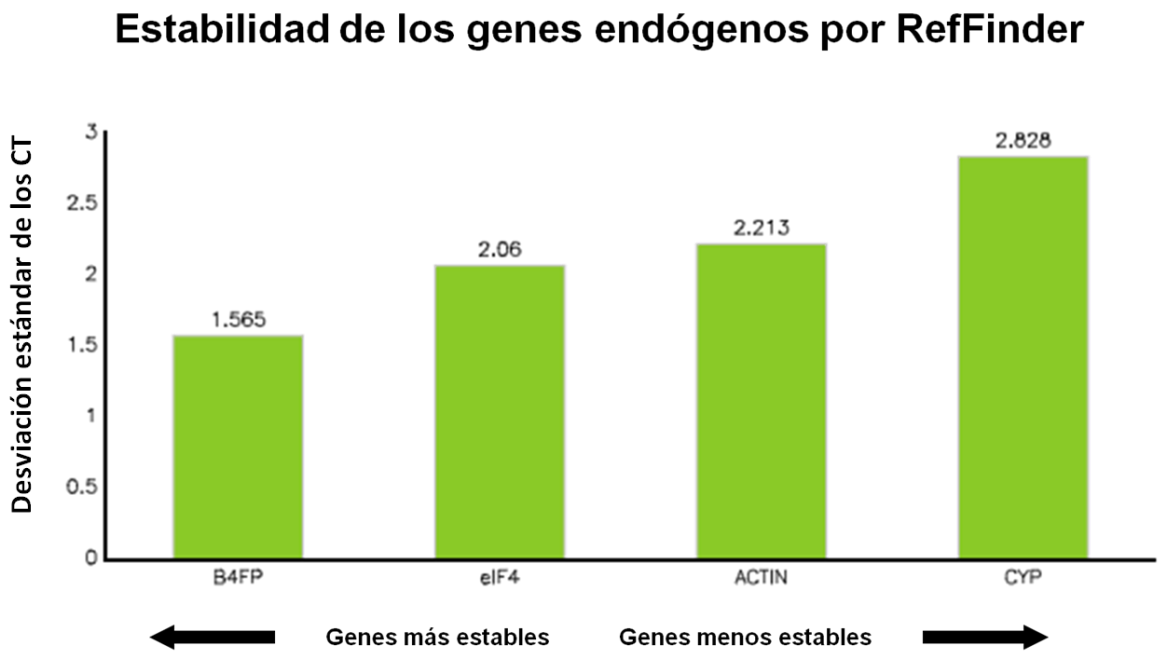


Figura 2-4 Valores de la estabilidad de los genes candidatos de referencia con el índice RefFinder

Tomando en cuenta los resultados obtenidos con cada una de las herramientas utilizadas en este trabajo, se decidió utilizar el gen de referencia *B4FP,* para el estudio del análisis de expresión génica, ya que en la mayoría de los análisis realizados el gen *B4FP* fue más estable que los otros genes propuestos en este trabajo, y de acuerdo a la curva de disociación no presentó dímeros.

2.3.2. Análisis de la expresión de genes

El análisis de la expresión relativa de los genes *PR* de las plantas inoculadas con PMeV, mostró variaciones en los niveles de expresión del gen *PR1* (Figura 2-5). Este gen se

empezó a expresar a partir de los 5 dpi, con un valor de expresión relativa (ER) de 0.3, y alcanzó su mayor nivel de expresión a los 20 dpi, con un valor de ER de 5.5. Sin embargo a partir de los 25 dpi y hasta los 45 dpi, se observó una disminución en los valores de la expresión relativa.

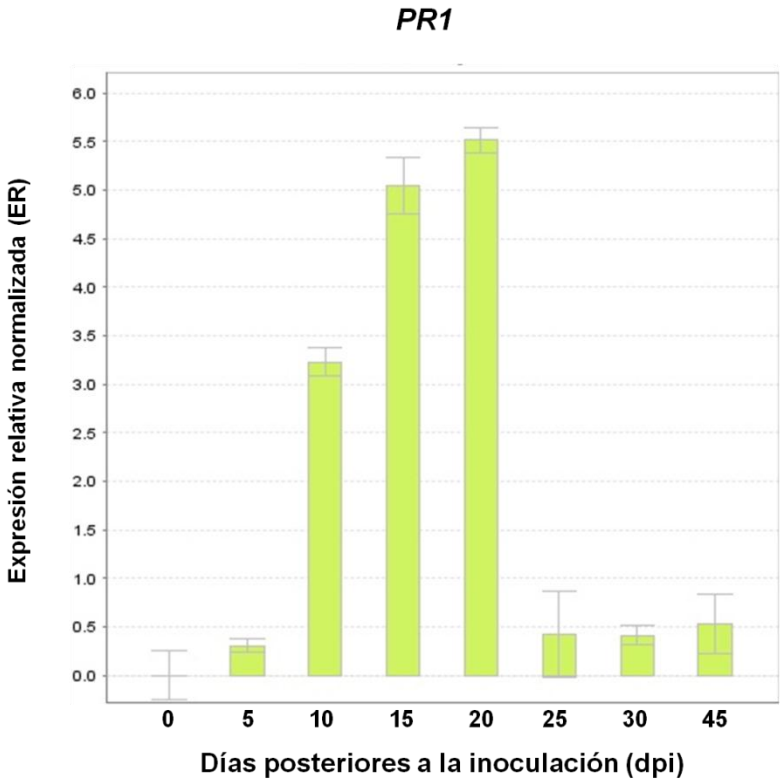


Figura 2-5 Cuantificación de la expresión relativa del gen *PR1* de *C. papaya* en los diferentes días posteriores a la inoculación (dpi). Las barras representan el error estándar

El análisis de la expresión del gen *PR5* (Figura 2-6) mostró un comportamiento similar al gen *PR1,* entre los 5 y 20 dpi. Los mayores niveles de expresión se encontraron a los 15 y 20 dpi (ER=7.4) y el valor mínimo de ER (0.3) se obtuvo a los 25 dpi. Así mismo, se observó un aumento en los niveles de ER a los 30 y 45 dpi (1 y 3.3 respectivamente).

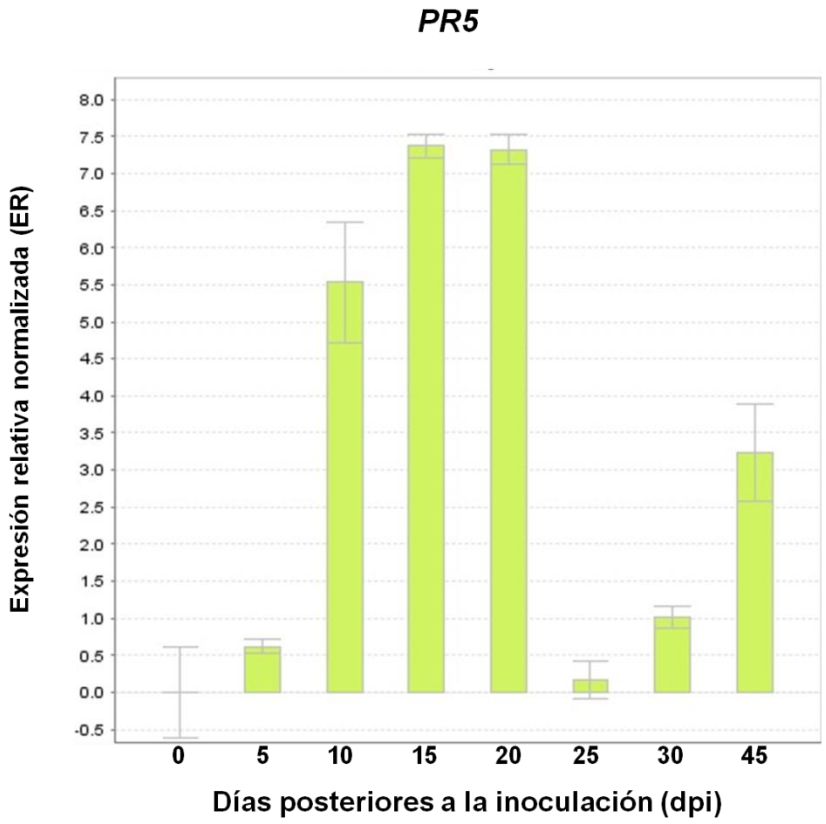


Figura 2-6 Cuantificación de la expresión relativa del gen *PR5* de *C. papaya* en los diferentes días posteriores a la inoculación (dpi). Las barras representan el error estándar.

Como se muestra en la Figura 2-7, los niveles de expresión del gen *PR6* tuvieron un comportamiento similar al mostrado por *PR1 y PR5*. Los mayores niveles de expresión se obtuvieron a los 15 y 20 dpi (ER =8.9 y 8.5 respectivamente). A los 25 dpi se observó el valor mínimo de ER de 0.1 y después a los 30 y 45 dpi los valores de ER aumentaron a 1 y 3.3, respectivamente, como había ocurrido en los dos casos anteriores.

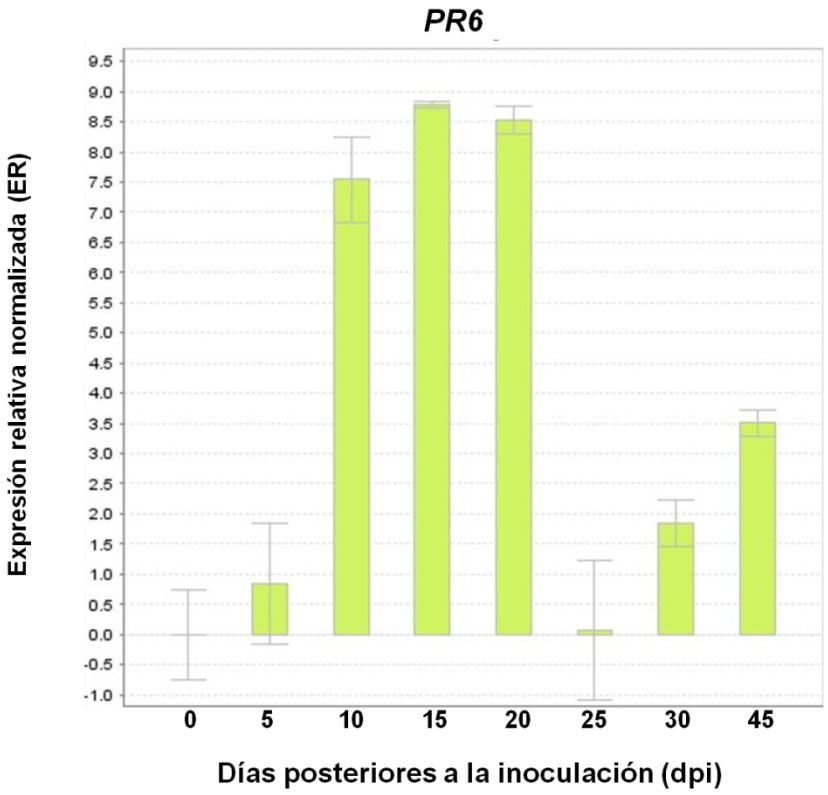


Figura 2-7 Cuantificación de la expresión relativa del gen *PR5* de *C. papaya* en los diferentes días posteriores a la inoculación (dpi). Las barras representan el error estándar.

El análisis de expresión del gen *POD* (Figura 2-8), mostró el mimso comportamiento en su expresión que los genes *PR* entre los 5 y 20 dpi, y alcanzó su valor máximo de ER (7.4) a los 15 dpi. Dichos valores de ER se mantuvieron hasta los 20 dpi, sin embargo, a los 25 y 30 dpi, hubo una disminución en los mismos, para, como en casos anteriores, registrarse un incremento a los 45 dpi.

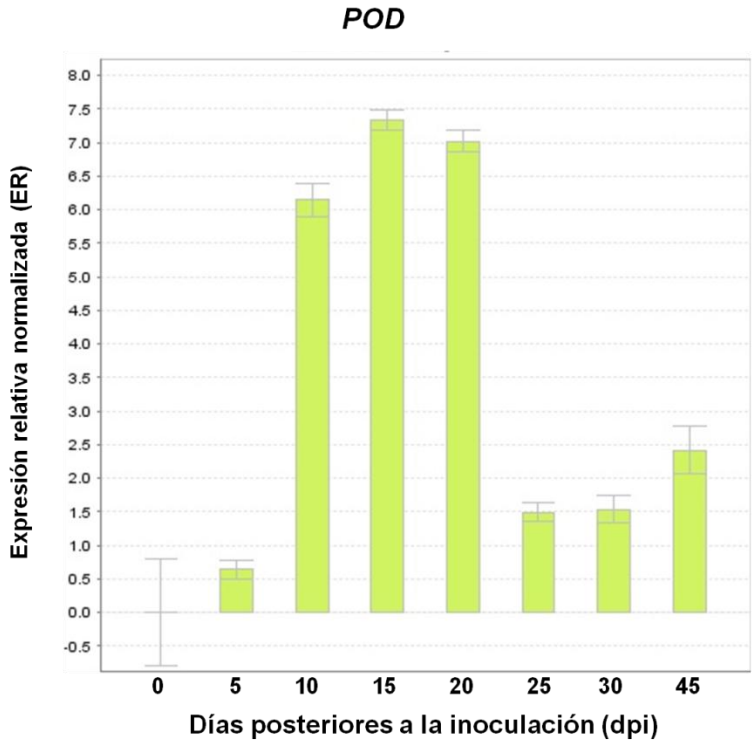


Figura 2-8 Cuantificación de la expresión relativa del gen *POD* de *C. papaya* en los diferentes días posteriores a la inoculación (dpi). Las barras representan el error estándar.

A diferencia de los otros genes estudiados, el gen *POD 12* (Figura 2-9) mostró valores muy bajos de ER (-0.3 a 0.9). También su dinámica de expresión durante los 45 dpi tuvo un comportamiento diferente, ya que a los 10, 25 y 30 dpi, se observó una represión de este gen. Es importante señalar, que a pesar de las diferencias mencionadas, el máximo valor de ER (0.9) fue a los 20 dpi, esto coincidió con lo observado en los otros genes en donde los máximos niveles de ER se encontraron entre los 15 y 20 dpi.

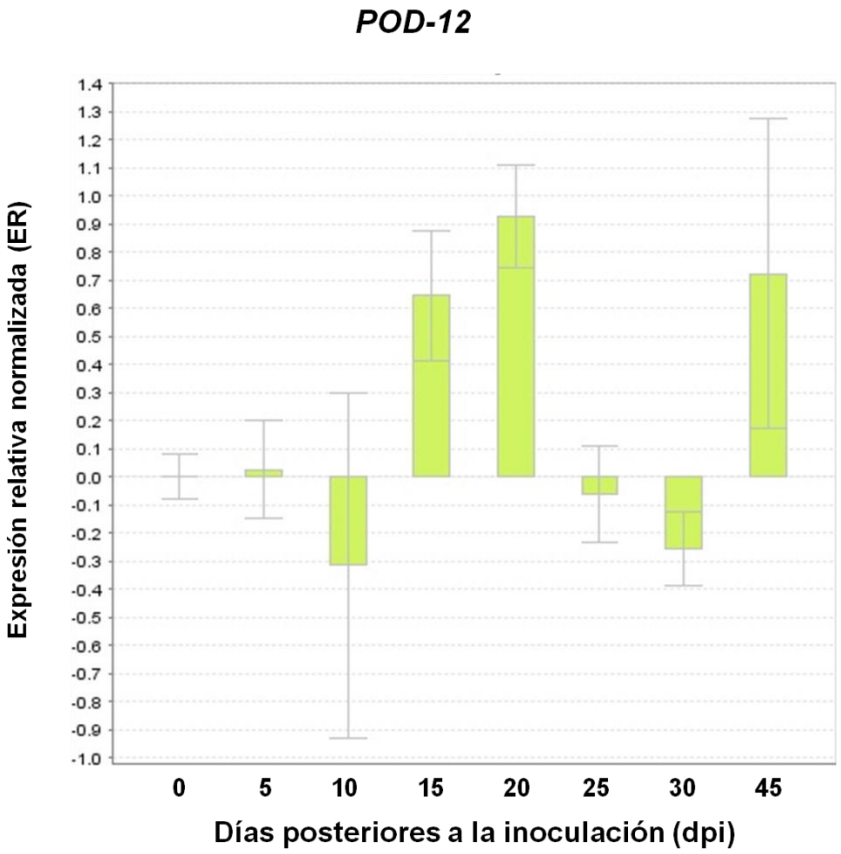


Figura 2-9 Cuantificación de la expresión relativa del gen *POD-12* de *C. papaya* en los diferentes días posteriores a la inoculación (dpi). Las barras representan el error estándar.

2.3.3. Mapas de calor

El análisis de la expresión génica mediante los mapas de calor, se muestra en Figura 2-10. Los patrones de expresión de los diferentes genes, en los días posteriores a la inoculación, fueron similares en cada uno de los genes. Se observaron regiones de mayor sobreexpresión relativa en los genes *PR1, PR5, PR6* entre los 10 y 20 dpi. De igual manera para todos los genes PR, a partir de 25 dpi, hubo una disminución de la expresión a los niveles basales. Mientras que el PR5 y PR6 mostraron un incremento en la expresión a partir de los 45 dpi.

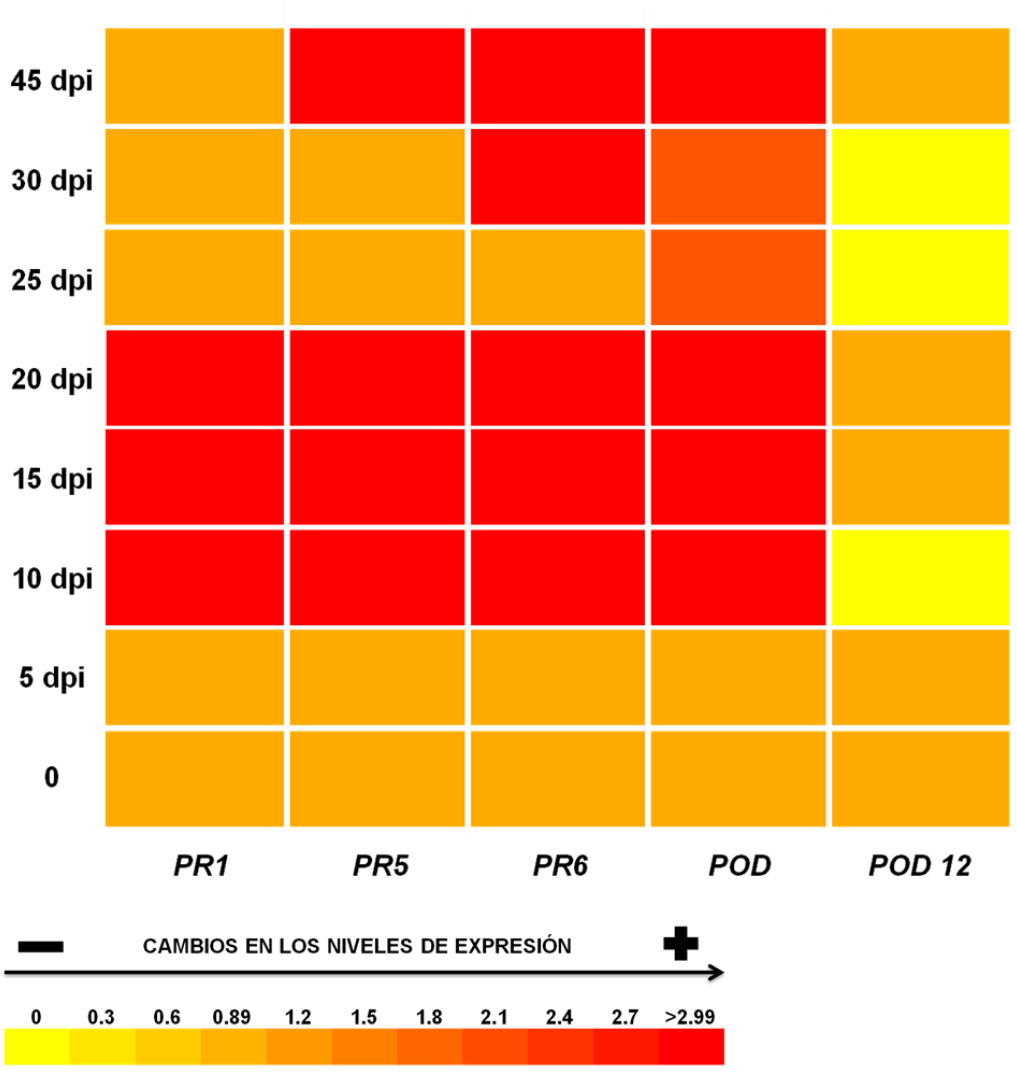


Figura 2-10 Mapa de calor de la expresión relativa de los genes *PR* y *POD* en los diferentes días posteriores a la inoculación de PMeV en *C. papaya*.

Para el gen *POD* se observó el mismo comportamiento de expresión relativa que para los genes *PR* a partir de los 10 y hasta los 20 dpi. Sin embargo, a diferencia de los genes *PR* en este gen la disminución a los 25 y 30 dpi no fue tan marcada como en la expresión de los PR que estuvieron en su nivel basal, esto se puede observar en la gama de colores en el mapa de calor.

En cuanto al gen *POD 12,* se pudo observar que a los 10, 5 y 30 dpi hubo una represión de su expresión, sin embargo, como en los otros genes analizados, la mayor expresión se obtuvo a los 15 y 20 dpi, y de nueva cuenta a los 45 dpi se observó un ligero aumento en la expresión de este gen.

Al nivel fenotípico, ninguna de las plantas de papaya inoculadas mostró síntomas de la enfermedad hasta los 30 dpi, cuando se presentó la exudación espontánea del látex, síntoma característico de la enfermedad, en los frutos (Figura 2-11A). Esto se pudo correlacionar con lo que ocurrió a nivel molecular en cuanto a la dinámica de la expresión de los genes de resistencia estudiados (Figura 2-11B), lo cuales de manera general disminuyeron su expresión a partir de los 25 dpi.

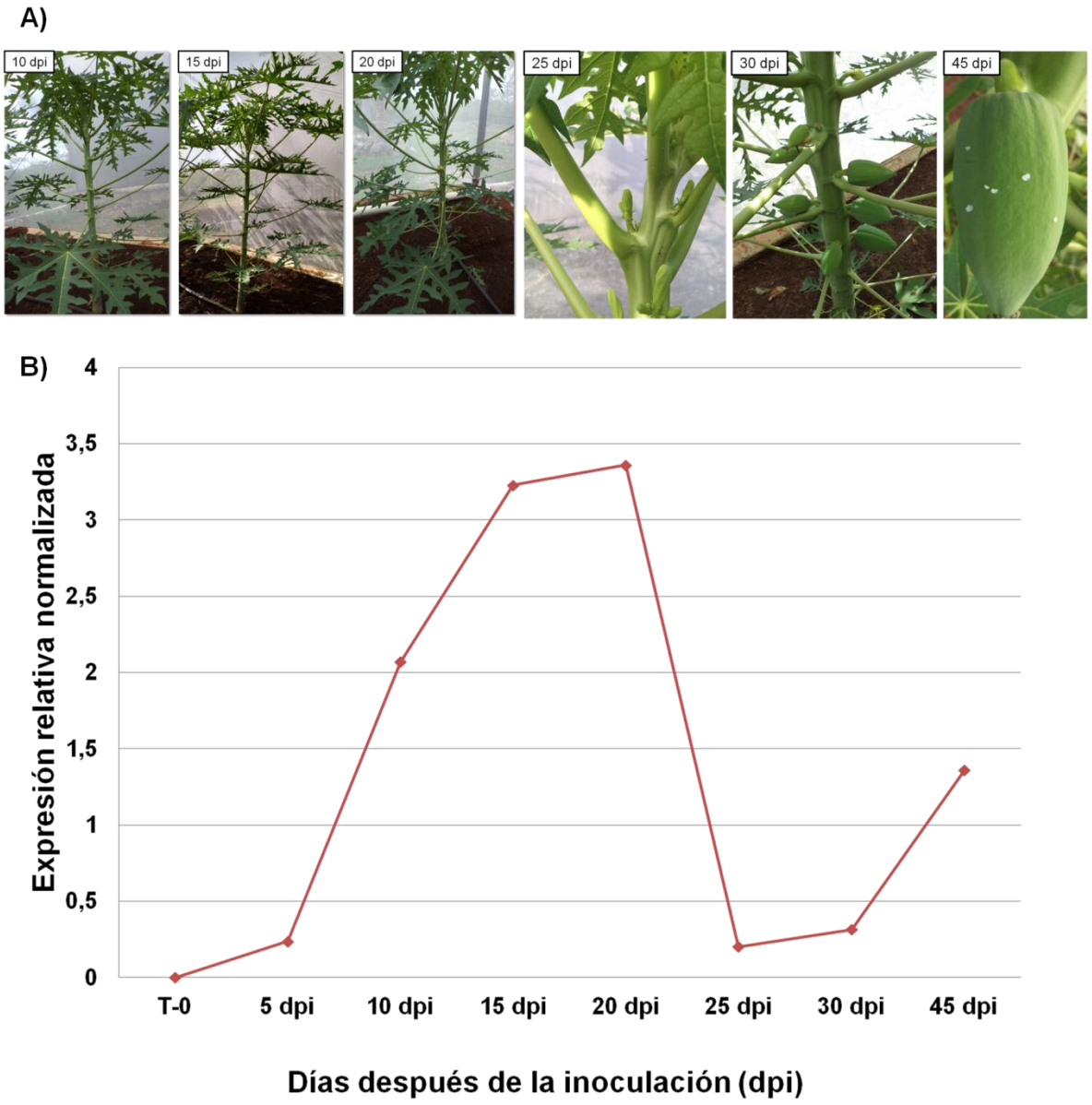


Figura 2-11 Comparación de la presencia de los A) síntomas de la enfermedad de la meleira durante los días posteriores a la inoculación y B) la expresión relativa de los genes analizados.

2.4. Discusión

El análisis de la expression de genes es un paso importante para entender el papel de los genes en los diferentes procesos en las plantas (Hu *et al*., 2009). Sin embargo, para cuantificar con exactitud la expresión génica, se deben tener en cuenta las variaciones experimentales, tales como calidad y cantidad de la muestra, presencia de inhibidores, diseño de cebadores, extracción de RNA y eficiencia de la síntesis de cDNA (Zhu *et al*., 2012).

Por lo tanto, la selección de una estrategia de normalización adecuada, es de crucial importancia para la adquisición de datos biológicamente significativos. Entre los diversos métodos propuestos hasta ahora, el método de normalización más utilizado, es el que evalúa uno o más genes de referencia. Un gen de referencia ideal debe expresarse a un nivel constante, a través de diversas condiciones, y se supone que su expresión no se ve afectada por parámetros experimentales (Vandesompele *et al.,* 2009; Schmittgen y Zakrajsek, 2000).

Con base en un estudio previo, realizado en papaya, sobre la estabilidad de un conjunto de 20 genes de referencia, ante diferentes condiciones experimentales (estrés biótico y abiótico) (Zhu *et al*., 2012), en el presente trabajo se evaluaron cuatro genes candidatos de referencia (*ACTIN, B4FP, CYP* y *elF4*) a fin de seleccionar el gen más estable, para conocer la expresión génica de plantas de *C. papaya* variedad Maradol, sanas e infectadas con el virus PMeV, a diferentes días posteriores a la inoculación viral.

Los resultados mostraron que los genes *B4FP* y *elF4* fueron lo más estables para este experimento, lo cual coincide parcialmente, con lo reportado por Zhu et al., (2012), que encontraron que el gen más estable para análisis de expresión génica en *C. papaya,* bajo estrés biótico era el *elF4.* Sin embargo, en este trabajo se decidió usar como gen de referencia al *B4FP,* debido a que en las curvas de disociación de este gen, no se presentó la formación de dímeros y los análisis estadísticos utilizados: *Best keeper* v1 (Pfaffl *et al*., 2004) *geNorm* 3.5 (Vandesompele *et al.,* 2002) y RefFinder (Andersen *et al.*, 2004) validaron que la estabilidad de este gen era adecuada para el estudio.

Al realizar un análisis cuantitativo de miRNA por PCRq en *C. papaya* var. Golden infectada con PMeV, se reportó que *CYP* fue el gen más estable (Abreu *et al.,* 2014), sin embargo, en nuestro trabajo, este gen presentó una estabilidad menor que los otros genes evaluados, y en la curva de disociación se observó la formación de dímeros. Todo esto nos muestra la gran importancia de validar los genes candidatos de referencia para cada especie de planta, e incluso para cada variedad, así como para las condiciones experimentales empleadas (Remans *et al*., 2008; Zhu *et al*., 2012).

El gen de la familia de proteínas de la banda 7 (*B4FP*), presenta una gran diversidad en las plantas superiores. El proceso de adaptación a las condiciones de diversos estreses ambientales, a las que se enfrentan dichas plantas, ha conllevado a la reducción de las duplicaciones de este gen, haciendo que su expresión se mantenga estable ante diferentes condiciones (Gehl y Sweetlove 2014; Van Aken *et al,* 2010), esto explicaría, en términos biológicos, la estabilidad del gen *B4FP* en los análisis realizados en diferentes días posteriores a la inoculación del PMeV.

En lo que respecta a la expresión del gen *eIF4,* ésta se mantuvo estable posterior a la inoculación del PMeV en las plantas de papaya, esto puede ser explicado, porque su función está relacionada constitutivamente con los mecanismos de resistencia ante infecciones ocasionadas por virus (Dutt *et al*., 2015), por ello su estabilidad no es afectada por la presencia de este patógeno.

La expresión de los genes *ACTIN* y *CYP* fue menos estable que la de los otros dos genes estudiados. Esto podría explicarse porque el gen *ACTIN* es un componente del citoesqueleto de la célula y se expresa durante el proceso de elongación celular, que es una función de importancia central para el desarrollo y la rigidez celular (Slajcherová *et al.,* 2012; Mc Dowell *et al*., 1996) y dado que el PMeV altera las funciones celulares (Rodrigues *et al*., 2009), podría estar incidiendo en la inestablidad de dicho gen. Lo mismo puede estar ocurriendo en el caso del gen *CYP,* que se induce durante los procesos celulares, tales como la división celular, regulación transcripcional, señalización celular, pre-mRNA splicing, presencia de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y tolerancia al estrés biótico y abiótico (Kumar *et al.,* 2015; Kumar *et al*., 2012), ya que se ha reportado que la

presencia del PMeV en las plantas provoca el aumento de H_2O_2 en las células y cambios celulares tales como: una mayor absorción de agua y aumento en la presión interna de las células, ocasionando ruptura celular (Rodrigues *et al*., 2009), así como una disminución de la fuerza de adhesión en las nervaduras de las hojas y en el látex de plantas infectadas (Magaña-Álvarez *et al.,* 2016), de ahí que se induzcan cambios en la expresión de los genes de *ACTIN* y *CYP.*

Se ha establecido que los genes *PR1, PR5* y *PR6,* se expresan de forma inducida en las plantas, ante las infecciones ocasionadas por virus, hongos, bacterias, etc., lo que activa los mecanismos de resistencia (sistémica adquirida o respuesta hipersensible) y la subsiguiente codificación de las proteínas relacionadas con la patogénesis (*PR*), permitiendo de esta forma al hospedero, inhibir el crecimiento, multiplicación y propagación de los patógenos que lo afectan (Van Lonn *et al.,* 2006; Van Loon *et al.,* 1999; Boll *et al*., 1996).

La expresión de los genes *PR* analizados en este trabajo, mostró una dinámica de similar durante los días posteriores a la inoculación (dpi) en las plantas analizadas, sugiriendo de esta forma que la expresión de estos genes está asociada a la presencia del PMeV.

Se ha descrito en trabajos de mecanismos de defensa en plantas, que la expresión de los transcritos de *PR1* exhiben actividad antifúngica (Zhu *et al.,* 2012a; Zhu *et al.,* 2012b; Antoniw *et al.,* 1980), por lo que se ha usado como marcador molecular para conocer la interacción planta-patógeno, esto con la finalidad de entender de una mejor manera la respuesta sistémica adquirida (Van Loon *et al*., 2006). Dicha actividad antifúngica ha sido descrita en numerosos trabajos, encontrándose que en las interacciones entre del trigo con los hongos *Fusarium graminerum* y *Mycosphaerella graminicola*, los transcritos de *PR1* se expresan durante la infección de dichos hongos, activando de esta forma los diferentes mecanismos de respuestas en la planta (Shi-wen *et al.,* 2014; Ray *et al.,* 2003; Pritsch *et al.,* 2001).

Aunque *PR1* no ha sido muy estudiado en la interacción planta-virus, se ha descrito que en tabaco está implicado en la resistencia a estos patógenos (Shah *et al.,* 2014; Ebrahim

et al., 2011; Cutt *et al.,* 1989). Esto fue confirmado después por ElMorsi y col. (2015), quienes reportaron que la expresión de *PR1* presentó una regulación positiva*,* en el primer día de la post-infección del virus la mancha amarilla del Iris (IYSV) en cebolla.

En el presente trabajo, se pudo detectar que los transcritos del gen *PR1,* se expresaron a partir de los 5 dpi*,* aumentado de forma constante hasta los 20 dpi, obteniéndose en dicho momento los valores máximos de expresión (5.5), esto sugiere que se activó la expresión de este gen en *C. papaya* ante la infección del PMeV.

Dichos resultados coinciden con los estudios previos antes reportados, donde se menciona que *PR1* está involucrado en el mecanismo de respuesta sistémica adquirida ante la presencia de infecciones virales (ElMorsi *et al.,* 2015; Cutt *et al.,* 1989). Nuestros resultados y los descritos con anterioridad, demuestran que el gen *PR1* está constitutivamente presente en diferentes tejidos de la planta y que juega un papel importante en los mecanismos de defensa sistémica adquirida, ya que su expresión se puede activar ante la infección de un virus y no sólo ante la infección de hongos (Van Loon *et al.,* 2006, Makandar *et al.,* 2006).

Aunque se desconoce la función específica de *PR5* (codifica para proteínas de tipo traumatinas) en las plantas, se ha visto que también interviene en la resistencia sistémica adquirida, esto como respuesta al estrés biótico. Se conoce que causa la inhibición del crecimiento de las hifas y la reducción de la germinación de esporas en infecciones causadas por hongos, así como inhibición en infecciones bacterianas (Walter *et al.,* 2010; Bonasera *et al.,* 2006; Thompson *et al*., 2007; Van Loon y Van Strien, 1999).

En este estudio, se observó la expresión de *PR5* a partir de los 5 hasta los 20 dpi sólo en las plantas de *C. papaya* infectadas con el PMeV. Dichos resultados son similares a los reportados anteriormente por Wang y col. (1996), que detectaron la expresión del gen PR5 en hojas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con el virus de la arruga del nabo (TCV).

También nuestros resultados coinciden con los hallazgos sobre estudios de mecanismos de defensa en plantas infectadas por virus, como los reportados sobre la expresión del

PR5 en las plantas de cebolla infectadas con el virus de la mancha amarilla del iris (IYSV) y de arroz con el virus del rayado del arroz (RDV) (ElMorsi *et al.,* 2015; Satoh *et al.,* 2010).

Se ha demostrado que el gen *PR6* presenta una actividad inhibidora de proteinasas, que se activa como mecanismo de defensa contra el ataque de insectos, nemátodos, bacterias, hongos y virus (Han *et al.,* 2015; Shi-wen *et al.,* 2014; Mafra *et al.,* 2013; Van Loon *et al.,* 2006; Van Loon y Van Strien, 1999). En nuestro estudio, de todos los genes analizados el gen *PR6* fue el que mostró los valores de expresión más altos, comenzando a los 10 dpi (7.5), para después alcanzar la máxima expresión relativa a los 15 dpi (8.7).

Esta dinámica de expresión observada en el gen *PR6* de la plantas infectadas con PMeV, ya se había observado en trabajos realizados en plantas de arroz infectadas con el virus rayado del arroz (*VRS*), en donde *PR6* presentó una expresión positiva después de los 12 dpi, así como también, en un estudio realizado en plantas de la especie curcubitácea *Cucumis metuliferus* infectadas con *PRSV* (*Papaya ringspot virus*), en donde se observó que un gen putativo relacionado con la inhibición de proteasas, se expresaba en las plantas susceptibles a los 21 dpi (Lin *et al*., 2013; Satoh *et al.,* 2010).

El comportamiento en los niveles de expresión observados principalmente en el *PR6*, se podría explicar porque dichos genes codifican para los inhibidores de las proteasas, y es razonable suponer que la planta, al intentar combatir la infección por el PMeV, activa los genes que van a desencadenar a las proteínas inhibidores de proteasas (Alfenas-Zerbini *et al.,* 2009).

Sin embargo, la disminución en la expresión que presentó *PR6* a los 25 dpi, podría estar relacionada con una estrategia contradefensiva del virus hacia la planta, esta dinámica de expresión ya se ha observado en plantas infectadas con *Potyvirus*, en dichos patógenos inactivan los inhibidores de proteasas de las plantas, con la finalidad de que se realice de forma exitosa el ensamblaje de la cápside viral y con esto la infección sistémica del hospedero (Carrington *et al.*, 1990; Alfenas-Zerbini *et al.,* 2009).

Las peroxidasas *POD* y *POD-12,* están presentes en las células vegetales para reforzar la pared celular, mediante la lignificación y mejorar de esta forma la resistencia contra múltiples patógenos. Se conoce que las peroxidasas jueguen un papel importante contra los daños causados por las especies reactivas de oxígeno, durante la respuesta hipersensible en la planta (Shi-wen *et al.,* 2014; Van Loon *et al.,* 2006; Van Loon *y* Van Strien, 1999). También se ha observado que la actividad de las peroxidasas aumenta en el rango de 10-14 días después de la inoculación del virus Y de la papa, activándose esta forma la resistencia adquirida sistémica (Doubnerova *et al.,* 2007*).*

En el presente trabajo, se pudo observar que la expresión del *POD*, inició a los 10 dpi y del *POD-12* comenzó hasta los 15 dpi. Esto coincide con lo ya reportado sobre la expresión de peroxidasas en plantas de arroz, infectadas con el virus rayado del arroz (*VRS*), donde no hubo expresión hasta los 12 dpi y en *Citrus aurantifolia* infectado con el Virus de la tristeza de los cítricos (*VTC*) donde la expresión del *POD* se observó a los 3dpi (Satoh *et al.,* 2010; Gandía *et al.,* 2007).

La dinámica de expresión que mostraron dichos genes fue diferente entre sí, ya que el gen *POD* presentó una dinámica similar a la mostrada por los genes PR, sin embargo, el gen POD-12 tuvo una expresión negativa a los 10 dpi.

De acuerdo a la dinámica de expresión observada en los genes *POD* y *POD-12* durante el intervalo de los 5 hasta los 20 dpi, la infección del PMeV en *C. papaya* pudiera generar la acumulación de H_2O_2 en los conductos laticíferos, mecanismo primario para el fortalecimiento de la pared celular ante la presencia del virus (Rodrigues *et al.,* 2009). Sin embargo, se ha observado que este fenómeno no es tan prolongado en esta relación huésped–patógeno, por lo que se considera que el PMeV, probablemente, tenga un mecanismo específico para debilitar la pared celular después de la infección, y con esto infectar a la planta de manera rápida (Magaña-Álvarez *et al.,* 2016).

Como se pudo observar en el mapa de calor y de acuerdo a los síntomas en los frutos, la disminución de la expresión de los genes de resistencia, ocurrió después de los 20 dpi, cuando comenzaba el proceso de fructificación, etapa fenológica donde se presentan los

títulos más altos del PMeV en las plantas de *C. papaya*. Sin embargo, a los 45 dpi se pudo observar un ligero aumento, de nueva cuenta, en la expresión de los genes analizados de forma concomitante, pero también se observó la exudación espontánea en los frutos de papaya de las plantas inoculadas, lo cual nos pudiera indicar que la planta aún estaba ejerciendo sus defensas contra el virus.

En cuanto a los resultados obtenidos para la expresión relativa (ER) de los genes analizados, se apreció que entre los 10 y los 25 dpi, se obtuvieron los valores más altos, sin embargo, a partir de los 25 y hasta los 45 dpi, hubo una disminución de la misma. Esto puede deberse a que como la inoculación del látex infectado fue realizada en el meristemo apical, el movimiento de las partículas virales desde este sitio hasta los conductos laticíferos del resto de la planta, pudo haber tardado ese lapso de tiempo, y por ello, a partir de los 25 dpi, la expresión de los genes disminuyó, pues el virus ya había iniciado su replicación,y posiblemente de esta manera contrarrestó los mecanismos de defensa de la planta, al mismo tiempo que se producía un aumento en la carga viral y la consecuente aparición de los síntomas de la enfermedad (Ver anexo 3).

En conclusión, se pudo corroborar que los genes *PR* y *POD,* que se expresan de manera inducida en las plantas ante otras infecciones, también se “activan” con la presencia del Papaya meleira virus, lo que nos permitió entender de una mejor manera la interacción *C. papaya-PMeV,* específicamente en el caso de la variedad Maradol, que fue el modelo utilizado en este estudio. Es importante destacar, que esta variedad de papaya ha mostrado una susceptibilidad al PMeV que puede considerarse elevada, por la manifestación de síntomas no observados en otras variedades (como los nódulos de látex en los frutos) (Tapia-Tussell *et al*., 2014), de ahí la importancia y novedad de los resultados obtenidos en este trabajo, que nos han permitido conocer cuando se “encienden” y “apagan” los genes relacionados con la respuesta de la planta a la infección del patógeno. Esto facilitará la comparación, con otras variedades, para conocer si los mecanismos de defensa de la Maradol no están actuando de forma eficiente ante el virus, y de ahí su mayor susceptibilidad; lo cual también brindará una información valiosa para el trabajo de mejoramiento, pues indicará hacia donde debe dirigirse el mismo.

CAPÍTULO 3. PHYSICAL CHARACTERISTICS OF THE LEAVES AND LATEX OF PAPAYA PLANTS INFECTED WITH THE PAPAYA MELEIRA VIRUS.

Anuar Magaña-Álvarez[1,2], Jean Carlos Vencioneck Dutra[1], Tarcio Carneiro[1], Daisy Pérez-Brito [2, *], Raúl Tapia-Tussell [2], Jose Aires Ventura [1,3], Inocencio Higuera-Ciapara [4], Patricia Machado Bueno Fernandes [1] and Antonio Alberto Ribeiro Fernandes [1]

[1] Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, Vitória, Espírito Santo 29040-090, Brazil; anuar.magana@cicy.mx (A.M.-A.); jeanvencioneck@gmail.com (J.C.V.D.); tarcio_carneiro@hotmail.com (T.C.); ventura@incaper.es.gov.br (J.A.V.); patricia.fernandes@ufes.br (P.M.B.F.); alberto.fernandes@ufes.br (A.A.R.F.).

[2] Laboratorio GeMBio, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 # 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán 97200, Mexico; rtapia@cicy.mx.

[3] Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, R. Afonso Sarlo 160, Vitória, Espírito Santo 29052-010, Brazil.

[4] Unidad de Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Ave. Normalistas # 800, Col. Colinas de la Norma, Guadalajara, Jalisco 44270, Mexico; inohiguera@gmail.com.

* Correspondence: daisypb@cicy.mx; Tel.: +52-999-942-8369; Fax: +52-999-981-3900

International Journal Molecular Sciences Vol. 17 (4) 574; doi:10.3390/ijms17040574. Published: 15 April 2016.

Available on line: www.mdpi.com/journal/ijms.

3.1. Abstract

Sticky disease, which is caused by *Papaya meleira virus* (PMeV), is a significant papaya disease in Brazil and Mexico, where it has caused severe economic losses, and it seems to have spread to Central and South America. Studies assessing the pathogen-host interaction at the nano-histological level are needed to better understand the mechanisms that underlie natural resistance. In this study, the topography and mechanical properties of the leaf midribs and latex of healthy and PMeV-infected papaya plants were observed by atomic force microscopy and scanning electron microscopy. Healthy plants displayed a smooth surface with practically no roughness of the leaf midribs and the latex and a higher adhesion force than infected plants. PMeV promotes changes in the leaf midribs and latex, making them more fragile and susceptible to breakage. These changes, which are associated with increased water uptake and internal pressure in laticifers, causes cell disruption that leads to spontaneous exudation of the latex and facilitates the spread of PMeV to other laticifers. These results provide new insights into the papaya-PMeV interaction that could be helpful for controlling papaya sticky disease.

Keywords: papaya sticky disease; *Papaya meleira virus*; leaf midribs; laticifer; latex; pathogen-host interaction.

3.2. Introduction

Papaya (*Carica papaya* L.) production currently amounts to approximately 12 million tons per year worldwide, and Brazil and Mexico are the main exporting countries (FAOSTAT, 2015). Diseases are a growing problem in papaya cultivation and commercialization. Sticky disease, or meleira, which is caused by the Papaya meleira virus (PMeV), is responsible for severe economic losses that can affect between 50% and 80% of the total production (Abreu *et al.,* 2014).

Papaya tissues contain specialized cells known as laticifers, which are rich in proteases and alkaloids (El Moussaoui *et al.,* 2001). When infected by PMeV, papaya plants spontaneously exudate the latex from leaves and fruits. The latex oxidizes during atmospheric exposure, resulting in small necrotic lesions on young leaves and a sticky substance on the fruits that makes them unacceptable for consumption (Abreu *et al.,* 2015; Ventura *et al.,* 2004; Maciel-Zambolim *et al.,* 2003). Light microscopy studies have been conducted to investigate the changes in papaya tissues infected with PMeV (Rodrigues *et al., et al.,* 2009). More recently, atomic force microsocopy AFM was used to study the cell wall morphology (Radoti´c *et al.,* 2012; Milani *et al.,* 2001) and the structural and mechanical properties of the cell walls of plants exposed to microorganisms (Aquije *et al.,* 2010; Lesniewska *et al.,* 2004).

Recently, reviewed review demonstrated the importance of highly sophisticated and innovative methods of analysis to improve our understanding of plant-pathogen interactions and increase crop yield (Mahlein *et al.,* 2016). For example, AFM could be used for screening disease-resistant breeding material. In the the leaf midribs and latex of and sticky diseased papaya plants using AFM and scanning electron microscopy (SEM).

3.3. Results

3.3.1. Topographical Analysis of the Leaf Midribs and Latex

Two-dimensional AFM images from different areas of the leaf midribs showed that the surfaces of the healthy plants are smoother than those of the sticky diseased plants (Figure 3-1A, B). The surfaces of both the healthy and diseased plants exhibited valleys, but these features were much deeper in the diseased plants (Figure 3-1B) than in the healthy plants (Figure 3-1A).

The two-dimensional AFM images obtained from latex were very distinct and revealed different surface features for healthy papaya fruits (Figure 3-1C) and those from PMeV-infected plants (Figure 3-1D). Indeed, the latex from healthy fruits had practically no roughness, and the surface was mostly flat.

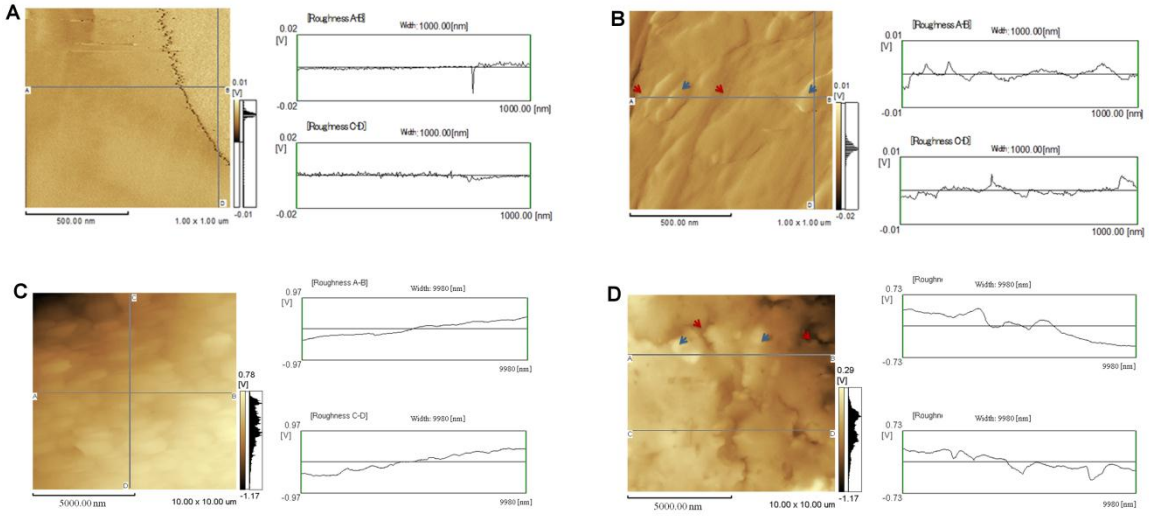


Figura 3-1 Representative two-dimensional atomic force microscopy (AFM) images and roughness profiles of the papaya leaf midribs (**A**,**B**) and latex (**C**,**D**) of healthy (**A**,**C**) and PMeV-infected papaya plants (**B**,**D**). Superficial differences between the samples from the healthy and infected plants. The infected samples exhibit valleys (red arrows) and peaks (blue arrows) that were not observed in the samples from the healthy plants.

The three-dimensional images of the leaf midribs revealed a smooth microstructure with shallow valleys in the healthy plants and a rough microstructure (Figure 3-2A) with prominent ridges and deep valleys (Figure 3-2B) in the diseased plants. The images of the latex from the healthy papaya fruits included shallower valleys (Figure 3- 2C) than those of the latex from the infected fruits (Figure 3-2D). Thus, the surface of PMeV-infected latex is more heterogeneous and has deeper valleys.

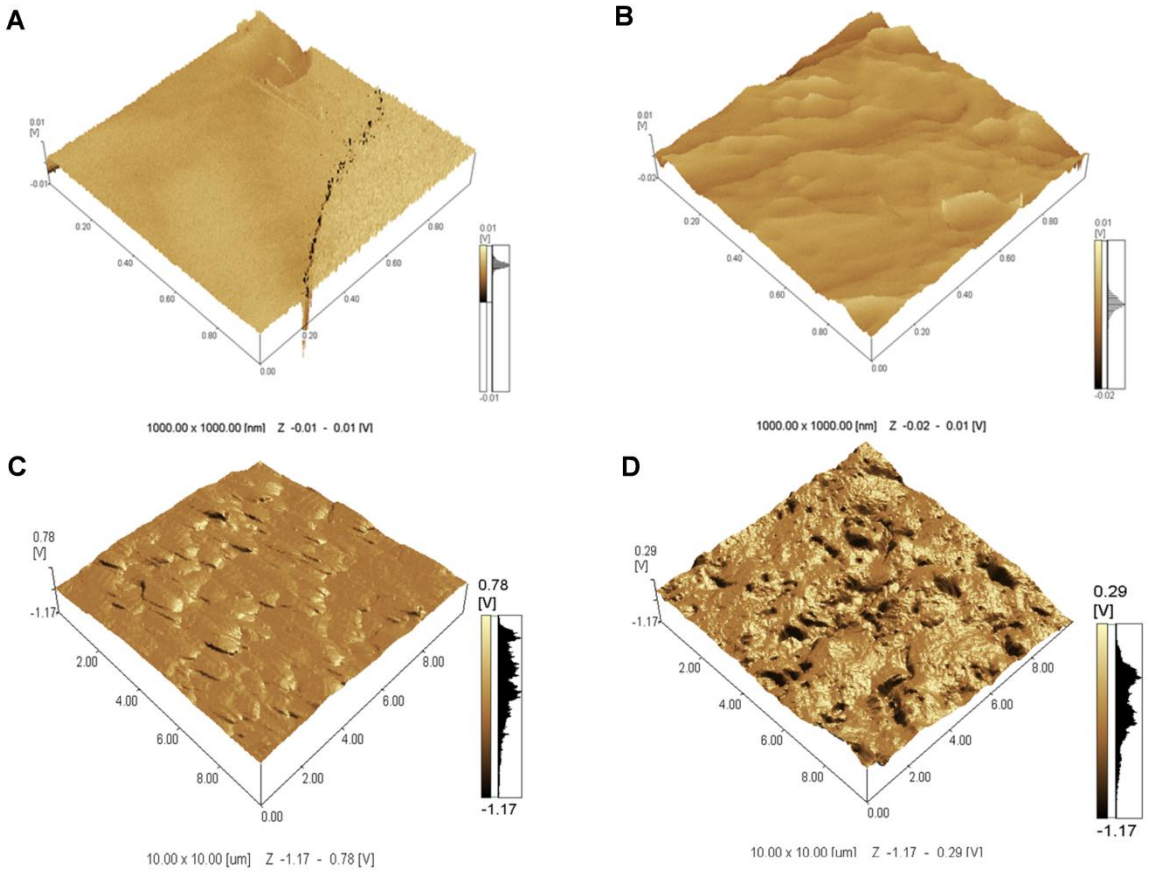


Figura 3-2 Representative three-dimensional AFM images of the leaf midribs (**A**,**B**) and latex (**C**,**D**) of healthy (**A**,**C**) and PMeV-infected papaya plants (**B**,**D**). The microstructures of the healthy leaf midribs and latex (**A**, **C**) show smooth surfaces, whereas the infected leaf midribs and latex have rough surfaces (**B**,**D**).

The values of the roughness parameter, Ra, (Figure 3-3) in the leaf midribs (**A**) and latex (**B**) were larger for the diseased plants than for the healthy plants, indicating that there is a significant difference ($p < 0.05$) between the surface roughness of the healthy and diseased plant tissues. This difference was more significant in the latex than in the leaf midribs.

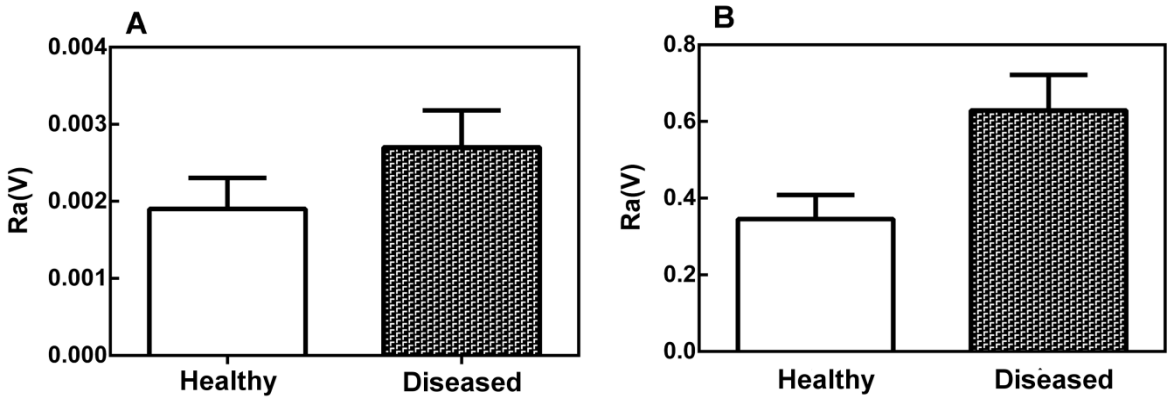


Figura 3-3 Structural roughness parameter Ra of the leaf midribs (**A**) and latex (**B**) of healthy and diseased papaya plants. The roughness (Ra) is the arithmetic mean of the deviations in the profile curve with respect to the midline of the basic length. The error bars represent the variations between biological replicates. The difference between the means is statistically significant (Mann–Whitney test, $p < 0.05$).

3.3.2. Mechanical properties of the Leaf midribs and Latex

The AFM adhesion force maps and histograms (Figure 3-4) provide information about the mechanical properties of the leaf midribs and latex of the healthy and diseased plants. The adhesion force maps are given in false white and black colors (Figure 3-4, inset). The frequency is presented as a percentage of the measured adhesion force in a 1000-nm lateral scan of 256 force curves.

According to the histograms obtained from an individual retraction curve, the diseased plants displayed increased heterogeneity of the surface midribs (Figure 3-4B) compared to the healthy plants (Figure 3-4A). Changes in the stiffness distribution are apparent in the color-coded adhesion force maps (Figure 3-4, insets). Soft areas (coded in blue) were predominant in the diseased plants (Figure 3-4B), whereas stiff domains (coded in red) were

numerous in the healthy plants. This indicates that the cell walls of the healthy plants are more rigid than those of the diseased plants. The latex of the diseased fruits (Figure 3-4C) also displayed increased heterogeneity compared to the healthy plants (Figure 3-4D).

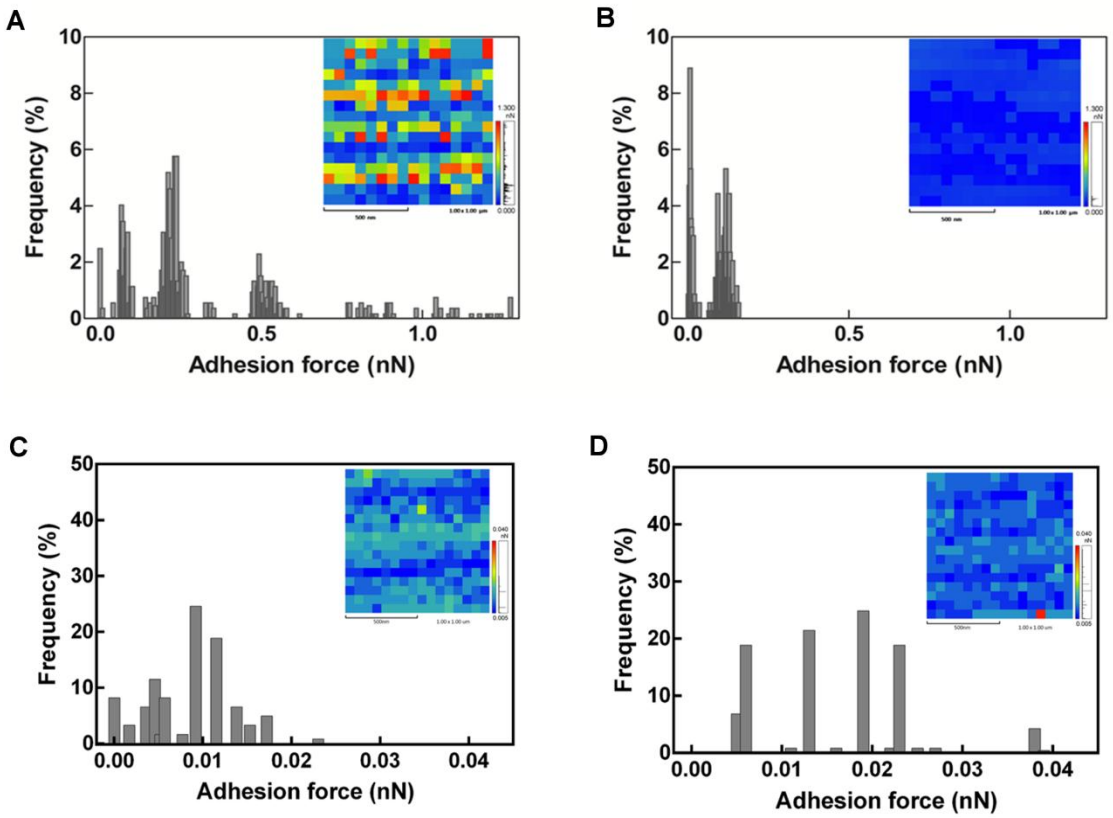


Figura 3-4 AFM maps and histograms of the adhesion force between the tip and the sample surface of the leaf midribs (**A**,**B**) and latex (**C**,**D**) of healthy (**A**,**C**) and diseased papaya plants (**B**,**D**). The vertical axis shows the frequency of the adhesion force in a 1000-nm lateral scan of 256 force curves, and the insets are the corresponding force maps.

The average adhesion force values of the healthy and diseased plants were 1.25 ± 0.05 and 0.15 ± 0.05, respectively (Figure 3-5).

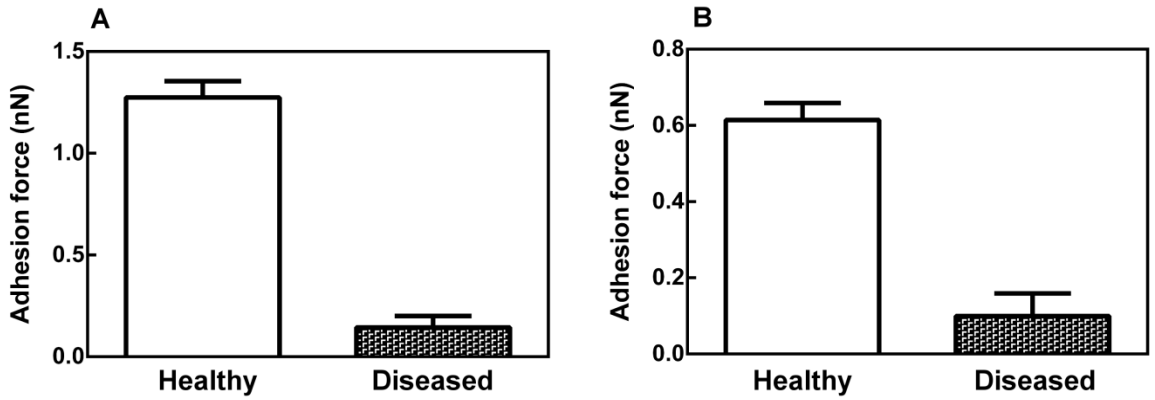


Figura 3-5 Average adhesion forces of the leaf midribs (**A**,**B**) and latex (**C**,**D**) of healthy (**A**,**C**) and PMeV-infected papaya plants (**B**,**D**). The graphs show that the midribs and latex of the healthy plants have a greater adhesion force than those from the infected plants. The error bars represent the variations between biological replicates. The difference between means is statistically significant (Mann–Whitney test, $p < 0.05$).

3.3.3. Latex examination by Scanning Electron Microscopy (SEM)

An analysis of the SEM micrographs revealed that the latex particles in healthy papaya fruits (Figures 3-6A and 3-7A) were closer together and more compact than those in fruits infected with PMeV (Figures 3-6B and 3-7B). Small circles of approximately 40 nm, which likely arose because of the degradation of the latex by the viral infection, are observed in the diseased fruits (Figure 3-7B) but not in the healthy fruits (Figure 3-7A).

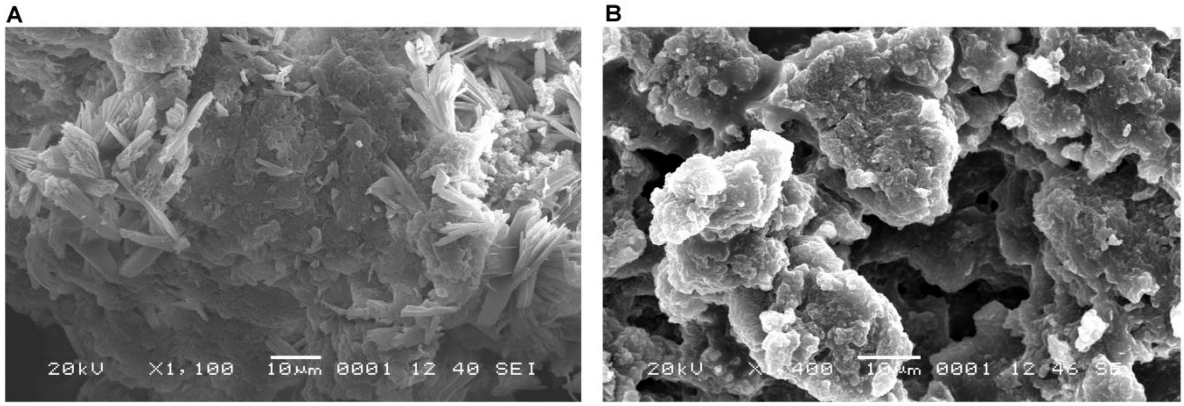


Figura 3-6 Scanning electron microscopy (SEM) images of the latex from healthy (**A**) and PMeV-infected papaya fruits (**B**). The samples of healthy plants' latex shows more united and compact latex particles than those from infected plants, which appeared relatively sparse.

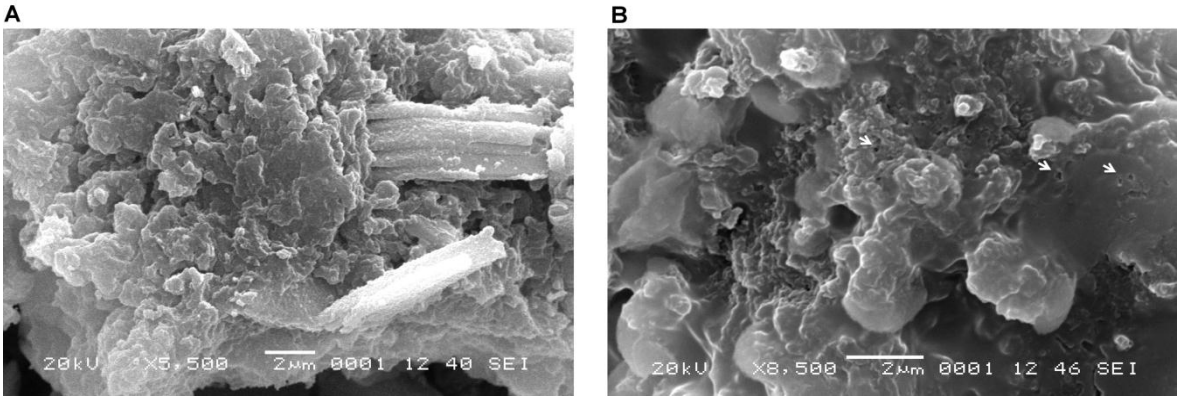


Figura 3-7 High-magnification SEM images of the latex of (**A**) healthy and (**B**) and PMeV-infected papaya fruits. In the infected latex small circles ranging from 40 to 50 nm, alterations in the structure of the latex and possible latex degradation are evident; these alterations were not observed in healthy latex.

3.4. DISCUSSION

The laticifers in *C. papaya* consist of thin-walled, greatly elongated, and highly branched ducts of anastomosed cells that are specialized for the production and storage of proteases and a secondary metabolite-rich fluid known as latex (Hagel *et al.,* 2008). Laticifers are widely distributed in the aerial parts of the papaya plant and develop near the vascular bundles. The vascular bundles form the midribs and veins of the leaf (Jimenez *et al.,* 2014). One of the defense mechanisms of C. papaya plants is its latex, which is a hostile environment for pathogens; indeed, PMeV is the only pathogen that is confined to the lactiferous conducts of papaya latex and affects solidification in infected plants (Abreu *et al.,* 2015). Therefore, it is important not only to study the latex alterations but also to investigate the vascular bundles where the laticifers are confined.

The material's mechanical properties can be derived from the force versus displacement curves obtained using the AFM probe (Gaboriaud *et al.,* 2007). Physical structures or pressure differences between the Surface tissues may originate from AFM tip indentations

(Butt *et al.,* 2005). In the present study, the tip indentations causing pressure differences were avoided by using dried samples, as described by Aquije et al. (2010), and the images and force data obtained from each sample in air were reproducible with repeated AFM operations.

The surfaces of the midribs and latex of the PMeV-infected plants showed regions with prominent ridges, deep valleys, and a rough microstructure (Figures 1 and 2). Some components of the plant tissue act as first signals of infection and offer a certain level of protection against pathogens and abiotic stress (

Rosado *et al.,* 2015; Reina-Pinto *et al.,* 2009; Bessire *et al.,* 2007). However, PMeV can bypass the innate host defenses systems by altering the physical characteristics of the leaf midribs and latex of papaya plants.

In 2009, Rodrigues et al. identified papaya laticifers as H2O2 producers. However, the levels of H2O2 production and accumulation were higher in the sticky diseased plants than in the healthy ones. This primary mechanism of strengthening the cell wall is common to plants that have been infected with a pathogen. However, based on our results, this mechanism did not seem to be effective in plants that were infected with PMeV for a long period (more than one year in our case), suggesting that PMeV likely has a specific mechanism of weakening the cell wall after the infection has been established.

We observed that virus activity leads to changes in the microstructures of the leaf midribs and latex of the infected plants, promoting increased surface roughness. This result corroborates the suggestion of Rodrigues et al. 2009 that some classes of papaya cells, such as laticifers, behave differently when infected by the sticky disease virus.

Because the exudation of papaya latex requires tissue tapping under normal conditions, spontaneous latex exudation from sticky diseased papaya plants suggests that the plant laticifers burst (Rodrigues et al. 2009). Plants reduce the pore diameter of their plasmodesmata to limit the mobility of viruses (Rinne *et al*., 2009), but PMeV counteracts this strategy by interfering with the physiology of the laticifers to compromiso the assembly

of the latex particles (Figure 6), thus increasing the water uptake (Rodrigues *et al*., 2009) and making the latex from the sticky diseased papaya more fluid and translucent than its healthy counterpart (Ventura *et al.,* 2004).

PMeV is only found in laticifers, in close association with latex particles.It has been proposed that the swelling and subsequent rupture of laticifers in diseased papaya could be related to the virus's strategy (Rodrigues *et al*., 2009). Because viral infection starts with contact between the virus and the cell membrane (Seisenberger *et al*., 2001), the deep valleys may constitute weak points and areas that are susceptible to breakage, leading to microlesions used by the virus in the infectious process.

We observed that PMeV promotes changes in the leaf midribs, making them more fragile and susceptible to breakage (Figures 4 and 5). We suppose that these morphological changes, which are associated with increased water uptake, increase the internal pressure of the laticifers promoting cell disruption and leading to spontaneous latex exudation and the spread of PMeV to other laticifers.

It is important to mention that the approximately 40-nm holes observed in the structure of the latex particles were only observed in the samples from the infected plants (Figure 6), as confirmed by SEM (Figure 7) and in a previous SEM study in Brazil, where holes were observed in the solid latex particles of PMeV-infected papaya plants. The authors found that the viral particles were confined to the latex and that the PMeV infection altered the lactiferous ducts, thereby preventing the aggregation of latex cells (Rodrigues *et al*., 2009).

The presence of holes in the infected plants may result from latex degradation, which is likely caused by PMeV. The same type of degradation has been observed in rubber, in which the bacterium *Streptomyces* metabolizes the rubber latex biopolymer and triggers the degradation of isoprene, glycolipids, and lipopeptides, which are important compounds for rubber formation (Yikmis *et al*., 2012; Hoang *et al.,* 2011).

Knowledge of the physiological processes that underlie plant-pathogen interactions is crucial to improve crop performance. The results of this work provide new insights into the

interaction between papaya and PMeV, which could contribute to the control of papaya sticky disease and the development of a genetically modified papaya.

3.5. Materials and Methods

3.5.1. Leaf Midrib and Latex Collection

C. papaya leaves of the same size and age were collected from healthy and diseased plants, and transverse leaf midribs sections were excised using a sterile razor blade. The sections were fixed with 0.1-M cacodylate buffer, pH 7.2, for 30 min; washed; dehydrated in a graded series of 30%, 50%, 70%, 90%, and 100% (v/v) ethanol; and critical point dried (CO2).

The latex was taken from green fruits of *C. papaya*, and the samples were collected in sterile 2-mL Eppendorf tubes using sterile toothpicks to pierce the surface of the Green fruits displaying typical sticky disease symptoms that had a positive molecular PMeV diagnosis [24]. The latex from healthy fruits was used as a control.

3.5.2. Image Acquisition

Samples of the transverse leaf midrib sections were coded, and the AFM analyses were performed in a blinded manner. Five coded samples from each plant were attached to a glass slide using a small piece of double-sided adhesive tape, and five random points were examined; 25 images/points were assayed for each plant.

The AFM analysis of the latex samples was performed according to the procedure described by Aquije et al. (2010). Twenty microliters samples of healthy and PMeV-infected papaya latex were placed on microscope slide coverslips and allowed to dry at room temperature for 1 h. The latex samples were lyophilized prior to SEM.

All AFM images were captured via a Shimadzu AFM (SPM-9600 series, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) using Si3N4 cantilever tips (model OMCL-TR, Olympus, Tokyo, Japan), with a nominal spring constant of 0.57 N/m and a resonance frequency of

≈73 kHz. The 512 pixels x 512 pixels AFM images were acquired with a scan rate of 1 Hz and a scan size of 1000 nm. Non-functionalized tips were used to measure the adhesion force. The force-distance measurements were obtained using dry samples and recorded in contact mode at room temperature (25 ºC).

For SEM, the latex samples were mounted on aluminum stubs, sputter coated with 20-nm gold particles, and examined using a Shimadzu SSX 550 SEM (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), operating at 12 kV. Three replicates were prepared from each of the lyophilized latex samples.

3.5.3. Statistical Analysis

The Mann–Whitney test was used to compare the healthy and diseased samples ($p < 0.05$).

3.6. ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Ronaldo Sergio de Biaisi (Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, Brazil) for proofreading and discussing the manuscript. This work was supported by grants from FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo), and CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Author Contributions: Anuar Magaña-Álvarez, Jean Carlos Vencioneck Dutra, Daisy Pérez-Brito, Raúl Tapia-Tussell, Patricia Machado Bueno Fernandes, and Antonio Alberto Ribeiro Fernandes conceived, designed, and performed the experiments and wrote the paper; Inocencio Higuera-Ciapara participated in the data analysis and the writing of the paper; Tarcio Carneiro, Jose Aires Ventura, and Antonio Alberto Ribeiro Fernandes analyzed the data.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

PMeV Papaya Meleira Virus

AFM Atomic force microscopy

SEM Scanning electron microscopy

H_2O_2 Hydrogen peroxide

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

4.1. Discusión general

La presencia del PMeV en Brasil y México ha causado pérdidas económicas importantes en el cultivo de papaya; esto es debido a la rápida dispersión de la enfermedad en las huertas y a que los síntomas que se presentan en el fruto, ocasionan la perdida de su valor comercial (Pérez-Brito *et al*; 2012; Rodrigues *et al*; 2009).

Desde la aparición de la enfermedad en Brasil en 1980, las investigaciones realizadas se basaron, principalmente, en las características del virus y en la epidemiología de la enfermedad. Pero en la actualidad, el enfoque de este problema fitosanitario, se ha dirigido a los componentes moleculares de la interacción de *C.papaya*-PMeV.

Los primeros estudios, en los que se utilizó como modelo la variedad Golden (la más cultivada en Brasil), han revelado que el PMeV activa mecanismos de defensa para combatir la infección viral (Soares *et al*., 2016; Rodrigues *et al*., 2012; Rodrigues *et al*., 2011; Rodrigues *et al.,* 2009).

Sin embargo, en México, aún no se han realizado estudios sobre la interacción de este virus con la papaya de la variedad Maradol, que es la preferidad por los productores y consumidores en este país. De ahí, se desprende la importancia de conocer y profundizar sobre la expresión de los genes involucrados en los mecanismos de defensa y las alteraciones nanoestructurales en hoja y látex que presenta *C. papaya* var. Maradol, ante la infección del PMeV.

De acuerdo a estudios realizados sobre el papel de los genes relacionados con la patogénesis (*PR*), se ha observado que éstos están asociados con los mecanimos de defensa de la planta ante la presencia de patógenos, al evitar el progreso de la infección y activar la resistencia sistémica adquirida (SAR). La activación del SAR se debe a que las *PR* no sólo se acumulan de forma local, sino que se pueden encontrar y expresar en

cualquier parte de la planta (raíces, hojas y tejidos florales) (Sels *et al.,* 2008; Campos *et al.,* 2007; Van Loon *et al.,* 2006; Van Loon y Van Strein, 1999).

Estudios realizados en plantas de: *Oryza sativa* infectadas con el virus del rayado del arroz (RDV), en cebolla infectadas con el virus de la mancha amarilla del Iris y en *Arabidopsis thaliana* inoculadas con el virus de la arruga del nabo; han demostrado que en las plantas infectadas hay un aumento de la expresión de los genes *PR*, que activan los mecanismos de defensa para combatir la infección. (ELMorsi *et al,* 2015; Satoh *et al.,* 2010; Wang *et al.,* 1996)

Sin embargo, hasta donde conocemos, no hay estudios sobre la expresión de genes de resistencia en papaya. Sólo existe un trabajo, en *Cucumis metuliferus* ante la infección del *Papaya Ring Spot Virus (PRSV*), donde el gen *PR6* se expresó a los 21 dpi (Lin *et al.,* 2013)

En el 2014, Abreu y col. llevaron a cabo un estudio de miRNA de *C. papaya* infectada con PMeV, y encontraron que la expresión de los miRNA está asociada con el sistema UPS de la planta, el cual es modificado por la presencia del PMeV. De acuerdo a esto se concluyó que el virus interfiere con el complejo UPS de la planta, para facilitar su propia replicación, lo que altera la expresión de miRNA de la planta, que están relacionados con la expresión de genes de resistencia. Esto hace suponer que la infección del PMeV pudiera estar modificando la expresión de los genes relacionados con los mecanismos de defensa de la planta.

En esta tesis se analizó la expresión de los genes relacionado con patogenesis (*PR*) y genes de peroxidasas (*POD*), en plantas de *C. papaya* de la variedad Maradol infectadas con el PMeV, y se encontró que la presencia del PMeV conduce a la expresión de los genes *PR1*, *PR5* y *PR6* a partir de los 10 hasta los 20 dpi, observándose una leve disminución en la expresión de dichos genes a partir de los 25 dpi. Esto coincide con lo ya reportado en virus que afectan a arroz, curcubitáceas y a *A. thaliana* (Lin *et al.,* 2013; Satoh *et al.,* 2010).

En cuanto a los genes *POD*, lo cambios observados en su expresión no fueron tan evidentes como los registrados para los genes *PR*. Sin embargo el gen *POD* comenzó a expresarse a los 10dpi y se mantuvo hasta los 45 dpi; esto coincide con otros trabajos en papaya donde se observó que la acumulación de ROS se debe a la presencia del PRSV y del PMeV (Gao *et al*., 2012; Rodrigues *et al.,* 2009).

Las alteraciones nanoestructurales observadas en el látex y hojas de papaya se registraron a los 45 dpi, cuando se observó la exudación espontanea de latex en frutos, corroborando de esta forma lo observado en la expresión de los genes de resistencia, que en ese período de desarrollo de la enfermedad, cuando el virus ya está establecido en los conductos laticíferos, muestra una disminución notable, con respecto al inicio de la infección.

Los hallazgos de este estudio, sugieren que la presencia del PMeV en papaya activa genes que están involucrados en los mecanismos de defensa, en un período de tiempo relativamente corto (entre los 10 y 25 dpi) y que consecuentemente al disminuir la expresión de estos genes y la presencia de proteínas relacionadas con los mecanismos de defensa, el virus puede replicarse y establecerse en los tejidos, provocando las alteraciones nanoestructurales en las hojas y el látex y al nivel fenotípico los síntomas caracteristicos de la enfermedad.

Se conoce que después del ataque de un patógeno, la acumulación de ácido salicílico aumenta en el hospedero, e induce la expresión del gen PR1, lo que va a desencadenar en una muerte celular (respuesta hipersensible) a fin de evitar la infección sistémica (Wesp-Guterres *et al*., 2013). En este caso de la interacción Maradol-PMeV, los valores de ER mostrados por el gen *PR1* despues de la inoculación del virus, pueden considerarse bajos y ello puede estar relacionado con la no presencia de una respuesta sistémica de defensa.

En lo que respecta a la dinámica de expresión del gen PR5, su comportamiento puede explicarse, porque el PMeV ocasiona un desequilibrio osmótico y desencadena una mayor incorporación de agua al látex (Rodrigues *et al.,* 2009). Esto fue demostrado cuando se

detectaron las alteraciones nanoestructurales en las células de látex infectado con PMeV, que presentó una mayor dispersión de las partículas, en comparación con el latex sano y una menor fuerza de adhesión, que es ocasionada por el aumento del agua en la célula, lo que provoca la ruptura celular y con esto se produce la exudación espontánea del látex.

Se ha demostrado que el gen *PR6* está relacionado estrechamente con la activación de proteasas, como mecanismo de respuesta ante la presencia de infecciones virales (Alfenas-Zerbini *et al.,* 2009). En el presente trabajo los niveles de ER del *PR6* fueron los más altos en comparación con los otros genes estudiados, esto puede explicarse si se considera que al estar el PMeV confinado en el látex, la planta como respuesta de resistencia trata de producir mayor cantidad de proteasas para inhibir la infección. Sin embargo, como en el caso de los otros genes, el *PR6* disminuyó su expresión cierto tiempo después de la inoculación, lo que posibilitó que el virus pudiera potenciar su maquinaria de infección y ocasionar las alteraciones observadas en el látex y en las nervaduras centrales de las hojas de papaya.

La relevancia de los hallazgos del presente estudio se puede considerar alta, ya que por primera vez se conoce qué ocurre a nivel génico en la papaya ante la infección de un virus inusual, desde varios puntos de vista, como es el PMeV. Los resultados encontrados apuntan a que los mecanismos de defensa de la var. Maradol, aunque presentes en los primeros días posteriores a la inoculación del PMeV, declinan rápidamente y permiten la infección sistémica del patógeno y los consecuentes cambios nanoestructurales en los tejidos y en el látex, que ocasionan posteriormente los síntomas visibles de la enfermedad. Esto refuerza la necesidad de continuar con estudios de este tipo en otras variedades con respuestas de menor susceptibilidad a PMeV, a fin de poder discernir qué genes podrían conferir una mayor resistencia a la planta, ante este patógeno y en consecuencia dirigir el trabajo del mejoramiento en este sentido.

4.2. Conclusiones

- *C. papaya* expresa los genes *PR* y *POD* entre los 10 y 20 días posteriores a la infección del PMeV, activando en ese período, los mecanismos de defensa de la planta.

- El Papaya Meleira Virus ocasiona alteraciones nanoestructurales en hojas y látex de *C. papaya* tales como: mayor rugosidad, dispersión de las partículas de látex y menor fuerza de adhesión, en comparación con plantas sanas.

- Las alteraciones nanoestructurales se observan después de los 25 dpi cuando la expresión de los genes relacionados con patogénesis disminuyen.

- La susceptibilidad mostrada por la var. Maradol ante el PMeV puede ser explicada por la disminución en la expresión de los genes directamente relacionados con los mecanismos de resistencia (PR y POD), en un corto período de tiempo después de la infección del virus.

4.3. Perspectivas

Los avances en el conocimiento, logrados en este trabajo, sobre la expresión de los genes relacionados con la resistencia de la papaya ante el PMeV, permitirán realizar más estudios para encontrar otros genes de resistencia en el genoma de *C. papaya,* a fin de incorporarlos en programas de mejoramiento genético, en busca de nuevos híbridos de papaya con niveles más altos de resistencia al PMeV, lo que redundará a la larga, en un aumento de la producción y mayores beneficios para los productores de esta fruta en los países con presencia de dicha enfermedad.

4.4. Referencias

Abreu P.M.V., J. G. Piccina, S. P. Rodrigues, D. S. Buss, J. A. Ventura, 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.

Abreu, P.M.V.; C. G. Gaspar, D. S. Buss, J. A. Ventura, P.C. G. Ferreira, P. M. B. Fernandes (2014). *Carica papaya* microRNAs are responsive to *Papaya meleira virus* infection. PLoS ONE, 9, e103401. doi:10.1371/journal.pone.0103401.

Abreu, P.M.V.; T.F.S. Antunes, A. Magaña-Álvarez, D. Pérez-Brito, R. Tapia-Tussell, J. A.Ventura, A. A. R. Fernandes, P. M. B.Fernandes (2015). A current overview of the *Papaya meleira virus*, an unusual plant virus. Viruses, 7, 1853–1870.

Alfenas-Zerbini P., I. G. Maia, R. D. Fávaro, J. C. M. Cascardo, S. H. Brommonschenkel, F. M. Zerbini. (2009). Genome-Wide Analysis of Differentially Expressed Genes During the Early Stages of Tomato Infection by a Potyvirus. MPMI, 22(3), 352–361. doi:10.1094/ MPMI -22-3-0352.

Andersen C. L., J. L. Jensen, T. F. Orntoft (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.Cancer Res, 64, 5245–5250. 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.

Antoniw, J.F., C. E.Ritter, Pierpoint, W.S, Van Loon, L.C. (1980). Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. J. Gen. Virol, 47, 79-87

Aquije, G.M.F.V., P. B. Zorzal, D. S. Buss, J. A. Ventura, P: M. B. Fernandes, A. A. R. Fernandes (2010). Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. Plant Cell Reports, 29,1109–1117.

Araújo, M.M.M., E. T. Tavares, F. R. da Silva, V. L. A. Marinho, M. T. Souza Jr. (2007). Molecular detection of *Papaya meleira virus* in the latex of C*arica papaya* by RT-PCR. Journal of Virological Methods, 146, 305-310.

Asaí, S., H. Yoshioka (2009). Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botritis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. Molecular Plant-Microbe Interaction, 22, 619-629.

Bessire, M., C. Chassot, A. C. Jacquat, M. Humphry, S. Borel, J. M. C. Petétot, J.P. Métraux, C. Nawrath (2007). A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to Botrytis cinerea. EMBO J, 26, 2158–2168.

Boll, J. F., A.S. Buchel, M. Knoester, T. Baladin, L.C. Van Loon, H.J.M. Linthorst (1996). Regulation of the expression of plant defence genes. Plant Growth Regulation, 18, 87-91.

Bonasera J. M., J. Kim, S. V. Beer. (2006). PR genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. BMC Plant Biology, 6, 23. doi:10.1186/1471-2229-6-23.

Bouteau, F., O. Dellis, U. Bousquet, J. P. Rona (1999)**.** Evidence of multiple sugar uptake across the plasma membrane of laticifer protoplasts from *Hevea*. Bioelectrochem Bioenerg, 48, 135-139.

Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25, 169–193.

Bustin, S. A., T. Nolan. (2004). Pitfalls of quantitative realtime reverse-transcription polymerase chain reaction. Journal of Biomolecular Techniques, 15 (3), 155-166.

Butt, H.-J., B. Cappella, M. Kappl (2005). Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. Surf. Sci. Rep, 59, 1–152.

Campos M. A., D. D. Rosa, J. É. C. Teixeira, M. L. P. N. Targon, A. A. Souza, L. V. Paiva, D. R. Stach-Machad, M. A. Machado. (2007). PR gene families of citrus: Their organ specific-biotic and abiotic inducible expression profiles based on ESTs approach. Genetics and Molecular Biology, 30, (3), 917-930.

Carrington, J. C., D.D. Freed, C. S. Oh. (1990). Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. Eur. Mol. Biol. Organ, 9, 1347-1353.

Carver, T. L. W., R. J. Zegen, W. R. Brashnell, M. P. Robbins (1994). Inhibition of phenyalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol deshydrogenase increases cuantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiohe graminis*). Physiology and molecular plant pathology, 44, 261-272.

Chen S., L. Cao, Q. Huang, Y. Qian, X. Zhou. (2015).The complete genome sequence of a novel maize-associated Totivirus. Archives of virology, 161 (2), 487-90.

Conrath, U., G.J.M. Beckers, V. Flors, P. Garcia-Agustin, G. Jakab, F. Mauch (2006). Priming getting ready for battle. Mol. Plant-Microbe Interact, 19, 1062–1071.

Correa, F.J.F., B. J. D. C. Franco, H. S. Watanabe, M. Y. Sakayy, E. M. A. Yamashita (1988). Estudo preliminar sobre a exsudação do latex do mamoeiro-Texeira de Freitas. 2º Simposio Brasileiro da Cultura do Mamoeiro. Jacoticabal: UNESP, 409-428.

Cuartero, J., H. Laterrot, J.C. Van Leteren (1999). Host-plant resistance to pathogens and arthropod pests. In: Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops, Albajes, R., M.L. Guillino, J.C. Van Lenteren, Y. Elad (ed). Kluwer Academic Publishers. pp 124-138

Cutt J. R., M. H.Harpster, D.C. Dixon, J. P. Carr, P. Dunsmuir, D.F. Klessig (1989). Disease response to tobacco mosaic virus intransgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related PR1b gene. Virology, 173 (1), 89-97.

Dickson, M (2005). Molecular plant pathology. BIOS Scientific Publishers. London. pp 273.

Doubnerova V., M. Janoškova, H Synkova, Z Subr , N. Cerovska, H. Ryšlavá (2007). effect of potato virus y on the activities of antioxidant and anaplerotic enzymes in Nicotiana Tabacum l. transgenic plants transformed with the gene for p3 protein. General and Applied Plant Physiology, 33 (34), 123-140.

Durrant, W.E., X. Dong (2004). Systemic Acquired Resistance. Annu. Rev. Phytopathol, 42, 185–209.

Dutt S., J. Parkash, R. Mehra, N. Sharma, B. Singh, P. Raigond, A. Joshi, S. Chopra, B.P.Singh (2015). Translation initiation in plants: roles and implications beyond protein synthesis. Biologia Plantarum, 59 (3), 401-412.

Ebrahim, S., K. Usha, B. Singh (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. Formatec, pp. 1043–1054.

Edwards K, J. Logan, N. Saunders (2004). Real-Time PCR: An Essential Guide. Horizon Bioscience, UK. pp 346

Eisen, M. B., P.T. Spellman, P. O. Brown, D. Botstein (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 14863-14868.

El Moussaoui, A., M. Nijs, C. Paul, R. Wintjens, J. Vincentelli, M. Azarkan, 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. Cell. Mol. Life Sci, 58, 556–570.

ElMorsi A., A. Abdelkhalek, O. AlShehaby, E. E. Hafez (2015). Pathogenesis-related genes as tools for discovering the response of onion defense system against Iris yellow spot virus infection. Botany, 93, 1-10. dx.doi.org/10.1139/cjb-2015-0017.

Espinas N.A, H. Saze, Y. Saijo (2016) Epigenetic Control of Defense Signaling and Priming in Plants. Front. Plant Sci, 7,1201. doi: 10.3389/fpls.2016.01201.

FAOSTAT (2015). Consulta de bases indicadoras de producción mundial y comercio internacional de papaya. FAO [en línea]. Disponible en http//: faostat.fao.org. Consultado 24 enero 2017.

Fu, Z. Q., X. Dong (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. Annu. Rev. Plant Biol, 64, 839–863. doi: 10.1146/annurevarplant-042811-105606.

Gaboriaud, F., Y. F. Dufrêne (2007). Atomic force microscopy of microbial cells: Application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. Colloid Surf. B Biointerfaces, 54, 10–19.

Gallert, C (2000). Degradation of latex and of natural rubber by *Streptomyces* strain La7. Systematic Applied Microbiology, 23 , 433-441.

Gandía M., A. Conesa, G. Ancillo, J. Gadea, J. Forment, V. Pallás, R. Flores,N. Duran-Vila, P. Moreno, J. Guerri. (2007). Transcriptional response of *Citrus aurantifolia* to infection by *Citrus tristeza virus.* Virology, 367 (2), 298–306.

Gao L, W. Shen, P. Yan, D. Tuo, X. Li, P. Zhou. (2012). Nla-pro of Papaya ringspot virus interacts with papaya methionine sulfoxide reductase B1. Virology, 434, 78–87.

Gebrie, S.A (2016). Biotrophic Fungi Infection and Plant Defense Mechanism. J Plant Pathol Microbiol, 7, 378. doi: 10.4172/2157-7471.1000378.

Gehl B., L.J. Sweetlove (2014) Mitochondrial Band-7 family proteins: scaffolds for respiratory chain assembly? Front. Plant Sci, 5,141. doi: 10.3389/fpls.2014.00141.

Godínez-Vidal D, M. Rocha-Sosa, E. B. Sepulveda-García, J. Lara-Reyna, R. Rojas-Martínez, E. Zavaleta-Mejía (2008). Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by and *Phytophthora capsici Nacobbus aberrans*. European Journal of Plant Pathology, 120, 299-303.

Gururani, M.A., J. Venkatesh, C.P. Upadhyaya, A. Nookaraju, S. K. Pandey, S. W. Park (2012). Plant disease resistance genes: Current Status and future directions. Physiological and Molecular Plant Pathology 78, 51-65.

Hagel, J.M.; E. C. Yeung, P. J. Facchini (2008) Got milk? The secret life of laticifers. Trends Plant Sci, 13, 631–639.

Han Y., K. Zhang, J. Yang, N. Zhang, A. Fang, Y. Zhang, Y. Liu, Z. Chen, T. Hsiang, W. Sun. (2015). Differential expression profiling of the early response to *Ustilaginoidea virens* between false smut resistant and susceptible rice varieties. BMC Genomics, 16, 955. DOI:10.1186/s12864-015-2193-x.

Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, P. M. Williams (1996). Real time quantitative PCR. Genome Research, 6, 986–994.

Hernandez, A., P. Martin Vasallo, A. Torres Ramírez, E. Salido (1994). RNA analysis: The study of genic expression. Nefrología, 14, 145–162.

Hoang, K., T. Lai, C. Lin, Y; Chen, C. Liau (2011). The chitinolytic activities of Streptomyces sp. TH-11. Int. J. Mol. Sci, 12, 56–65.

Hu R., C. Fan, H. Li, Q. Zhang,Y. F. Fu (2009). Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. BMC Molecular Biology,10: 93. **DOI:** 10.1186/1471-2199-10-93.

Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin, A. Zumla (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes and Immunity, 6, 279–284.

Jiménez, V.M.; E. Mora-Newcomer, M.V. Gutiérrez-Soto (2014). Biology of the Papaya Plant. In Genetics and Genomics of Papaya, Plant Genetics and Genomics; Ming, R., Moore, P.H., Eds.; Springer: New York, NY, USA, pp. 17–33.

Kitajima, E.W., C. Rodrigues, J. Silveira, F. Alves, J. A. Ventura, F.J.L. Aragao, L.H.R. Oliveira. (1993). Association of isometric virus-like particles restricted to lactifers, with meleira (sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). Fitopatologia Brasileira, 8, 118-122.

Kondo H., S. Hisano, S. Chiba, K. Maruyama, I. B. Andika, K. Toyoda, F. Fujimori, N. Suzuki. (2016). Sequence and phylogenetic analyses of novel totivirus-like double-stranded RNAs from field-collected powdery mildew fungi. Virus Research, 219, 39-50.

Konno, K., C. Hirayama, M. Nakamura, K. Tateishi, Y. Tamura, M. Hattori, K. Kohno (2004). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. Plant J., *37*, 370-378.

Kumar M., A.J. Bijo, R. S. Baghel, C. R. K. Reddy, B. Jha (2012). Selenium and spermine alleviate cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidants and DNA methylation. Plant Physiol Biochem, 51:129–138.

Kumar S. P. J., S. R.Prasad, R. Banerjee, C. Thammineni. (2015). Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. Ann. Bot, 116, 663–668. 10.1093/aob/mcv098.

Kushalappa, A. C., K. N. Yogendra, S. Karre (2016). Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. Critical Reviews in Plant Sciences, 35 (1), 38-55. DOI: 10.1080/07352689.2016.1148980

Laloi, Ch., K. Apel, A. Danon (2004). Reactive oxygen signaling: the latest news. Current Opinion in Plant Biology, 7, 323-328.

Larson, R. L.; Wintermantel, W. M.; Hill, A.; Fortis, L.; Nunez, A. (2008). Proteome changes in sugar beet in response to Beet necrotic yellow vein virus. Physiol. Mol. Plant Pathol, 72, 62–72.

Lee, B. J.; S. J. Kwon, S. Kim, K.J. Kim, C. J. Park, Y. J. Kim, O. K. Park, K. H. Paek (2006). Functional study of hot pepper 26S proteasome subunit RPN7 induced by Tobacco mosaic virus from nuclear proteome analysis. Biochem Biophys Res Commun, 351 (2), 405-411.

Lesniewska, E.; M. Adrian, A. Klinguer, A. Pugin (2004). Cell wall modification in grapevine cells in response to UV stress investigated by atomic force microscopy. Ultramicroscopy, 100, 171–178.

Lima, J. A. A.; Nascimento, A. K. Q.; Lima, R. C. A. and Purcifull, D. E. (2013). Papaya lethal yellowing virus. The Plant Health Instructor. 10.1094/PHI-I-2013-0123-01.

Lima, R.C.A., J. A. A. Lima, M. T. Souza Jr., G. Pio-Ribeiro, G. P. Andrade (2001). Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. Fitopatologia Brasileira, 26,689-702.

Lin Y. T., F. J. Jan, C. W. Lin, C. H. Chung, J.C Chen, H.D Yeh, H. Ku. (2013). Differential Gene Expression in Response to Papaya ringspot virus Infection in Cucumis metuliferus using cDNA- Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. PLoS ONE, 8(7), e68749. doi:10.1371/journal.pone.0068749

Livak K. J., T. D. Schmittgen (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. METHODS, 25, 402–408.

Maciel-Zambolin, E.M., S. K. Alonso, K. Matsuoka, M.G. Cravalho, F. M. Zerbini. (2003). Purification and some properties of papaya meleira virus, a novel virus infecting papaya in Brazil. Plant Pathology, 52, 389-394.

Madriz K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas, 3, 22-32.

Mafra V, P., K. Martins, C. S. Francisco, M. Ribeiro-Alves, J. Freitas-Astúa, M. A. Machado. (2013). *Candidatus*Liberibacter americanus induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype *BMC* Genomics, 14, 247. DOI: 10.1186/1471-2164-14-247.

Magaña-Álvarez A., J. C. Vencioneck Dutra, T. Carneiro, D. Pérez-Brito, R. Tapia-Tussell, J. A. Ventura, I. Higuera-Ciapara, P. M. B. Fernandes, A. A. R. Fernandes (2015). Physical Characteristics of the Leaves and Latex of Papaya Plants Infected with the Papaya meleira Virus. Int. J. Mol. Sci, 17, 574 doi: 10.3390/ijms17040574.

Mahlein, A.K. (2016) Plant disease detection by imaging sensors—Parallels and specific demands for precisión agriculture and plant phenotyping. Plant Dis, 100, 241–251.

Makandar R, J., S. Essig, M. A. Schapaugh, H. N. Trick, J. Shah. (2006). Genetically engineered resistance to *Fusarium* head blight in wheat by expression of *Arabidopsis NPR1*. Mol. Plant-Microbe Interact; 19, 123–129.

Malo, S.E., C. W. Campbell, C.F. Balerdi, J.H. Crane (1994). La papaya en Florida. Departamento de Horticultural Sciencies, Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, (UF/IUFAS) http: //edis.ifas.ufl.edu. Acceso: 20-octubre-2016.

Mandujano, B. R. 2007. Como cultivar papaya orgánica en México (en línea). *http://vinvulado.org./mercado/full/cultivo_organico_papaya_en_mexico.html.* Consultado 29 marzo 2016.

McDowell J. M., S. Huang, E. C. McKinney, Y.Q. An, R. B. Meaghed (1996). Structure and Evolution of the Actin Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. Genetics, 142(2), 587–602.

Mengiste, T (2012). Plant Immunity to Necrotrophs. Annu. Rev. Phytopathol, 50, 267–94.

Metcalf, C.R (1967). Distribution of latex in the plant kingdom. Econ. Bot, 21, 115-127.

Milani, P., M. Gholamirad, J. Traas, A. Arnéodo, A. Boudaoud, F. Argoul, O. Hamant. (2011) In vivo analysis of local wall stiffness at the shoot apical meristem in *Arabidopsis* using atomic force microscopy. Plant J, 67, 1116–1123.

Ming, R., S. Hou, Y. Feng, Q. Yu, A. Dionne-Laporte, J. H. Saw, P. Senin, W. Wang, B. V. Ly, K. L. T. Lewis, S. L. Salzberg, L. Feng, M. R. Jones, R. L. Skelton, J. E. Murray, C. Chen, W. Qian, J. Shen, P. Du, M. Eustice, E. Tong, H. Tang, E. Lyons, R. E. Paull, T. P. Michael, K. Wall, D. W. Rice, H. Albert, M. Wang, Y. J. Zhu, M. Schatz, N. Nagarajan, R. A. Acob, P. Guan, A. Blas, C. Man Wai, C. M. Ackerman, Y. Ren, C. Liu, J. Wang, J. Wang, J. Na, E. V. Shakirov, B. Haas, J. Thimmapuram, D. Nelson, X. Wang, J. E. Bowers, A. R. Gschwend, A. L. Delcher, R. Singh, J. Y. Suzuki, S. Tripathi, K. Neupane, H. Wei, B. Irikura, M. Paidi, N. Jiang, W. Zhang, G. Presting, A. Windsor, R.l Navajas-Pérez, M. J. Torres, F. A. Feltus, B. Porter, Y. Li, A. M. Burroughs, M. Luo, L. Liu, D. A. Christopher, S. M. Mount, P. H. Moore, T. Sugimura, J. Jiang, M. A. Schuler, V. Friedman, T. MitchellOlds, D. E. Shippen, C. W. dePamphilis, J. D. Palmer, M. Freeling, A. H. Paterson, D. Gonsalves, L. Wang, M. Alam (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). Nature, 452, 991–996.

Mouch-Mani, B., A. J. Slurenko (1996). Production of salicylic acid perecursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. Plant Cell, 8, 203-212.

Nakagawa, J., Y. Takayawa, Y. Suzakawa (1987). Exsudação do latex pelo mamoeiro: estudo da ocorrencia en Texeira de Freitasss, BA. Anais, 9ºCongresso Brasileiro de fruticultura, Campinas-SP, 555-559.

Nishijima, M.S., Nishijima, W.T., Zee, F., Chia, C.L., Mau, R. F. L. and Evans, D. O. (1989). *Papaya ringspot virus* (*PRSV*): a serious disease of papaya. Honolulu: HCES/University of Hawaii at Manoa. 4p. (Commodity fact sheet PA-4, A).

Nishijima, W. T., H. D. Ohr, R. C. Ploetz, K.G. Rohrbach, G. A. Zentmyer (1998). Compendium of Tropical Fruit Diseases. APS Press, Minnesota. USA, pp 88.

Oliveira, M.D.M., C.M.R. Varanda, M.R.F. Félix (2016). Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. Phytochemistry Letters, 15, 152–158.

Orozco-Cárdenas, M. L., J. Narvaez-Vasquez, C. A. Ryan. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. Plant Cel, 13, 179-191.

Pantoja, A., P. A. Follett, J. A. Villanueva-Jiménez (2002). Pests of papaya. In: Tropical Fruit Pests and Pollinators: Biology, Economic Importance, Natural Enemies and Control. Pena J., Sharp J., Wysoki M (ed). CABI Publishing, Cambridge. pp 131-156.

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. Afr. J. Biotechnol, 11(71), 13564-13570.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. Nucleic Acids Research, 29 (9), e45.

Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. En S. A. Bustin (ed.), A-Z of quantitative PCR. La Jolla, CA, USA: International University Line (IUL). pp. 87–112.

Pieterse, C. M. J., C. Zamioudis, R. L. Berendsen, D. M.Weller, S. C.M. VanWees, P. A.H.M. Bakker (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. Annu. Rev. Phytopathol, 52, 347–75

Pritsch C., C. P. Vance, W. R. Bushnell, D. A. Somers, T. M. Hohn, G. J. (2001). Systemic expression of defense response genes in wheat spikes as a response to *Fusarium graminearum* infection. Physiological and Molecular Plant Pathology, 58, 1-12.

Quito-Avila D, R. Alvarez, M. Ibarra, R. Martin. (2015). Detection and partial genome sequence of a new umbralike virus of papaya discovered in Ecuador. European Journal of Plant Pathology, 1–6.

Radoti´c, K., C. Roduit, J. Simonovi´c, P. Hornitschek, C. Fankhauser, D. Mutavdži´c, G. Steinbach, G. Dietler, S. Kasas (2012). Atomic force microscopy stiffness tomography on living Arabidopsis thaliana cells reveals the mechanical properties of surface and deep cell-wall layers during growth. Biophys. J, 103, 386–394.

Ray S., J. M. Anderson, F. I. Urmeev, S. B.Goodwin S B. (2003). Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Plant Molecular Biology, 53, 701-714.

Reina-Pinto, J.J., A. Yephremov (2009) . Surface lipids and plant defenses. Plant Physiol. Biochem, 47, 540–549.

Remans T., K. Smeets K, K. Opdenakker K, D. Mathijsen, J. Vangronsveld, A. Cuypers (2008). Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations, Planta 227, 1343-1349.

Rinne, P.L.H., R. V. D. Boogaard, M.G.J. Mensink, C. Kopperud, R. Kormelink, R. Goldbach, C. V. D. Schoot (2005) Tobacco plants respond to the constitutive expression of the tospovirus movement protein NSM with a heat-reversible sealing of plasmodesmata that impairs development. Plant J, 43, 688–707.

Ririe, K. M., R. P. Rasmussen, C. T. Wittwer (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Analytical Biochemistry, 245, 154–160.

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

Rodrigues, S. P, G. G. Lindsey, P. M. B. Fernandes. (2009a). Biotechnological Approaches for Plant Viruses Resistance: From General to the Modern RNA Silencing Pathway. Braz. Arch. Biol. Technol, 52 (4), 795-808.

Rodrigues, S. P., J.S. Andrade, J.A. Ventura, G.G. Lindsey, 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, 91, 1, 87-91

Rodrigues, S. P., M. Da Cunha, J. A. Ventura, P. M. Fernandes (2009). Effects of the *Papaya meleira* virus on papaya latex structure and composition. Plant Cell Rep. 28, 861–871.

Rodrigues, S.P., J. A. Ventura, C. Aguilar, E. S. Nakayasu, H. Choi, T. J. Sobreira, L. L. Nohara, L. S. Wermelinger, I. C. Almeida, R. B. Zingali, P.M. Fernandes (2012).

Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in the latex of sticky diseased Carica papaya L. plants. J. Proteomics, 75, 3191-3198.

Rodrigues, S.P., J. A. Ventura, C. Aguilar, E. S. Nakayasu, H. Choi, T. J. Sobreira, L. L. Nohara, L. S. Wermelinger, I. C. Almeida, R. B. Zingali, P.M. Fernandes (2012). Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in the latex of sticky diseased *Carica papaya* L. plants. J. Proteomics, 75, 3191-3198.

Rodrigues, S.P., J. A. Ventura, C. Aguilar, E. S. Nakayasu, I. C. Almeida, P.M.B. Fernandes, R.B. Zingali (2011). Proteomic analysis of papaya (Carica papaya L.) displaying typical sticky disease symptoms. Proteomics, 11, 2592-2602.

Rosado, H., D. R. Turner, J. S. Foster, W.P. Taylor (2015). Impact of the β-lactam resistance modifier (-)-epicatechin gallate on the non-random distribution of phospholipids across the cytoplasmic membrane of Staphylococcus aureus. Int. J. Mol. Sci, 16, 1670–1672.

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

Sanzón Gómez, D., E. Zavaleta Mejía (2011). Respuesta de Hipersensibilidad, una Muerte Celular Programada para Defenderse del Ataque por Fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología, 29 (2), 154-164. Fecha de consulta: 25 de octubre de 2016. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222864007.

Satoh K., I. R. Choi, H. Kondoh, T. Omura, T. Sasaya, S. Kikuchi. (2010). Selective modification of rice (Oryza sativa) gene expression by rice stripe virus infection. Journal of General Virology, 91, 294–305 DOI 10.1099/vir.0.015990-0.

Schacht T., C. Unger, A. Pich, K. Wydra (2011). Endo-and exopolygalacturonases of are inhibited by polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) *Ralstonia solanacearum* activity in tomato stem extracts. Plant Physiology and Biochemistry, 49, 377-387.

Schmittgen T. D., Zakrajsek B. A (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 46, 69–81.

Seisenberger, G., M. U.Ried, T. Endress, H. Büning, M. Hallek, C. Bräuchle, C. (2001) Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. Science, 294, 1929–1932.

Sels J., J. Mathys, B. M. A. De Coninck, B. P. A. Cammue, M. F. C. De Bolle (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry, 46, 941-950.

Shah, J., J. Zeier (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. Front. Plant Sci, 4, 30.

Shah, J., R. Chaturvedi, Z. Chowdhury, B. Venables, R. A. Petros (2014). Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. The Plant Journal, 79, 645–658.

Shi-wen, W., W Hong-wei, Y. Zai-dong, K. Ling-rang. (2014). Expression Comparisons of Pathogenesis-Related (*PR*) Genes in Wheat in Response to Infection/Infestation by *Fusarium*, *Yellow dwarf virus* (YDV) Aphid-Transmitted and Hessian Fly. Journal of Integrative Agriculture, 13 (5), 926-936.

Silva E., J. Valdés, D. Holmes, A. Shmaryahu, P.D. Valenzuela. (2006). Generation and analysis of expressed sequence tags from *Botrytis cinérea*. Biol Res, 39(2), 367-76.

Sistema de información Agrícola y Pesquera (SIAP). 2016. http//www.siap.gob.mx/sispro/portales/agrícolas/papaya/descripción.pdf. Consultado 24-octubre-2016.

Slajcherová K, J. Fišerová, L.Fischer, K. Schwarzerová (2012). Multiple Actin Isotypes in Plants: Diverse Genes for Diverse Roles? Front Plant Sci; Front. Plant Sci, 3:226. doi: 10.3389/fpls.2012.00226.

Soares E. A, E. G. Werth, L.J. Madroñero, J. A. Ventura, S. P. Rodrigues, L. M. Hicks P. M. B. Fernandes (2016). Label-free quantitative proteomic analysis of pre-flowering PMeV-infected Carica papaya L. J Proteomics, 151, 275-283. doi: 10.1016/j.jprot.2016.06.025.

Suslov, O. y D. A. Steindler. (2005). PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. Nucleic Acid Research, 33 (20), e181.

Tagitaba, P.F., J. R. Liberato, L. Zambolim, J. A. Ventura, H. Costa (2002). Controle e condições climáticas favóraveis a amtracnose do mamoeiro. Fitopatologia Brasileira, 27, 2, 186-192.

Taliansky M.E., D.J. Robinson. (2003). Molecular biology of umbraviruses: phantom warriors. Journal of General Virology, 84,1951–60.

Tapia-Tussell, R., A. Magaña-Alvarez, A. Cortes-Velazquez, G. Itza-Kuk, A. Nexticapan-Garcez, A. Quijano-Ramayo, R. Martin-Mex, D. Perez-Brito. (2014). Seed transmission of Papaya meleira virus in papaya (*Carica papaya*) cv. Maradol. Plant Pathology, 64, 272–275.

Tennant, P., G. a. Fermin, M. E. Roye, (2007). Viruses Infecting Papaya (*Carica papaya* L.): Etiology, Pathogenesis, and Molecular Biology. Plant Viruses, 1 (2), 178-188.

Texeira da Silva, J.A., R. Zinia, T. N. Duong, D. Sivakumar, A. Gera, M. T. Souza Jr, P. F. Tennant (2007). Papaya (*Carica papaya* L.) Biology and Biotechnology. Tree and Forestry Sciencie and Biotechnology, 1, 47-73.

Thakur, M., B. S. Sohal (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. ISRN Biochem. 1–11.

Thompson C.E., C. L. Fernandes, O. N. De Souza, F. M. Salzano, S. L. Bonatto, L. B.Freitas. (2007). Molecular Modeling of Pathogenesis-related Proteins of Family 5. Cell Biol. Biophys, 44 (3), 385-394.

Vallad, G. E., R. M. Goodman (2004). Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. Crop Sc, 44, 1920-1934

Van Aken, O., J. Whelan, F. Van Breusegem (2010). Prohibitins: mitocondrial partners in development and stress response. Trends Plant Sci, 15, 275–282. doi: 10.1016/j.tplants.2010.02.002.

Van Loon L. C., E. A. Van Strien (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol, 55, 85–97.

Van Loon L. C., Van Strein E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol, 55, 85–97.

Van Loon L.C, M. Rep, C. M. Pieterse (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. Annu. Rev. Phytopathol, 44,135–62.

Vandesompele J, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by

geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol, 3(7): research0034.1–0034.11.

Vandesompele J., M. Kubista, M. W. Pfaffl (2009). Reference gene validation software for improved normalization. Real-time PCR: Current Technology and Applications, 47–64.

Ventura, J.A., H. Costa, J. Tatagiba (2004). Papaya diseases and integrated control. in: Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management, Naqvi, S.A.H. (ed). Kluwer, London. Pp 244-246.

Vidal, C.A., A. S. Nascimento, T. C. Habibe (2005). Transmissão do virus da meleira do mamoeiro (papaya sticky disease virus) por insectos. Magistra, Cruz das Almas-BA, 17, 2, 101-106.

Vivanco J. M., E. Cosio, V. M. Loyola-Vargas, H. E. Flores (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y Ciencia, 68-75.

Walter S., P. Nicholson, F. M. Doohan. (2010). Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. New Phytologist, 185, 54-66.

Wang X., P. Zafian, M. Choudhary, M. Lawton. (1996). The PR5K receptor protein kinase from Arabidopsis thaliana is structurally related to a family of plant defense proteins. Proc. Natl. Acad. Sci, 93(6), 2598-602.

Wang, A. M., M. V. Doyle, D. F. Mark (1989). Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86, 9717–9721.

Wen, L. (2013). Cell Death in Plant Immune Response to Necrotrophs. J Plant Biochem Physiol, 1: e103. doi:10.4172/jpbp.1000e103.

Wesp-Guterres C., J.A. Martinelli, F.A.S. Graichen, M.S. Chaves (2013). Histopathology of durable adult plant resistance to leaf rust in the Brazilian wheat variety Toropi. Eur J Plant Pathol, 137, 181–196.

Whenham, R. J., R. S. S. Fraser, L. P. Brown, J. A. Payne (1986). Tobaco mosaic virus-induced increase in abscisic acid concentration in tobacco leaves: intracellular location in light and dark-green areas and relationship to symptom development. Planta, 168, 592-598.

Yikmis, M., A. Steinbuchel (2012). Historical and recent achievements in the field of microbial degradation of natural and synthetic rubber. Applied Environmental Microbiology, 78, 4543–4551.

Zamudio-Moreno E., J. Ramirez-Prado, O. Moreno-Valenzuela, L. Lopez-Ochoa (2015). Early diagnosis of a Mexican variant of Papaya meleira virus (PMeV-Mx) by RT-PCR. Genetics and Molecular Research, 14(1), 1145–54. doi: 10.4238/2015.February.6.18.

Zhu F., M. Xu, S. Wang, S. Jia, P. Zhang, H. Lin, D. Xi (2012a). Prokaryotic expression of pathogenesis related protein 1 gene from *Nicotiana benthamiana*: antifungal activity and preparation of its polyclonal antibody. Biotechnology Letters, 34, 919-924.

Zhu Q. H., S. Stephen, K. Kazan, G. Jin,L. Fan, J. Taylor,E.S. Dennis, C. A. Helliwell, M. B. Wang. (2012b). Characterization of the defense transcriptome responsive to *Fusarium oxysporum*-infection in *Arabidopsis* using RNA-seq. Gene, 512(2), 259-66. doi: 10.1016/j.gene.2012.10.036.

Zhu X., X. Li, W. Chen, J. Chen, W. Lu, L. Chen, D. Fu. (2012) Evaluation of New Reference Genes in Papaya for Accurate Transcript Normalization under Different Experimental Conditions. PLoS ONE 7(8): e44405. doi:10.1371/journal.pone.0044405

4.5. ANEXOS

4.5.1. Anexo 1.

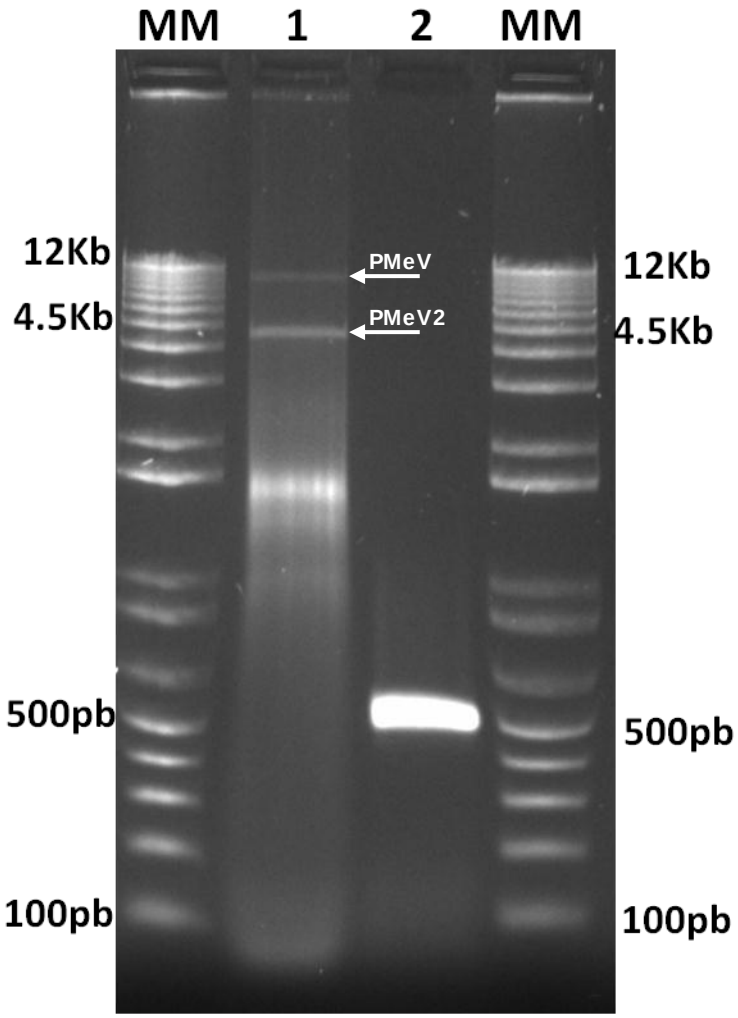


Figura 4-1 Diagnóstico molecular del látex inoculado en las plantas. MM: Marcado molecular de 1kb. Línea 1: RNA viral del látex inoculado en las plantas mostrando las dos bandas correspondientes al PMeV (8 Kb) y PMeV2 (4.5 Kb); Línea 2: Amplificación del RNA del látex inoculado obtenida con los iniciadores CB38/CB39. Tamaño del amplicon de aprox. 500 pb correspondiente al PMeV.

4.5.2. Anexo 2.

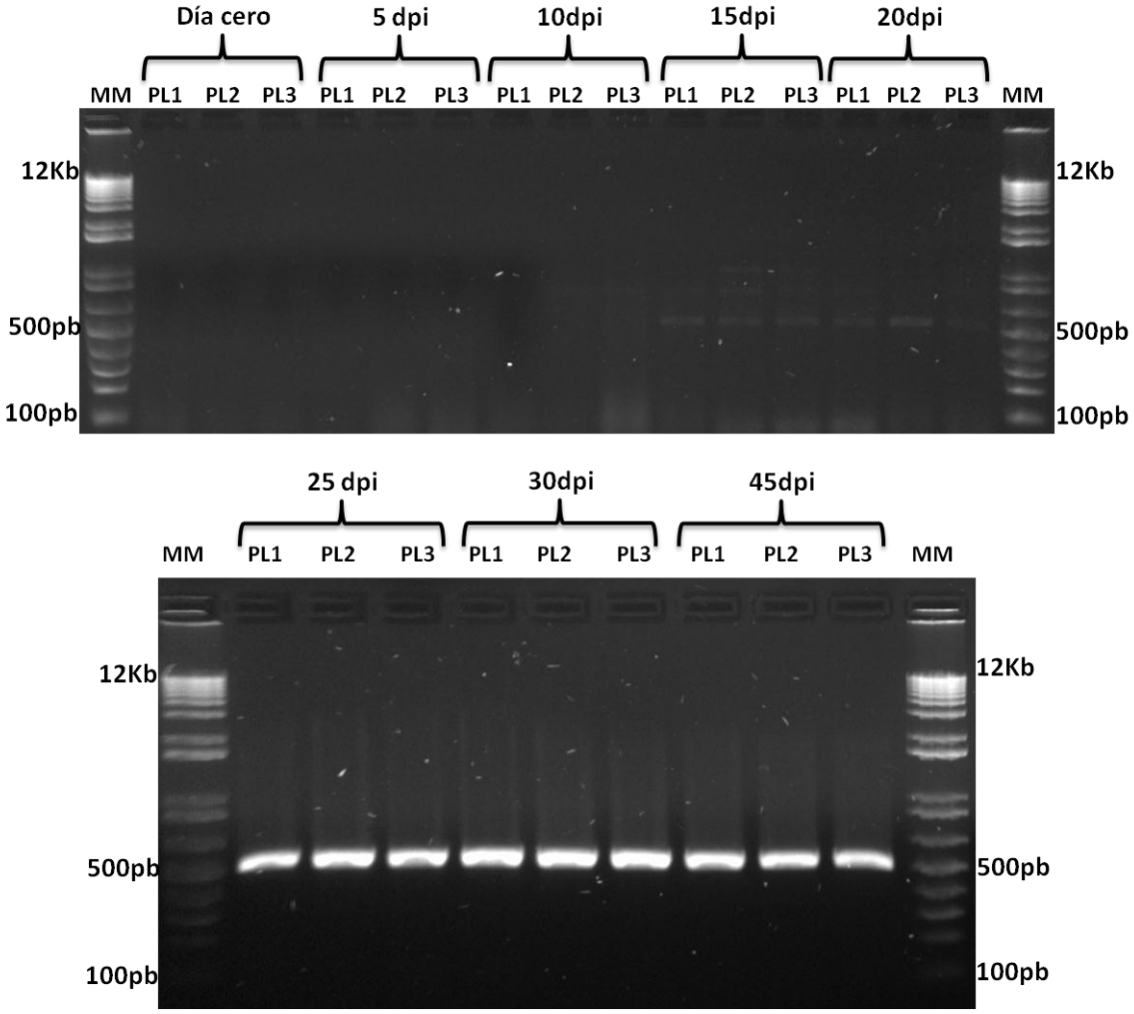


Figura 4-2 Diagnóstico molecular con los iniciadores CB38/CB39 de las plantas utilizadas en este estudio, en los diferentes días posteriores a la inoculación (dpi). Tamaño del amplicón de aprox. 500 pb correspondiente al PMeV.

4.5.3. Anexo 3

Cuadro 4-1 Detección y cuantificación absoluta del PMeV por PCRq en los días posteriores a la inoculación (dpi).

Días posteriores a la inoculación (dpi)	C_T ± Std. dev.	Carga Viral (ng/µL)
5	28.94 ± 0.06	0.132 510 ± 0.5
10	14.26 ± 0.26	706.97 ± 0.2
15	15.67 ± 0.03	310.21 ± 2.1
20	19.79 ± 0.05	1321.35± 0.01
25	13.37± 0.1	1184.58± 3.1
30	13.59± 0.3	1044.67± 0.6
45	12.697± 0.05	1495.99± 4.0