



VARIABILIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE PRSV-p DE
PAPAYO EN LA ZONA CENTRO DEL ESTADO DE VERACRUZ,
MÉXICO †

[GENETIC VARIABILITY OF PRSV-p ISOLATES FROM PAPAYO
IN THE CENTRAL ZONE OF THE STATE OF VERACRUZ,
MEXICO]

David Sósol-Reyes¹, Juan Antonio Villanueva-Jiménez¹,
Francisco Osorio-Acosta¹, Norma Flores-Estévez²
and Juan Carlos Noa-Carrazana^{2*}

¹Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, Programa de Posgrado en Agroecosistemas Tropicales, Km 88.5 Carretera Federal Xalapa-Veracruz, Manlio F. Altamirano, Veracruz, C.P. 91690, México.

²Universidad Veracruzana, Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Av. de las Culturas Veracruzanos No. 101. Col. Emiliano Zapata, Xalapa, Veracruz, C.P. 91090, México. Email. jnoa@uv.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background: The *Potyvirus Papaya ringspot virus* type P (PRSV-p) causes the papaya (*Carica papaya* L.) ringspot disease, which causes damage to the plantations of this crop. In regions where there is movement of plant material and continuous production processes, there is greater genetic variability of this virus; such is the case of the State of Veracruz, Mexico, one of the main papaya producers in the country. **Objective:** To analyze the genetic variability of isolates of PRSV-p, present in commercial papaya plantations in the central zone of the State of Veracruz. **Methodology:** Leaves with differential symptoms of the disease were collected. The capsid protein (CP) coding region was amplified by RT-PCR to confirm the identity of the virus. The sequences obtained were analyzed, aligned and a phylogenetic tree was obtained. **Results:** The presence of PRSV-p was confirmed by RT-PCR. Through sequence analysis, high diversity was observed in the first 50 amino acids encoded in the N-terminal region of CP. In the phylogenetic tree, three viral genetic groups were obtained. The largest conserved sites of interest (even the WCIE box and QMKAAA) were found near the C-terminal region of the CP. 100% homology was observed in the central and C-terminal region of the Ver75Co isolate, with respect to the consensus sequence. **Implications:** The results show the genetic diversity of the virus in the central zone of the state of Veracruz, which will allow genetic modifications to improve resistance in papaya plants. **Conclusions:** There is genetic variability of PRSV-p in Veracruz, there are conserved sites of interest (WCIE and QMKAAA) and changes in the N-terminal region, which includes the EK repetitive region and the DAG codon. These changes may be a genetic characteristic of the virus for adaptation. The Ver75Co isolate may be the point of change that gives rise to the other isolates of this work. The phylogenetic tree shows a single genetic group of the virus, which is distributed in three different clades.

Key words: *Carica papaya*; *Papaya ringspot virus*; sequence analysis; phylogeny; viral capsid.

RESUMEN

Antecedentes: El *Potyvirus Papaya ringspot virus* tipo P (PRSV-p) ocasiona la enfermedad de la mancha anular del papayo (*Carica papaya* L.) la cual provoca daños en las plantaciones de este cultivo. En regiones donde hay movimiento de material vegetal y procesos de producción continua, existe mayor variabilidad genética de este virus; tal es el caso del estado de Veracruz, México, uno de los principales productores de papaya en el país. **Objetivo:** Analizar la variabilidad genética de aislados de PRSV-p, presente en plantaciones comerciales de papayo en la zona centro del estado de Veracruz. **Metodología:** Se realizaron colectas de hojas

† Submitted March 3, 2021 – Accepted January 17, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.3887>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID: D. Sósol-Reyes: 0000-0002-1148-9353; J.A. Villanueva-Jiménez: 0000-0003-0668-3466; F. Osorio-Acosta: 0000-0003-1716-7539; N. Flores-Estévez: 0000-0003-0257-2806; J.C. Noa-Carrazana: 0000-0001-8126-8954.

con síntomas diferenciales de la enfermedad. Se amplificó la región que codifica la proteína de la cápside (CP) mediante RT-PCR para confirmar la identidad del virus. Las secuencias obtenidas se analizaron, se alinearon y se obtuvo un árbol filogenético. **Resultados:** Se confirmó la presencia de PRSV-p a través de RT-PCR. Mediante el análisis de secuencias, se observó alta diversidad en los primeros 50 aminoácidos codificados en la región N-terminal de la CP. Se obtuvieron tres grupos genéticos virales en el árbol filogenético. Se encontraron sitios conservados de interés (incluida la caja WCIEN y QMKAAA), los de mayor tamaño, cerca de la región C-terminal de la CP. Se observó 100% de homología en la región central y C-terminal del aislado Ver75Co, respecto a la secuencia consenso. **Implicaciones:** Los resultados muestran la diversidad genética del virus en la zona central del estado de Veracruz, los cuales permitirán realizar modificaciones genéticas para mejorar la resistencia en plantas de papaya. **Conclusión:** Existe variabilidad genética de PRSV-p en Veracruz, se encuentran sitios conservados de interés (WCIEN y QMKAAA) y cambios en la región N-terminal, lo que incluye la región repetitiva EK y el codón DAG. Estos cambios pueden ser una característica genética del virus para la adaptación. El aislado Ver75Co, puede ser el punto de cambio que da origen a los otros aislados de este trabajo. El árbol filogenético muestra un solo grupo genético del virus, el cual está distribuido en tres clados distintos.

Palabras clave: análisis de secuencias; cápside viral; *Carica papaya*; filogenia; *Papaya ringspot virus*.

INTRODUCCIÓN

La producción de papaya (*Carica papaya* L.) es afectada por la mancha anular del papayo, principal enfermedad para este cultivo en el mundo, ocasionada por *Papaya ringspot virus* raza tipo P (PRSV-p) (Chandrashekar *et al.*, 2015). Este agente infeccioso es transmitido por diferentes especies de áfidos (familia Aphididae del orden Hemiptera), esenciales en la propagación del patógeno e incidencia de la enfermedad (Bermúdez-Guzmán *et al.*, 2017). El PRSV-p pertenece a la familia Potyviridae, sus partículas son flexibles y filamentosas, de 700 a 900 nm de longitud y 12 nm de ancho. Su genoma es de ARN monocatenario de polaridad positiva, de alrededor de 10,000 nucleótidos de longitud y cuenta con una cola poli(A) en el extremo 3' (Kumar *et al.*, 2019). La región central del genoma del PRSV-p es altamente conservada, mientras que la región N-terminal es más variable (Ortiz-Rojas, 2015). La acumulación de mutaciones, los procesos de selección natural y el movimiento a larga distancia en estructuras de las plantas donde los plasmodesmos son limitados, son factores que incrementan la diversidad genética (Chaves-Bedoya *et al.*, 2015). Es importante señalar que los potyvirus se han utilizado como herramienta para explicar cómo las especies de virus en plantas no son una población uniforme y acumulan una gran cantidad de variación fenotípica y genética. Por ello, han surgido diferentes términos, tales como razas (ejemplo PRSV-P, PRSV-W), variantes virales y aislados virales. Se entiende a este último como material experimental correspondiente a una instancia de un virus, el cual que puede diferir o no (Hull, 2014). En los virus la variación genética es generada, entre otros factores, por mutaciones de origen diverso, errores que ocurren durante la

replicación del genoma viral y procesos de adaptación y recombinación (Aday-Díaz *et al.*, 2020). Además, la inserción de nuevas moléculas de ácido nucleico puede traer consigo un cambio en la dispersión y patogenicidad, lo cual puede constituir otra fuente de variación genética (Hamim *et al.*, 2018). La proteína CP participa en la función de la encapsidación del RNA, en el proceso de transmisión por vectores, en el movimiento de célula a célula y en su patogenicidad (Weber y Bujarski, 2015). Adicionalmente, la variabilidad genética del PRSV-p está relacionada con los diferentes sitios geográficos donde se desarrolla el cultivo, esto influye en la conformación estructural de la cápside viral, la cual participa en el proceso de transmisión y puede influir en la evolución del patógeno (García-Viera *et al.*, 2018). En regiones donde el papayo es altamente cultivado se presenta mayor variabilidad genética del virus, asociada con el movimiento de material vegetal (Cabrera-Mederos *et al.*, 2019). El estudio de la variabilidad genética del PRSV-p es importante para el desarrollo de estrategias de control asociadas a la interacción virus-vector-planta (Dietzgen *et al.*, 2016). Por lo tanto, se planteó como objetivo analizar la variabilidad genética de aislados de PRSV-p, presente en plantaciones comerciales de papayo en la zona centro del estado de Veracruz, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron hojas sintomáticas en huertas de papayo ubicadas en los municipios de La Antigua, Cotaxtla, Talixcoyan y Tierra Blanca, pertenecientes a Veracruz, México. Las hojas sintomáticas se transportaron dentro de una hielera con gel refrigerante. Posteriormente, éstas se clasificaron de acuerdo a los síntomas diferenciales

de la enfermedad, por lo que se obtuvieron cinco aislados distintos, identificados con la siguiente nomenclatura: C1Cot4, C3Ant1, C4Ant14, C5TB1 y C6Tla3. Además, se utilizó como control positivo el aislado TJam54, el cual se caracterizó anteriormente y fue obtenido de una parcela de papayo ubicada en Jamapa, Veracruz.

En condiciones de invernadero se tomó una hoja de cada aislado para inocular plantas de papayo sanas de manera mecánica con carborundum (Sósol-Reyes *et al.*, 2020). Una vez que aparecieron los primeros síntomas, se tomó una hoja y se almacenó a -20 °C, hasta su análisis a través de RT-PCR. La extracción de ácidos nucleicos se realizó con el equipo de extracción rápida Quick-RNA MiniPrep de la marca Zymo Research® y se siguieron las especificaciones del fabricante. Para amplificar el gen que codifica para la proteína de la cápside (CP), se utilizaron los siguientes primers: 3F 5' GACCATGGTCCTAGAATGAAGCTGTGGAT G 3' y 11R 3' TTTTTTTTCTCTCATTCTAAGAGGCTC 5' (Noa-Carrazana *et al.*, 2006). La RT-PCR se realizó en un termociclador Multigene Labnet® con la mezcla de reacción de Promega RT-PCR System®, con el siguiente programa: un ciclo de 45 min a 45 °C, un ciclo de 2 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 60 °C y 2 min a 68 °C; y un ciclo de extensión final de 7 min a 68 °C. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa en tampón TAE al 1%. Para la purificación de las bandas amplificadas se utilizó el equipo de purificación ZR Sequencing Clean-up Kit de Zymo Research®. La secuenciación se realizó con el equipo Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130® que emplea la técnica de Sanger y tecnología capilar, en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., México. Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit® versión 7.1 y se compararon con las registradas en la plataforma GenBank®. Se utilizó el mismo programa para realizar los alineamientos de los aminoácidos con la secuencia consenso, posteriormente se hizo un análisis de entropía (Hx) para observar la diversidad de las secuencias y la determinación de las regiones conservadas. En el programa MEGA® versión 7.0, se realizó el análisis filogenético Neighbor-joining (N-J) utilizando las secuencias obtenidas en este estudio y 12 reportadas previamente en Veracruz (Noa-Carrazana *et al.*, 2006). Finalmente, se realizó un análisis de las distancias entre los grupos genéticos obtenidos, se consideró como un grupo a cada uno de los clados formados en el árbol de filogenia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los amplicones positivos derivados de la RT-PCR mostraron de 96 a 98% de identidad con aislados de PRSV-p previamente descritos por Noa-Carrazana *et al.* (2006). El tamaño de estos amplicones fue de 1,071 pares de bases, correspondientes al gen de la proteína de la cápside (CP) y a un fragmento parcial de la región 3' no traducida (3' UTR) (Noa-Carrazana *et al.*, 2007).

A los 43 días posteriores a la inoculación (dpi) mecánica, se observaron síntomas diferenciales de la enfermedad, los cuales se manifestaron en las plantas de la siguiente manera: C1Cot4, manchas cloróticas en las zonas apicales de la hoja; C3Ant1, epinastia; C4Ant14, hojas arrolladas; C5TB1, clorosis en zonas apicales de la hoja, arrollamiento y hojas filiformes; C6Tla3, severa filiformidad. Las diferencias en sintomatología pudieron derivarse de la variabilidad genética de PRSV-p y su carga viral (Sósol-Reyes *et al.*, 2020; Ordaz-Pérez *et al.*, 2017).

Las secuencias de los aislados con los que se inocularon las plantas se incluyeron en GenBank con su respectivo número de acceso como sigue: C1Cot4 (MT922010), C3Ant1 (MT922006), C4Ant14 (MT922007), C5TB1 (MT922008), C6Tla3 (MT922009); así como la secuencia testigo TJam54 (MT922011). Todas las secuencias correspondientes a la proteína de la cápside (CP) tuvieron una longitud de 858 nucleótidos y 286 aminoácidos hasta el codón de terminación (TGA). Batenson *et al.* (2002), al analizar 93 secuencias de PRSV, observaron que la región correspondiente a la CP contuvo de 840 a 870 nucleótidos, lo cual se encuentra en el rango de nucleótidos de las secuencias de CP amplificadas en este trabajo.

Al comparar las secuencias, se observó mayor variabilidad entre los primeros 50 aminoácidos codificados para la CP en el extremo N-terminal (Figura 1). Akhter *et al.* (2013) reportaron que las variaciones en la CP se encuentran en los primeros 50 aminoácidos de la región N-terminal, similar a los resultados de este estudio; adicionalmente, Lu *et al.* (2008) sugirieron posibles inserciones y deleciones de nucleótidos que dan origen parcial a esta variación. Shukla *et al.* (1988) mostraron que los extremos N-terminal y C-terminal se encuentran expuestos en la superficie de la partícula viral, es decir, no tienen una función en la estabilidad estructural de los viriones. Sin embargo, la alta conservación en la región C-terminal sugiere que, esta región, participa en una

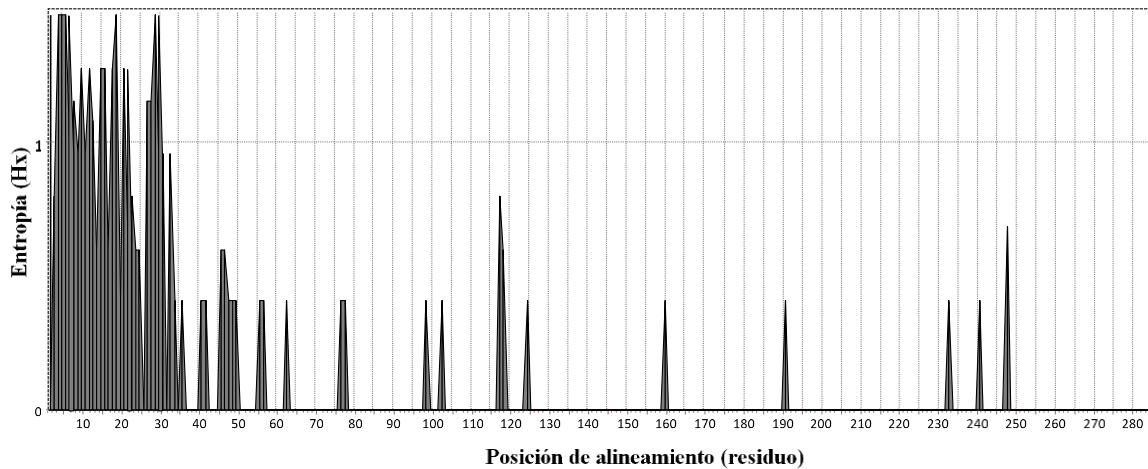


Figura 1. Análisis de la entropía (Hx) de la secuencia de nucleótidos de la región CP como inferencia indirecta de la diversidad entre seis aislados de PRSV-p colectados de plantas de papayo sintomáticas en la zona centro del estado de Veracruz.

función importante para el virus, por lo cual no puede tolerar gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos, lo cual explica la menor variabilidad observada.

En los cinco aislados de este trabajo y el testigo, se encontraron cinco regiones conservadas (Tabla 1), la de mayor tamaño en el extremo C-terminal. Estas regiones podrían ser utilizadas para realizar modificaciones genéticas y establecer resistencia en plantas de papaya, al introducirlas en el genoma de las plantas y promover su inmunización mediante la formación de cápsides que encapsularían al virus antes de entrar a la célula (Kumari *et al.*, 2015). Sultana *et al.* (2020) reportaron que la parte C-terminal se encuentra más conservada que la región N-terminal, por lo cual debería utilizarse para obtener plantas transgénicas, como lo sugieren Rodríguez *et al.* (2014). Además, los sitios conservados se comparten entre las muestras reportadas, por lo que, al buscar generar resistencia a partir de ellos, podría resultar eficiente independientemente de la diversidad genética de PRSV-p de la zona centro de Veracruz, tal como mencionaron Kalam *et al.* (2014), la resistencia de

amplio espectro contra el virus depende de la homología de los transgenes y la divergencia genética del virus.

Con las secuencias obtenidas se realizaron alineamientos para observar su homología y los cambios que existen entre los aminoácidos que codifican la CP, debido a que esta proteína es la más utilizada en estudios de variabilidad genética (Hamdy and El-Aziz, 2020). En la Figura 2 se observa que en el extremo N-terminal existe mayor diversidad al presentar cambios en los aminoácidos, los cuales involucran al triplete DAG (Ácido Aspártico-Alanina-Glicina) y una región EK (Ácido-Glutámico-Lisina). Revers and García (2015) y Valli *et al.* (2018) mencionaron que la caja DAG está involucrada con el proceso de transmisión por áfidos, lo que coincide con Mishra *et al.* (2014) quienes reportaron que los cambios o mutaciones en este codón se relacionan con la pérdida de transmisión por este tipo de vectores. Al igual que Duterme *et al.* (1996) y Alemán-Verdaguer *et al.* (1997) al observar que se afectó el proceso de transmisión del portyvirus YMV (virus del mosaico del ñame) al ser modificado el codón

Tabla 1. Regiones conservadas de los aislados de PRSV-p de la zona centro de Veracruz, México.

| Región | Posición | Aminoácidos |
|----------------|----------|---|
| 1 (N-terminal) | 78-97 | IKGKTVLNLNHLQYNPQQI |
| 2 (Central) | 125-159 | NEMQVMLNGLMVWCIENGTSPDISGVVWVMMMDGETQ |
| 3 (Central) | 161-190 | EYPIKPLIEHATPSFRQIMAHFSNAAEAYI |
| 4 (C-terminal) | 192-232 | KRNATERYMPRYGIKRNLTDISLARYAFDFYEVNSKTPDRA |
| 5 (C-terminal) | 249-285 | RRMFGMDGSVSNKEENTERHTVEDVNRDMHSLGMRN |

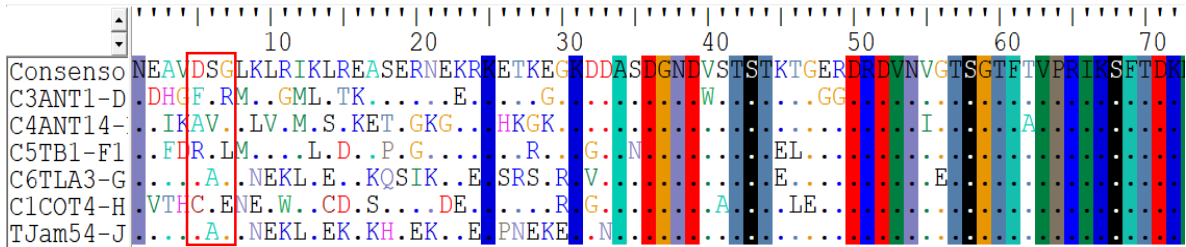


Figura 2. Alineamiento correspondiente a las secuencias de la proteína de la cápside (CP) de seis aislados de PRSV-p. Se muestra la región N-terminal con mayor variación en los primeros 50 aminoácidos. En el recuadro rojo se marcan los cambios en los aminoácidos que involucran al triplete DAG, a excepción de TJam54 y C6Tla3.

DAG. Por su parte, con Lacomme *et al.* (2017) reportaron que en estudios de mutagénesis realizados en la región N-terminal de la proteína CP de otros virus no persistentes se demostró que los aminoácidos en las proximidades del motivo DAG influyen en la eficiencia de transmisión de los áfidos. Por el contrario, Jain *et al.* (1998) caracterizaron la CP de un aislado de PRSV-w, el cual presentó el triplete DAG; sin embargo, al ser remplazado por DAD en PRSV-p, la transmisión no se afectó. Esto coincide con Medina-Selguero *et al.* (2021), quienes reportaron que en estudios recientes de potyvirus se encontró que la región que rodea al codón DAG es hipervariable, lo que podría implicar una característica genética de adaptación para lograr la transmisión a diferentes hospedantes y vectores. En nuestro trabajo se encontraron cambios en el triplete DAG, a pesar de ello, se lograron realizar transmisiones por medio de áfidos (datos no publicados), lo cual sugiere que esta caja podría tener un papel secundario en el proceso de transmisión.

Los cambios en los aminoácidos de las secuencias obtenidas también involucran sitios con repeticiones EK, a la cual no se le conoce una función biológica determinada (Zambrana-Echevarría *et al.*, 2016). Por su parte Wu *et al.* (2018), reportaron cambios en la zona repetitiva EK y observaron conservados los motivos WCIEN y QMKAAA. Por su parte, Rodríguez *et al.* (2014) encontraron que en muestras de PRSV-p de Brasil y Cuba estaban conservadas las cajas WCIEN y QMKAAA, los cuales podrían estar involucrados en el proceso de transmisión por áfidos. Dichos aminoácidos se encontraron en las secuencias de este trabajo, lo cual, coincide con lo reportado por Sánchez-Noriega *et al.* (2017) al encontrar dichas proteínas en muestras de PRSV-p de Jalisco y Michoacán, México, así como por Jun-Ya *et al.* (2007), quienes también observaron la presencia de

WCIEN y QMKAAA en aislados de China y Medina-Selguero *et al.*, (2021) de Ecuador. Zambrana-Echevarría *et al.* (2016), informaron que el motivo WCIEN está ubicado en la región central y QMKAAA en C-terminal, ambas cajas se encuentran en la cápside viral de diversos potyvirus y muestran mayor grado de conservación que la N-terminal.

Al realizar el análisis de variación del genoma de PVY, Gadhav *et al.* (2020), revelaron que los potyvirus contienen áreas fijas hipervariables en el genoma, las cuales proporcionan robustez mutacional a los potyvirus, sin embargo, se cree que están involucradas en la adaptación al hospedante y algunas en la transmisión por áfidos, tales como CP y HC-Pro.

La Tabla 2 muestra el porcentaje de identidad de aminoácidos que conforman la CP de PRSV-p. Se puede observar que las zonas que presentan mayor identidad a la secuencia consenso, establecida en este trabajo, son la región centro (de 88 a 100%) y C-terminal (de 92 a 100%), mientras que para la región N-terminal, se encontró en un rango de 72.16 a 87.62%. Para el caso de, los aislados de Cotaxtla registrados por Noa-Carrazana *et al.* (2007), presentan una identidad mayor al 98%. La muestra Ver75Co mostró 100% de identidad en las regiones mencionadas, lo cual permite suponer que pudo ser el punto de cambio para los aislados registrados en este trabajo. Tal como mencionaron Choi *et al.* (2001), la variabilidad genética depende del tamaño efectivo de la población, el cual es el número de partículas virales que darán origen a una infección en el hospedante, es decir, del número total de partículas de una población, solo causarán infección las que puedan ser transmitidas por áfidos, lo que representa un cuello de botella genético que ocurre en la naturaleza. Por lo tanto, en sitios de mayor producción y movimiento vegetal

Tabla 2. Porcentaje de identidad de aminoácidos de la proteína de la cápside de aislados de PRSV-p del centro de Veracruz respecto a la secuencia consenso de este trabajo. Secuencias de referencia marcadas con asterisco (*), secuencias de este trabajo marcadas con el símbolo (+).

| Nombre del aislado | N-Terminal | Región central | C-Terminal | Número de acceso del GenBank |
|--------------------|------------|----------------|------------|------------------------------|
| C3Ant1 | 81.44% | 100% | 100% | MT922006+ |
| C4Ant14 | 79.38% | 100% | 98.93% | MT922007+ |
| C5TB1 | 87.62% | 95.6% | 97.87% | MT922008+ |
| C6Tla3 | 80.41% | 97.8% | 97.87% | MT922009+ |
| C1Cot4 | 82.47% | 98.9% | 98.93% | MT922010+ |
| TJam54 | 81.44% | 100% | 100% | MT922011+ |
| Ver51TB | 78.35% | 97.8% | 98.93% | AJ012649* |
| Ver41PO | 79.38% | 97.8% | 98.93% | AY231130* |
| Ver67Co | 78.35% | 97.8% | 98.93% | AF319507* |
| Ver16Ca | 79.38% | 97.8% | 96.80% | AF319506* |
| Ver2Ac | 79.38% | 97.8% | 100% | AF319505* |
| Ver42PO | 79.38% | 97.8% | 98.93% | AJ012099* |
| Ver65Co | 80.41% | 98.9% | 98.93% | AF319497* |
| Ver74Co | 81.44% | 98.9% | 100% | DQ008448* |
| Ver72Co | 80.41% | 98.9% | 98.93% | DQ008446* |
| Ver73Co | 80.41% | 98.9% | 98.93% | DQ008447* |
| CpT-30 | 72.16% | 96.7% | 96.80% | AY017190* |
| Ver75Co | 82.47% | 100% | 100% | DQ008449* |

existe más posibilidad de que ocurran interacciones virus-vector-planta (Gadhavé *et al.*, 2019). Esto coincide con Aday-Díaz *et al.* (2020) ya que al realizar análisis de la CP de PRSV-p del continente americano observaron que la diversidad genética aumentó cuando comenzó la implementación extensiva de papayo.

La Figura 3 muestra la filogenia de PRSV-p en Veracruz, con tres clados bien definidos y un grupo externo utilizado para enraizar el árbol filogenético (CpT-30), donde los aislados colectados en este trabajo tienen una relación más estrecha con aquellos previamente colectados en Cotaxtla y caracterizados por Noa-Carranza *et al.* (2006). Estos autores reportaron cinco grupos genéticos de PRSV-p en México, los cuales se distribuyen en la costa del Pacífico, la costa del Golfo, la península de Yucatán, la región Occidental del Pacífico y algunas regiones productoras de papayo en Veracruz. Este hallazgo se atribuye a lo que Ali y Rooinck (2008) llamaron efecto fundador, donde una nueva población infecciosa inicia a partir de ciertos grupos genéticos elegidos al azar de la población madre. Por otro lado, la muestra TJam54, utilizada como testigo y caracterizada previamente, mostró mayor relación con las provenientes de Cotaxtla presentes en el GenBank, que con los caracterizados en este ensayo. También, se encontró mayor asociación entre los

aislados C5TB1-C3Ant1 y C1Cot4-C4Ant14-C6Tla30.

A partir de la construcción del árbol filogenético se obtuvieron tres clados diferenciales y uno externo, los cuales se utilizaron para realizar análisis de distancia entre grupos genéticos de PRSV-p del centro de Veracruz (Tabla 3). En ambos casos, se observó que existe mayor identidad entre G2 (Ver75Co, Ver 73, Ver 72, Ver74Co, TJam54 y Ver65) y G1 (C3Ant1, C1Cot4, 2 C5TB1 y C4Ant14, C6Tla3). Lo cual sugiere que dichos aislados pudieron derivarse de algunos provenientes de Cotaxtla, debido al movimiento de planta de un sitio a otro y la rápida dispersión de los áfidos (Dos Santos *et al.*, 2016). Lo anterior es posible debido a que las muestras reportadas en este trabajo pertenecen a la región productora de papayo de Veracruz, por lo que comparten vecindad geográfica, tal como mencionaron Zhao *et al.* (2016), los cambios en los nucleótidos se producen por deriva génica y selección, influenciada por movimientos demográficos de material vegetal. Cabe mencionar que TJam54 se caracterizó con dos años de anterioridad, lo que explica su estrecha relación con los aislados del grupo 2. La poca diversidad del virus podría verse reflejada en las funciones que realiza la cápside viral, tales como la transmisión por áfidos, la encapsidación del ARN viral, el silenciamiento del

ARN, la infectividad, patogenicidad, expresión de síntomas, movimiento sistémico y movimiento de célula a célula (Weber y Bujarski, 2015).

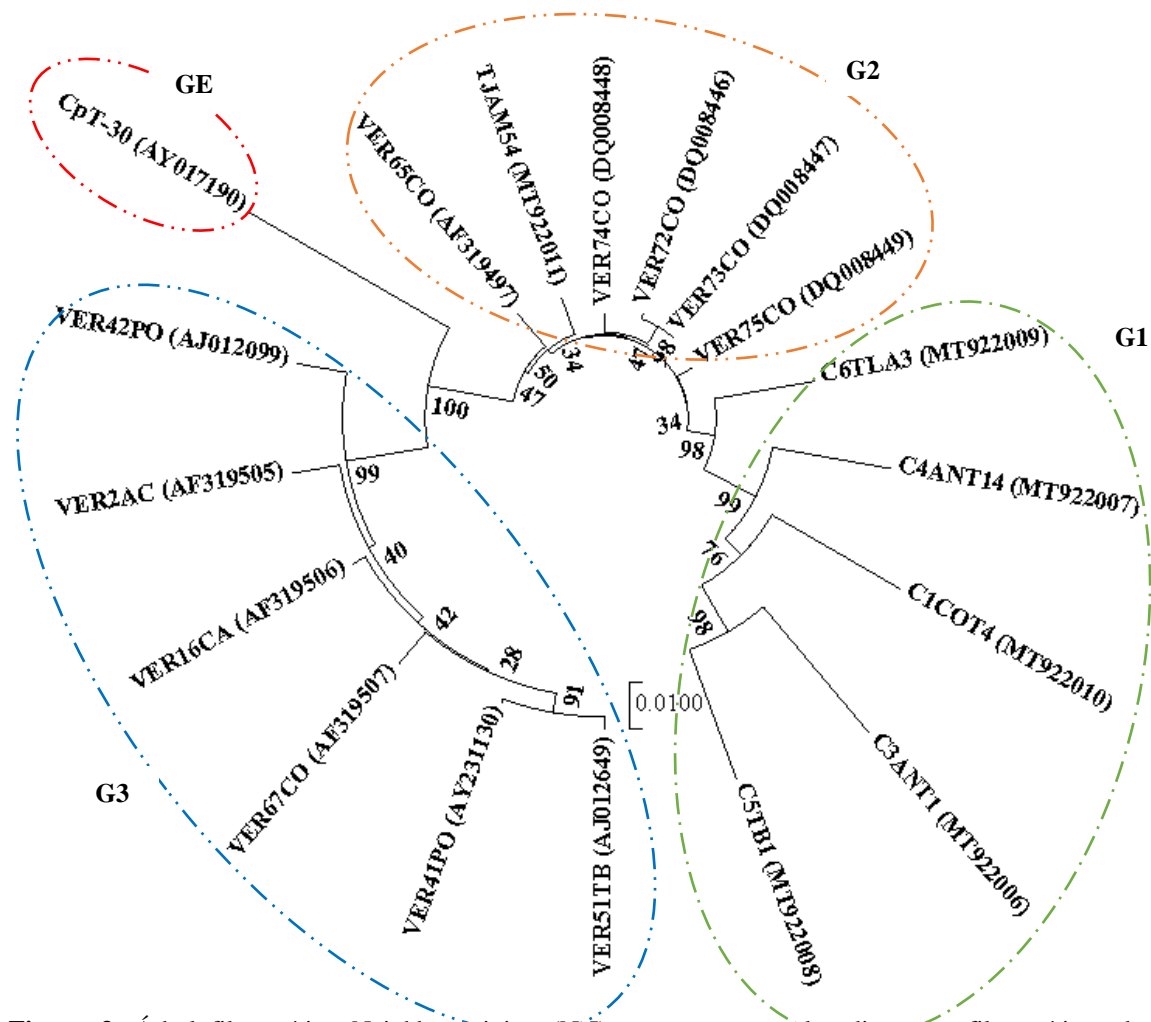


Figura 3. Árbol filogenético Neighbor-joining (N-J), que representa las distancias filogenéticas de las secuencias de la proteína de la cápside de los aislados estudiados y el testigo, comparado con otras secuencias de Veracruz depositadas en el GenBank. Entre paréntesis se indica el número de accesoión correspondiente. Se muestran los porcentajes en valores bootstrap de 1000 réplicas. Los aislados dentro de la línea punteada color verde corresponden al grupo 1 (G1), las de color naranja al grupo 2 (G2), las de color azul al grupo 3 (G3), y en color rojo el grupo externo (GE)

Tabla 3. Análisis de distancia de nucleótidos entre los principales grupos genéticos de PRSV-p del estado de Veracruz, realizado con el método de maximum composite likelihood (MCL). (Grupo 1: C5TB1, C3Ant1, C1Cot4, C4Ant14 y C6Tla3; Grupo 2: Ver75Co, Ver73Co, Ver72Co, Ver74Co, TJam54 y Ver65Co; Grupo 3: Ver42PO, Ver2Ac, Ver16Ca, Ver67Co, Ver41PO y Ver51TB; grupo externo: CpT-30).

| | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 | Grupo externo |
|---------------|---------|---------|---------|---------------|
| Grupo 1 | | | | |
| Grupo 2 | 0.060 | | | |
| Grupo 3 | 0.102 | 0.054 | | |
| Grupo externo | 0.121 | 0.077 | 0.075 | |

CONCLUSIONES

Existe variabilidad genética en los 5 aislados y el testigo de PRSV-p analizados de Veracruz. La región N-terminal de la secuencia codificante para la cápside proteica del patógeno, presenta alta diversidad en los primeros 50 aminoácidos, con cambios en la región repetitiva EK y en el codón DAG, lo cual puede ser una característica genética para la adaptación del agente causal. En las secuencias del virus obtenidas en este trabajo se encuentra conservado el motivo WCIEN, el cual se ubica en la posición 137 de la región central de la proteína de la cápside. Además, en cuatro de los cinco aislados y el testigo, los aminoácidos QMKAAA están conservados cerca de la región C-terminal, en la posición 238. En el aislado C5TB1, donde no está conservado se presenta la sustitución de una valina por una alanina. Dichos aminoácidos pueden estar involucrados en la transmisión por vectores.

El aislado Ver75Co tiene un 100% de homología en la región central y C-terminal de la secuencia consenso, lo que indica que puede ser el punto de cambio que da origen a los aislados de este trabajo. El árbol de filogenia muestra que los aislados pertenecen a un mismo grupo genético; sin embargo, se distribuyen en tres clados distintos.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Colegio de Postgraduados, campus Veracruz y al INBIOTECA, Universidad Veracruzana por el apoyo y las facilidades de la infraestructura para la realización de este estudio.

Funding. The financing of the National Council of Science and Technology (CONACyT) is thanked for the scholarship granted N ° 703673, which allowed this work to be carried out.

Interest conflict. The authors declare that they agree with the content of this document and have no conflict of interest between authors in any aspect related to its publication.

Compliance with ethical standards. The management and use of plants, viral isolates, and insects were carried out following the guidelines established and approved by the Universidad Veracruzana and the Colegio de Postgraduados.

Data availability. The authors declare that broad rights are granted to the journal regarding the

publication and access to the document once the article is accepted.

Author contribution statement (CRediT). **D. Sósol-Reyes** - Formal Analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – original draft., **J.A. Villanueva-Jiménez** - Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Supervision, Validation, Writing – review & editing., **F. Osorio-Acosta** - Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing – review & editing., **N. Flores-Estévez** – Investigation, Methodology, Resources, Writing – review & editing., **J.C. Noa-Carrazana** - Conceptualization, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing.

REFERENCIAS

- Aday-Díaz, O., Puchades-Izaguirre, Y., Cabrera-Mederos, D., González-Ramírez, J. E. and Portal, O., 2020. Distribución y caracterización molecular de los virus SCYLV, SCMV en *Saccharum* sp. y PRSV-P en *Carica papaya* en Cuba. *Revista Centro Agrícola*, 47, pp. 80-83. <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v47s1/0253-5785-cag-47-s1-80.pdf>
- Akhter, M. S., Basavaraj, Y. B., Akanda, A. M., Mandal, B. and Jain, R. K., 2013. Genetic Diversity Base on Coat Protein of *Papaya ringspot virus* (Pathotype P) Isolates from Bangladesh. *Indian Journal Virology*, 24, pp. 70-73. <https://doi.org/10.1007/s13337-013-0127-2>
- Alemán-Verdaguer, M. E., Goudou-Urbino, C., Dubern, R., Beachy, J. N., and Fauquet, C., 1997. Analysis of the sequence diversity of the PI, HC, P3, Nib and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intra-species molecular diversity of potyviruses. *Journal of General Virology*, 78(6), pp. 1253-264. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-6-1253>
- Ali, A. and Roosinck, M. J., 2008. Genetic Bottlenecks. In: Roosinck, M. J. (eds.). *Plant virus evolution*, Springer. Heidelberg, Germain. pp. 123-133. <https://link.springer.com/content/pdf/bfm%3A978-3-540-75763-4%2F1.pdf>
- Bermúdez-Guzmán, M. J., Guzmán-González, S., Lara-Rey, J., Palmeros-Suárez P. A., López-

- Muraira, I. G. and Gómez-Leyva, J. F., 2017. Presence of *Papaya ringspot virus* (PRSV) in weed associated with *Carica papaya* in Colima, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36, pp. 1-15. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-2>
- Batenson, F. M., Lines, R. E., Revill, P., Chaleeprom, W., Ha. C. V., Gibbs, A. J., and Dale, J. L., 2002. On the evolution and molecular epidemiology of the potyvirus papaya ringspot virus. *Journal of General Virology*, 83(10), pp. 2575-2585. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2575>
- Cabrera-Mederos, D., Giolitti, F., Torres, C., and Portal, O., 2019. Distribution and phylogenetics of papaya ringspot virus on *Carica papaya* in Cuba. *Plant Pathology*, 68(2), pp. 239-250. <https://doi.org/10.1111/ppa.12942>
- Chandrashekar, K., Chavan, V. M., Sharma, S. K., and Bhosle, A. B., 2015. Management of PRSV-p in papaya through time of planting and border cropping. *Indian Journal of Horticulture*, 72(3), pp. 423-425. <https://doi.org/10.5958/0974-0112.2015.00083.3>
- Chaves-Bedoya, G., and Ortiz-Rojas, L. Y., 2015. Genetic variability of Papaya ringspot virus isolates in Norte de Santander-Colombia. *Agronomía Colombiana*, 33(2), pp. 184-193. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v33n2.50095>
- Choi I-R, Hall, J. S., Henry, M., Zhang, L., Hein, G. L., French, R., and Stenger, D. C., 2001. Contributions of genetic drift and negative selection on the evolution of three strains of wheat streak mosaic tritrovirus. *Archives of Virology*, 146, pp. 619-628. <https://doi.org/10.1007/s007050170167>
- Dietzgen, R. G., Mann, K. S., and Johnson, K. N., 2016. Plant Virus-Insect Vector Interactions: Current and Potential Future Research Directions. *Viruses*, 8(11), pp. 1-21. <https://doi.org/10.3390/v8110303>
- Dos Santos-Martins, D., Aires-Ventura, J., De Cássia, R., Fornazier, M. J., Rezende, J. A. M., Culik, M. P., Fiuza-Ferreira, P. S., Peronti, A. L., Zonta de Carvalho, R. C., and Sousa-Silva, C. R., 2016. Aphid vectors of *Papaya ringspot virus* and their weed hosts in orchards in the major papaya producing and exporting region of Brazil. *Crop Protection*, 90, pp. 191-196. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.08.030>
- Duterme, O., Colinet, D., Kummert, J., and Lepoivre, P., 1996. Determination of the taxonomic position and characterization of yam mosaic virus isolates based on sequence data of the 5'-terminal part of the coat protein cistron. *Archives of Virology*, 141, pp. 1067-1075. <https://doi.org/10.1007/bf01718610>
- Gadhve, K. R., Dutta, B., Coolong, T., and Srinivasan, R., 2019. A non-persistent aphid-transmitted *Potyvirus* differentially alters the vector and non-vector biology through host plant quality manipulation. *Scientific Reports*, 9, pp. 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39256-5>
- Gadhve, K. R., Gautam, S., Rasmussen, D. A., and Srinivasan, R., 2020. Aphid transmission of *Potyvirus*: The largest plant-infecting RNA virus genus. *Viruses*, 12(7), pp. 1-23. <https://doi.org/10.3390/v12070773>
- García-Viera, M. A., Sánchez-Segura, L., Chavez-Calvillo, G., Jarquín-Rosales, D., and Silva-Rosales, L., 2018. Changes in leaf tissue of *Carica papaya* during single and mixed infections with *Papaya ringspot virus* and *Papaya mosaic virus*. *Biologia Plantarum*, 62, pp. 173-180. <https://doi.org/10.1007/s10535-017-0741-8>
- Hamdy, M., and El-Aziz, Abd., 2020. Incidence and disease control of *Zucchini yellow mosaic potyvirus*. *Journal of Plant Science Phytopathology*, 4, pp. 33-35. <https://doi.org/10.29328/journal.jpssp.1001048>
- Hamim, I., Borth, W. B., Marquez, J., Green, J. C., Melzer, W. B., and Hu, J. S., 2018. Transgene-mediated resistance to *Papaya ringspot virus*: challenges and solutions. *Phytoparasitica*, 46, pp. 1-18. <https://doi.org/10.1007/s12600-017-0636-4>
- Hull, R., 2014. *Plant virology*, 5th ed. Academic Press. London, United Kingdom.
- Jain, R. K., Pappu, H. R., Pappu, S. S., Varma, A., and Ram, R. D., 1998. Molecular characterization of papaya ringspot

- potyvirus isolates from India. *Annals of Applied Biology*, 132, pp. 413-425. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1998.tb05218.x>
- Jun-Ya, W., De-Ling, L., Xiao-Ying, L., and Peng, Z., 2007. Variation in the coat protein of *Papaya ringspot virus* isolates from multiple locations of China. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(7), pp. 1062-1069. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9072.2007.00477.x>
- Kalam, A., Amin, L., and Marzuki, N., 2014. Gene technology for papaya ringspot virus disease management. *The Scientific World Journal*, 2014, pp. 1-11. <https://doi.org/10.1155/2014/768038>
- Kumar, R., Srivastava, A., Srivastava A., Srivastava, S., Prasad, V., and Raj, S. K., 2019. Studies on molecular variability of coat protein gene of *Papaya ringspot virus*-P isolates from India. *European Journal of Plant Pathology*, 155, pp. 369-376. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01778-z>
- Kumari, S., Trivedi, M., and Mishra, M., 2015. PRSV resistance un papaya (*Carica papaya* L.) through genetic engineering: A review. *Journal of Applied Horticulture*, 17(3), pp. 243-248. <http://doi.org/10.37855/jah.2015.v17i03.47>
- Lacomme, C., Pickup, J., Fox, A., Glais, L., Dupuis, B., Stainger, T., Rolot, J. L., Valkonen, J. P. T., Kruger, K., Nie, X., Modic, S., Mehle, N., Ravnika, M., and Hullé, M., 2017. Transmission and Epidemiology of *Potato virus Y*. In: Lacomme, C., Glais, L., Bellstedt, D. U., Dupuis, B., Karasev, A. V., and Jacquot, E. (eds). *Potato Virus Y: Biodiversity, Pathogenicity, Epidemiology and Management*, Springer. Cham, Switzerland. pp: 1-36. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58860-5_6
- Lu, Y. W., Shen, W. T., Zhou, P., Tang, Q. J., Niu, Y. M., Peng, M., and Xiong, Z., 2008. Complete genomic sequence of a papaya ringspot virus isolate from Hainan Island, China. *Archives of Virology*, 153, pp. 991-993. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0056-3>
- Medina-Selguero, A. X., Cornejo-Franco, J. F., Grinstead, S., Mowery, J., Mollov, D., and Quito-Avila, D. F., 2021. Genetic characterization of a mild isolate of papaya ringspot virus type-P (PRSV-P) and assessment of its cross-protection potential under greenhouse and field conditions. *PLoS ONE*, 16(2), pp. 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241652>
- Mishra, R., Verma, R. K., Sharma, P., Choudhary, D. K., and Gaur, R. K., 2014. Interaction between viral proteins with the transmission of Potyvirus. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(2), pp. 240-253. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.807659>
- Noa-Carrazana, J. C., Gonzáles de León, D., Ruíz-Castro, B. S., Piñero, D., and Silva-Rosales, L., 2006. Distribution of papaya ringspot virus and papaya mosaic virus in papaya plants (*Carica papaya*) in México. *Plant Disease*, 90(8), pp. 1004-1011. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1004>
- Noa-Carrazana, J. C., González-de-León, D., and Silva-Rosales, L., 2007. Molecular characterization of a severe isolate of papaya ringspot virus in Mexico and its relationship with other isolates. *Virus Genes*, 35, pp. 109-117. <https://doi.org/10.1007/s11262-006-0039-y>
- Ordaz-Pérez, D., Gámez-Vázquez, J., Hernández-Ruíz, J., Espinosa-Trujillo, E., Rivas-Valencia, P., and Castro-Montes, I., 2017. Resistencia de *Vasconcellea cauliflora* al Virus de la mancha anular de la papaya-potyvirus (PRSV-P) y su introgresión en *Carica papaya*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), pp. 571-590. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v35n3/2007-8080-rmfi-35-03-00571.pdf>
- Revers, F., and García, J. A., 2015. Molecular Biology of Potyviruses. *Advances in Virus Research*, 92, pp. 101-199. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.006>
- Rodríguez, D., Geraldino, P., González, J., and Figueira, A., 2014. Molecular and biological studies of papaya ringspot virus isolates Brazil and Cuba. *American Journal of Agriculture and Forestry*, 2(5), pp. 205-218. <https://doi.org/10.11648/j.ajaf.20140205.11>

- Sánchez-Noriega, L., Reinhart-Kirchmayr, M., Rodríguez-Garay, B., and Gutiérrez-Mora, A., 2017. Comparación de dos aislados mexicanos del VMAP para determinar las causas de infección de una plantación de plantas de papaya tolerantes. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2, pp. 236-242. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volum2/3/3/38.pdf>
- Shukla, D. D., Strike, P. M., Tracy, S. L., Gough, K. H., and Ward, C. W., 1988. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of General Virology*, 69(7), pp. 1497-1508. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-7-1497>
- Sósol-Reyes, D., Villanueva-Jiménez, J. A., Osorio-Acosta, F., and Noa-Carranza, J. C., 2020. Gráficos radiales para caracterizar síntomas de PRSV-p en *Carica papaya*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38, pp. 280-292. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1912-1>
- Sultana, S., Roy, B., and Sherpa, A. R., 2020. The complete sequence of a papaya ringspot virus (PRSV) isolate from West Bengal, India infecting papaya and study of genetic variation. *European Journal of Plant Pathology*, 159, pp. 203-210. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02124-4>
- Weber, P. H., and Bujarski, J. J., 2015. Multiple functions of capsid proteins in (+) stranded RNA viruses during plant-virus interactions. *Virus Research*, 196, pp. 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.014>
- Wu, Z., Mo, C., Zhang, S., and Li, H., 2018. Characterization of *Papaya ringspot virus* isolates infecting transgenic papaya “Huanong No. 1” in South China. *Scientific Reports*, 8, pp. 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26596-x>
- Zambrana-Echevarría, C., De Jesús-Kim, L., Márquez-Karry, R., and Siritunga, D., 2016. Diversity of papaya ringspot virus isolates in Puerto Rico. *HortScience*, 51(4), pp. 362-369. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.4.362>
- Zhao, H., Jia, R. Z., Zhang, Y. L., Zhu, Y. J., Zeng, H. C., Kong, H., McCfferty, H., Guo, A. P., and Peng, M., 2016. Geographical and Genetic Divergence Among *Papaya ringspot virus* Populations Within Hainan Province, China. *Phytopathology*, 106(8), pp. 937-944. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-15-0111-R>