

# Presence of *Papaya ringspot virus* (PRSV) in weed associated with *Carica papaya* in Colima, Mexico

## Presencia de *Papaya ringspot virus* (PRSV) en arvenses asociadas a *Carica papaya* en Colima, México

**Manuel de Jesús Bermúdez-Guzmán**, INIFAP Campo experimental Tecomán. Km 35 Autopista Colima-Manzanillo. C.P. 28100, Tecomán, Colima; **Salvador Guzmán-González**, Universidad de Colima, Km 40 Autopista Colima-Manzanillo, C.P. 28100, Tecomán, Colima; **Joel Lara-Reyna**, Colegio de Postgraduados, Campus Campeche. Km. Carretera Haltunchen-Edzna Km. 17.5, C.P. 24450, Sihochac, Champotón, Campeche; **Paola A. Palmeros-Suárez**, CUCBA. Universidad de Guadalajara. Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, C.P. 45200, Zapopan, Jalisco; **Irma G. López-Muraira, Juan Florencio Gómez-Leyva\***, TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Km 10 Carretera a San Miguel de Cuyutlán, C.P. 45640, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. \*Autor para correspondencia: jfgleyva@hotmail.com.

Recibido: 21 de Junio, 2017.

Aceptado: 31 de Agosto, 2017.

Bermúdez-Guzmán MJ, Guzmán-González S, Lara-Reyna J, Palmeros-Suárez PA, López-Muraira IG, Gómez-Leyva JF. 2017. Presence of *Papaya ringspot virus* (PRSV) in weed associated with *Carica papaya* in Colima, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1):1-15.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-2

Primera publicación DOI: 17 de Octubre, 2017.

First DOI publication: October 17, 2017.

**Resumen.** *Papaya ringspot virus* (PRSV) es un *Potyvirus* de importancia económica para el cultivo de papayo (*Carica papaya* L.) produciendo síntomas de mosaico, clorosis y deformación en las hojas, así como manchas características en forma de anillo en el fruto. En México no existen reportes de especies de arvenses asociadas a este cultivo que actúen como reservorio del *Potyvirus*. En el presente trabajo, se identificó la presencia de PRSV

**Abstract.** *Papaya ringspot virus* (PRSV) is a *Potyvirus* of economic importance for papaya crops (*Carica papaya* L.) whose main symptoms are mosaic, chlorosis and deformation in leaves, as well as ring-like characteristic spots on the fruit. In Mexico, there is no report on weed species associated with this crop that act as reservoir of *Potyvirus*. In the present study, the presence of PRSV in weeds of commercial papaya plantations was identified in the state of Colima, Mexico. In a sample of 139 papaya plants and 70 weed samples with symptoms of viral infections, PRSV was detected in 40 and 50% for *Carica papaya* and *Cucurbita pepo*, respectively, using DAS-ELISA (Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assays). Nucleotide sequence analyses of the 350 base pairs fragments of the PRbV N1b region generated by RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) allowed the identification of *Potyvirus* in 40-90% of the total samples of *Abutilon*

en arvenses de plantaciones comerciales de papayo del estado de Colima, México. En un muestreo de 139 plantas de papayo y 70 arvenses con sintomatología de virosis, se detectó a PRSV en un 40 y 50% para *Carica papaya* y *Cucurbita pepo* respectivamente mediante DAS-ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas con doble anticuerpo en sándwich), mientras que el análisis de la secuencia de 350 pares de bases de la región NIB de PRSV generados por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa) permitió identificar al *Potyvirus* en un 40 a 90% del total de muestras de *Abutilon abutilastrum* y *Anoda cristata* (Malvaceae), así como *Solanum rostratum* (Solanaceae), lo que representa un nuevo reporte de arvenses reservorio de PRSV asociadas a plantaciones de papayo en México.

**Palabras clave:** maleza, hospederos alternos, DAS-ELISA, RT-PCR, *Potyvirus*.

El papayo (*Carica papaya* L.) es una planta herbácea tropical nativa de México y Centroamérica, cuyo fruto es comercialmente importante. México es el quinto exportador de papaya a nivel mundial, con una producción de 951,921 toneladas. Colima es el segundo estado con mayor producción de papaya en el país con 146,244 toneladas, tiene una superficie de aproximadamente 1,800 ha sembradas, y ocupa el primer lugar con el 60% de las exportaciones. El cultivo genera alrededor de 1,500 empleos directos y una derrama económica de entre 300 y 400 millones de pesos al año (SIAP, 2016).

Las plagas y enfermedades son factores importantes que afectan la calidad del fruto de papaya para el consumo humano. Los virus que infectan plantas de papayo han causado enfermedades de importancia económica a nivel mundial, representando serios problemas en la reducción de la producción de fruta, e incluso, en la destrucción total de

*abutilastrum* and *Anoda cristata* (Malvaceae), as well as *Solanum rostratum* (Solanaceae), which represents a new report on PRSV reservoir weeds associated with papaya crops in Mexico.

**Key words:** weed, alternate hosts, DAS-ELISA, RT-PCR, *Potyvirus*.

Papaya (*Carica papaya* L.) is a tropical herbaceous plant native to Mexico and Central America whose fruit is commercially important. Ranked fifth among exporters worldwide, Mexico produces 951,921 tons of papaya. Colima holds the second place in papaya domestic production with 146,244 ton on an area of nearly 1,800 ha, and the first place with 60% of papaya exports. Papaya cultivation creates around 1,500 direct employments and economic benefits ranging from 300 to 400 million pesos a year (SIAP, 2016).

Plague and diseases are important factors that reduce the quality of papaya fruit for human consumption. Viruses affecting papaya crops cause diseases of economic importance worldwide that pose a serious threaten because they reduce fruit production or even cause the total loss of infested plantations (Navanath *et al.*, 2017). Over 10 viruses affecting papaya have been reported worldwide from which the most important are *Papaya leaf distortion mosaic virus* (PLDMV), *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), *Papaya mosaic virus* (PapMV), *Papaya melaira virus* (PMeV) and *Papaya ringspot virus* (PRSV) (Abreu *et al.*, 2015). The latter belongs to the family *Potyviridae*, genus *Potyvirus* (Fauquet *et al.*, 2005), it is transmitted by vector aphids in a non-persistent manner, develops symptoms in the form of mosaics, chlorosis, leaf distortion and ring-like spots, and is responsible for crop losses ranging from 50 to 90%, and from 30 to 40% at postharvest (Hernández-Castro *et al.*, 2004; Hernández-Castro *et al.*, 2015).

huertos infestados (Navanath *et al.*, 2017). Se han reportado más de 10 virus que afectan este cultivo en todo el mundo, entre estos los más importantes son *Papaya leaf distortion mosaic virus* (PLD-MV), *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), *Papaya mosaic virus* (PapMV), *Papaya melaira virus* (PMeV) y *Papaya ringspot virus* (PRSV) (Abreu *et al.*, 2015). Este último virus pertenece a la familia *Potyviridae* y al género *Potyvirus* (Fauquet *et al.*, 2005), el cual se transmite por áfidos vectores de manera no persistente y genera síntomas de mosaicos, clorosis, distorsión en las hojas y manchas características en forma de anillo en el fruto, ocasionando pérdidas del 50 al 90% del cultivo y 30 al 40% en postcosecha (Hernández-Castro *et al.*, 2004; Hernández-Castro *et al.*, 2015).

Se ha observado, que la supervivencia del PRSV depende en gran medida de su capacidad para dispersarse a nuevos hospederos, donde las arvenses que se encuentran en los cultivos del papayo pueden fungir como reservorios del mismo. Los aislados de este virus pertenecen principalmente a dos cepas diferentes, denominadas como PRSV-P (papaya) y PRSV-W (watermelon), donde el rango de hospederos de la cepa P se limita a plantas de las familias *Caricaceae*, *Cucurbitaceae* y *Chenopodiaceae*, mientras que los aislados de la cepa W infectan principalmente a plantas de las familias *Cucurbitaceae* y *Chenopodiaceae* (Chin *et al.*, 2007; Tripathi *et al.*, 2008).

A nivel internacional, se han desarrollado trabajos encaminados en identificar maleza del cultivo de papayo portadoras de PRSV. En Brasil se efectuó un estudio para evaluar la infección natural de especies de cucurbitáceas localizadas dentro y

It has been observed that PRSV's survival greatly depends on its capacity to spread from host to host and that weeds in papaya crops can serve as PRSV reservoirs. Isolates of this virus belong mainly to two different strains known as PRSV-P (papaya) and PRSV-W (watermelon), where the hosts range of the P strain is limited to plants of the *Caricaceae*, *Cucurbitaceae* and *Chenopodiaceae* families, whereas the isolates of the W strain mainly infect plants of the *Cucurbitaceae* and *Chenopodiaceae* families (Chin *et al.*, 2007; Tripathi *et al.*, 2008).

Research has been conducted at international level to identify papaya weeds carrying PRSV. In Brazil, a study was conducted to evaluate natural infection of cucurbitaceous species inside and outside of papaya crops infected with PRSV-P using ELISA and RT-PCR tests (Mansilla *et al.*, 2013). In Florida, the presence of PRSV-W was reported in plant species of the family *Cucurbitaceae* that damage cucumber, squash, melon and watermelon crops; PRSV-W was also reported as a host of *Momordica balsamina*, *Melothria pendula* and *Coccinia grandis* (Goyal *et al.*, 2012; Tantiwanich *et al.*, 2014). In Jamaica, using DAS-ELISA, it was found that *M. charantia* is a host for PRSV-P (Chin *et al.*, 2007). In addition to reports from other countries, in Mexico there is not a description of PRSV host weeds associated with papaya crops considering that there is about 30% to 100% of incidence of such virus (Hernández-Castro *et al.*, 2015). This research was aimed at determining the presence of PRSV in some virus-host plant weed species associated with papaya commercial crops in Colima, Mexico, using serological and molecular techniques.

fuera de cultivos de papayo infectados con PRSV-P utilizando ELISA y RT-PCR (Mansilla *et al.*, 2013). En Florida, se reportó la presencia de PRSV-W en especies vegetales de la familia Cucurbitaceae, afectando los cultivos de pepino, calabaza, melón y sandía; también se detectó como hospedante de maleza, entre las cuales están *Momordica balsamina*, *Melothria pendula* y *Coccinia grandis* (Goyal *et al.*, 2012; Tantiwanich *et al.*, 2014). En el país de Jamaica se determinó mediante DAS-ELISA que *M. charantia* es una maleza hospedante del PRSV-P (Chin *et al.*, 2007). A pesar de la información reportada en otros países, en México no se tiene una descripción sobre maleza hospedantes del PRSV asociada a cultivos de papayo, considerando que existe cerca de un 30% hasta 100% de incidencia de este virus (Hernández-Castro *et al.*, 2015). El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de PRSV, mediante técnicas serológicas y moleculares, en algunas especies vegetales de maleza hospedantes del virus asociadas a plantaciones comerciales de papayo en Colima, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

El muestreo de plantas de papayo y maleza se realizaron en el estado de Colima, México, en el periodo de marzo a septiembre del 2014 en tres plantaciones ubicadas en las localidades de La Cumbre y Los Asmoles del municipio de Colima y Camino a Chanchopa del municipio de Tecomán. Se muestrearon hojas de varias especies de maleza con síntomas virales en general (mal formación de hoja, clorosis, mosaico y hoja corrugada principalmente).

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

A sampling of papaya plants and weeds was conducted in the state of Colima, Mexico, from March to September 2014, in three plantations at La Cumbre and Los Asmoles, localities from the municipality of Colima, and Camino to Chanchopa from the municipality of Tecomán. Leaves of various weed species showing overall viral symptoms (leaf malformation, chlorosis, mosaic and corrugated leaves) were sampled. Leaves of different papaya plants with PRSV characteristic symptoms were also collected at the same plantations. To identify the gender and species of the collected weeds, dichotomous keys were used according to Fryxell, (1988).

### Serological detection of PRSV

The serological detection of PRSV in all leaf samples was performed using DAS-ELISA and the PhatoScreen® (Agdia) kit. The samples were macerated in an extraction shock-absorber and then 100 µL of raw extract were taken and placed in ELISA plates along with the positive and negative controls provided in the kit. The incubations, the enzyme-substrate conjugate, as well as the corresponding washings were conducted following the manufacturer's instructions, this is, measuring wells at 405 nm. The absorbance value three times higher than that of the absorbance of the negative control was taken as a positive value. Each analysis was carried out in triplicate. Based on those results, a descriptive analysis was performed to determine the percentage of the samples positive to PRSV.

También se colectaron hojas de diferentes plantas de papayo con síntomas característicos de PRSV de las mismas plantaciones. Para la identificación de las maleza colectadas a nivel de género y especie, se utilizaron claves dicotómicas de acuerdo a Fryxell, (1988).

### **Detección serológica de PRSV**

La identificación serológica del PRSV de todas las muestras foliares se llevó a cabo mediante DAS-ELISA, se utilizó el kit PhatoScreen® (Agdia). Las muestras se maceraron en amortiguador de extracción y se tomaron 100 µL del extracto crudo. Se depositaron en placas de ELISA junto con controles positivo y negativo suministrados en el kit. Las incubaciones, el conjugado de la enzima-sustrato, así como los lavados correspondientes con las soluciones amortiguadoras se realizaron según indicaciones del fabricante realizando la lectura de los pozos a 405 nm. Se consideró como un resultado positivo el valor de la absorbancia tres veces más alto comparado con la absorbancia del testigo negativo. Cada análisis se realizó por triplicado. A partir de estos datos se realizó un análisis descriptivo para determinar los porcentajes de muestras positivas a PRSV.

### **Extracción y purificación de RNA**

Para la extracción de RNA viral de PRSV, se pesaron 0.5 g de hojas y se pulverizaron con nitrógeno líquido. Se tomaron 50 mg e inmediatamente se adicionaron 500 µL de TRIZOL® (LifeTechnologies™). La mezcla se homogeneizó y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 100 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante tres min. Esta

### **Extraction and purification of RNA**

To extract PRSV viral RNA, 0.5 g of leaves were weighed and powdered with liquid nitrogen. Fifty mg of powder were immediately dissolved in 500 µL de TRIZOL® (LifeTechnologies™). The mixture was homogenized and incubated for 5 min at room temperature. It was centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C, and the aqueous phase was transferred to a new tube adding 100 µL of chloroform; the mixture was vigorously agitated and incubated at room temperature for 3 min. The mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C. To the aqueous phase recovered, 250 µL of cold isopropyl alcohol were added, and then centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C. The pellet obtained in the previous process was washed in 500 µL of 75% ethanol, dried at room temperature and re-suspended in RNA-free water treated with diethyl dicarbonate. The RNA concentration and purity were verified in a NanoDrop spectrophotometer with an absorbance ratio of 260 and 280 nm, while the RNA integrity was verified in 1% agarose gel electrophoresis with 10 mM sodium borate buffer stained with ethidium bromide.

### **Detection of *Potyvirus* through reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)**

The RNA reverse transcription (RT) was performed with the kit “GoScript™ Reverse Transcription System” (Promega A5001. Madison, WI. USA). The RNA was denatured at 70 °C for 10 min while the RT reaction mixture was prepared; the mixture contained 2 µL of ribonuclease inhibitor (Recombinant RNasin), 8 U of AMV reverse transcriptase (0.32 µL), 0.25 µg of random oligonucleotides (0.5 µL) and 5 µL of

mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 250 µL de alcohol isopropílico frío y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. La pastilla obtenida se lavó en 500 µL de etanol al 75%; se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua libre de RNAasa tratada con dietilpirocarbonato. La concentración y pureza del RNA se verificó en un espectrofotómetro NanoDrop mediante la relación de absorbancias a 260 y 280 nm; mientras que la integridad del mismo se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador borato de sodio 10 mM, teñido con bromuro de etidio.

#### **Detección de *Potyvirus* mediante reverso-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

La reverso transcripción (RT) del RNA se realizó utilizando el kit “GoScript™ Reverse Transcription System” (Promega A5001. Madison, WI. USA). El RNA fue desnaturalizado a 70 °C durante 10 min mientras se preparó la mezcla de reacción RT que contenía 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µL de amortiguador RT 10X, 1 µL de dNTPs 10 mM, 0.25 µL de inhibidor de ribonucleasa (RNasin recombinante), 8 U de transcriptasa reversa AMV (0.32 µL), oligonucleótidos al azar 0.25 µg (0.5 µL) y 5 µL de RNA total (5 ng). La mezcla anterior se incubó a temperatura ambiente 10 min y luego a 48 °C durante 45 min. Inmediatamente después se incubó a 94 °C durante 2 min y finalmente a 5 °C. El DNAc fue amplificado por PCR empleando oligonucleótidos universales para *Potyvirus* descritos por Zheng *et al.* (2010). La mezcla final de reacción para la PCR se realizó en un volumen de 25 µL, la cual consistió de 17.5 µL de agua

total RNA (5 ng). The mixture was incubated at room temperature for 10 min and then at 48 °C for 45 min. Immediately afterward it was incubated at 94 °C for 2 min, and finally at 5 °C. The DNAc was amplified using PCR and universal oligonucleotides for *Potyvirus* as described by Zheng *et al.* (2010). The last reaction mixture for PCR was prepared in a 25 µL volume containing 17.5 µL of MQ water, 2.5 µL of 10X polymerase buffer, 1 µL of MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.5 µL of dNTPs 10 mM, 1 µL of each of the oligonucleotides Nib2F (GTI TGY GTI GAY GAY TTY AAY AA) and Nib3R (TCI ACI ACI GTI GAI GGY TGN CC), 0.5 µL of Taq DNA polymerase (5U/µL) (Invitrogen) and 1 µL of DNAc. The reaction mixture was incubated in a thermocycler under the following conditions: denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 35 denaturation cycles at 95 °C for 45 sec, alignment at 45 °C for 45 sec, extension at 72 °C for 45 sec, and a final extension at 72 °C for 5 min. When the experiment ended, the mixture was kept at 4 °C. 12.5 µL of the PCR product was tested by 1% agarose gel electrophoresis using SB (sodium borate, 10 mM) at 100 V. Finally, the amplification products were visualized using a transilluminator with UV light.

#### **Cloning of PCR products**

The PCR products were purified using the “PCR Clean-up” (Lamda Biotech) kit, but those showing more than one amplified band were purified using agarose gel and the “Rapid Gel Extraction System” kit (Marligen). Later on, the purified fragments were cloned in the commercial vector “pGEM-T Easy” (Promega) and inserted into competent *E. coli* cells JM109 (Promega), according to the methodology of Riley *et al.* (2008).

MQ, 2.5 µL de buffer Taq polimerasa 10X, 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.5 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de cada oligonucleótido Nib2F (GTI TGY GTI GAY GAY TTY AAY AA) y Nib3R (TCI ACI ACI GTI GAI GGY TGN CC), 0.5 µL de Taq DNA polimerasa (5U/µL) (Invitrogen) y 1 µL de DNAc. La mezcla de reacción se incubó en un termociclador con el siguiente programa: desnaturalización de 95 °C por 3 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 45 seg, alineamiento a 45 °C por 45 seg, extensión a 72 °C por 45 seg y una extensión final a 72 °C por 5 min; al término, se mantuvo la temperatura a 4 °C. 12.5 µL del producto de PCR se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer SB (borato de sodio, 10 mM) a 100 V. Finalmente, los productos de la amplificación se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador con luz UV.

### Clonación de productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados empleando el kit “PCR Clean-up” (Lamda Biotech), mientras que aquellos que mostraron más de una banda amplificada, se purificaron a partir del gel de agarosa con el kit “Rapid Gel Extraction System” (Marligen). Posteriormente, los fragmentos purificados se clonaron en el vector comercial “pGEM-T Easy” (Promega), y se introdujeron en células competentes de *E. coli* JM109 (Promega) de acuerdo a la metodología descrita por Riley *et al.* (2008).

### Secuenciación y análisis de las secuencias

La extracción del DNA plasmídico se realizó empelando el kit “Pure Link® Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen) y el plásmido fue secuenciado en un equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer por el método de terminación con el Big Dye de Applied Biosystems. El análisis bioinformático

### Secuencing and secuencing analysis

The extraction of plasmidic DNA was performed using the “Pure Link® Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen) kit; the plasmid was then sequenced in a ABI PRISM 310 Genetic Analyzer by the termination method using Big Dye from Applied Biosystems. The bioinformatics analysis was performed using CLC Genomics Workbench version 4. The similarity of the obtained sequences was compared with the sequences reported for PRSV in the NCBI database using the “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) to determine the origin of the isolates.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Identifying weeds and alternative hosts for PRSV

The genus of the grass-type weed was identified as *Eragrostis spp.* Another group of weeds were identified within the *Herissantia* genus. In this research, all the weed species that gave positive for PRSV were identified according to their morphology and the use of descriptors, according to Fryxell (1988). Papaya plantations showed different phenology and cultural labor to control weeds (Figure 1). The papaya crops at La Cumbre and Chanchopa were being harvested at 13 and 12 months of age, respectively. At La Cumbre there were several papaya plantations that were different ages; the weed samples were collected from a one-month old crop that was at the vegetative development stage. Weeds were managed adequately at the plantations at La Cumbre and Chanchopa, while at the Los Asmoles site there was no weed management; as a result, a great diversity and quantity of weed species

se realizó con el programa CLC Genomics Workbench versión 4; y se comparó la similitud de las secuencias obtenidas contra las reportadas para PRSV en la base de datos de NCBI empleando la herramienta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) para determinar el origen de los aislados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación de maleza y hospederos alternos para PRSV

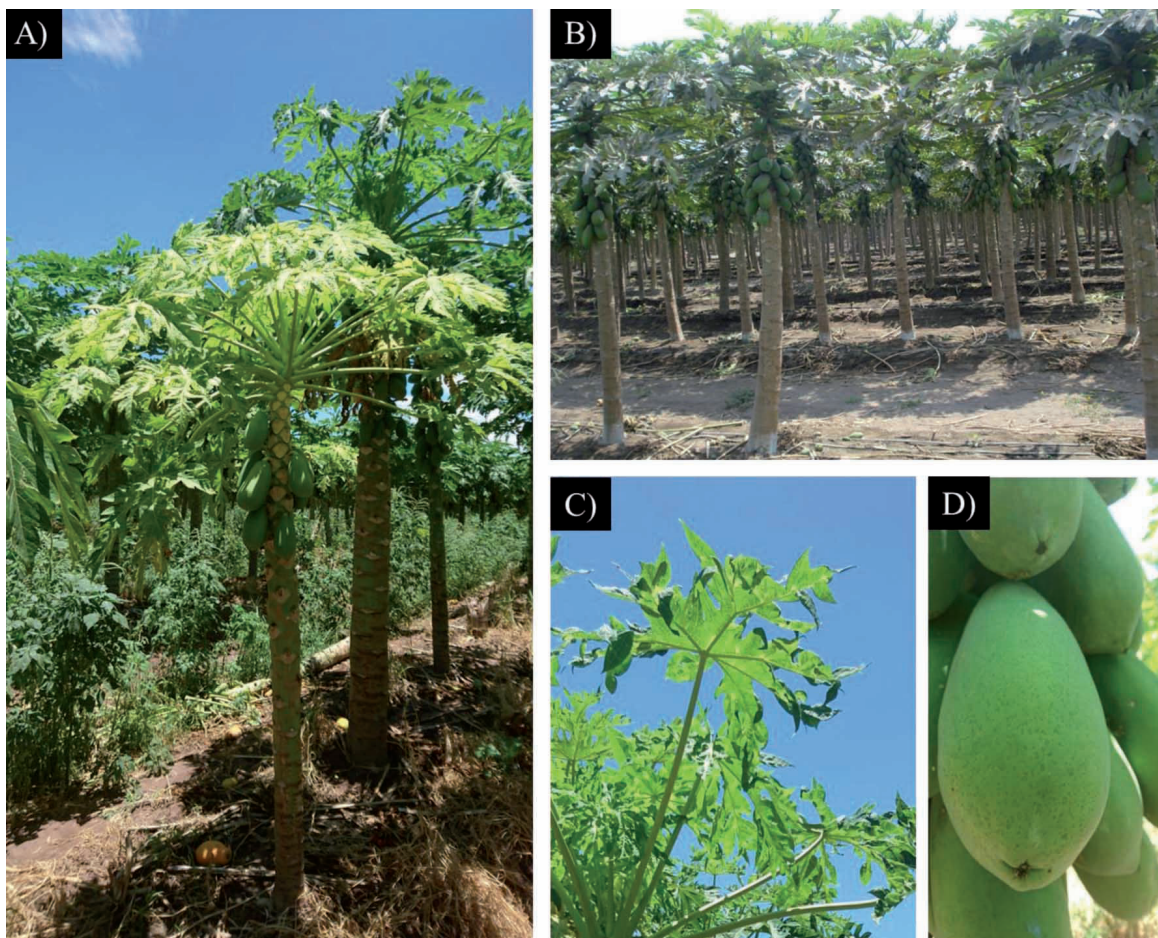
La maleza de tipo pasto fue identificada a nivel de género como *Eragrosis* spp. Otro grupo de plantas arvenses se identificaron dentro del género *Herissantia* spp., en este estudio todas las especies de maleza que dieron positivo al PRSV fueron identificadas con base a su morfología y el uso de los descriptores según Fryxell, (1988). Las plantaciones de papayo presentaron diferente fenología y labores culturales en el control de maleza (Figura 1). Los cultivos de papayo de La Cumbre y Chanchopa se encontraron en plena cosecha de frutos y tenían 13 y 12 meses de edad, respectivamente. En la cumbre, se encontraron varias plantaciones de papayo con diferentes edades; las muestras de maleza se colectaron en una plantación del cultivo en desarrollo vegetativo con un mes de edad. Las plantaciones de La Cumbre y Chanchopa, presentaron un manejo adecuado de la maleza, mientras que el sitio Los Asmoles no tuvo labores de manejo en este sentido, por lo que presentó una gran cantidad y diversidad de especies arvenses. Lo anterior representa un foco de infección para los fitopatógenos, ya que en cultivos abandonados o con nulo manejo de maleza son más recurrentes las infecciones virales mixtas (Bermúdez-Guzmán *et al.*, 2016). En algunos casos la presencia de maleza es intercalada en el cultivo a manera de cultivos

sprang up there. This condition represents a source of infection for phytopathogens, because when crops are abandoned, or there are no weed management practices, mixed viral infections become increasingly frequent (Bermúdez-Guzmán *et al.*, 2016). In some cases, weeds are interspersed with plants in the form of tramp crops. However, it is very important to ensure that such weeds are not virus hosts that attract possible vectors like aphids that contribute to the rapid spread of the virus (Kalleshwaraswamy and Kumar, 2008). Overall, the sampled papaya plants showed mosaic, leaf deformation, oily stains in the stem and ring-like spots in fruit, all of them characteristic symptoms of PRSV (Figure 1). The symptoms observed in the field were similar to those reported in papaya plants in several states of Mexico, as well as in Hawaii, Florida, Taiwan and Thailand, to name a few (Noa-Carranza *et al.*, 2006; Tripathi *et al.*, 2008).

Martins *et al.* (2016) recently collected in Brazil aphid vectors present in 22 weed species in papaya plantations, most of them belonging to the *Euphorbiaceae*, *Commelinaceae*, *Brassicaceae* and *Malvaceae* families. They also identified one Solanaceae species: *Solanum americanum*. Chin *et al.* (2007) reported that *Momordica charantia* is a PRSV-P carrier; however, Spadotti *et al.* (2013), after evaluating it through mechanical inoculation and aphid vectors, stated that *Momordica charantia* is not susceptible to any of the PRSV strains (P and W). In this research, we found a *M. charantia* specimen from Los Asmoles that appeared healthy and gave negative DAS-ELISA and RT-PCR test results. However, in the future it would be useful to analyze a greater number of samples of this species to determine if *M. charantia* can act as a reservoir of the virus.

The expression of the multiple viral symptoms in weeds associated with papaya crop in three localities in Colima is shown in Figure 2. The weed





**Figura 1.** A) Síntomas de PRSV en plantación de papayo mostrando la abundancia de maleza intercalada, B) Plantación con control total de maleza, C) Hojas distorsionadas de papaya con síntomas de clorosis y mosaico, D) Frutos con anillos característicos de PRSV.

**Figure 1.** A) Symptoms of PRSV in a papaya plantation where there are abundant interspersed weeds; B) Plantation with full control of weeds; C) Distorted leaves of papaya with chlorosis and mosaic symptoms; D) Fruit with characteristic rings caused by PRSV.

trampa, sin embargo será de gran importancia identificar que estos no sean hospederos de virus y funcionen como atrayentes de posibles vectores como los áfidos que contribuye a la rápida propagación del virus (Kalleshwaraswamy y Kumar, 2008). En general, las plantas de papayo que se muestrearon, presentaron síntomas de mosaico y deformación de hojas, manchas aceitosas en tallos y manchas anulares en frutos, todos ellos característicos del PRSV

samples that developed symptoms account for 72% of the total sampling, except for *Eragrosis* spp. and *Herissantia* spp. Mosaics were observed in plants identified as abutilon (*Abutilon abutilastrum*), spurred anoda (*Anoda cristata*) and buffalobur nightshade (*Solanum rostratum*). The latter species also developed leaf distortion and chlorosis, the same as summer squash (*Cucurbita pepo*), whose leaf deformation was quite severe. On the other

(Figura 1). Estos síntomas observados en campo son similares a los reportados en plantas de papayo en varios estados de México y otros países como Hawaii, Florida, Taiwan y Tailandia, entre otros (Noa-Carranza *et al.*, 2006; Tripathi *et al.*, 2008).

Recientemente, Martins *et al.* (2016), colectaron en Brasil áfidos vectores presentes en 22 especies arvenses de plantaciones de papayo, la mayoría pertenecientes a las familias Euphorbiaceae, Commelinaceae, Brassicaceae y Malvaceae, también se identificó una Solanaceae: *Solanum americanum*. Chin *et al.* (2007) reportaron a *Momordica charantia* como portadora de PRSV-P, sin embargo, Spadotti *et al.* (2013) determinaron que ésta especie no es susceptible a ninguna de las cepas de PRSV (P y W), tras evaluar su inoculación mecánica y mediante áfidos vectores en la especie antes mencionada. En este estudio se encontró un ejemplar de *M. charantia* proveniente de Los Asmoles, el cual tuvo una apariencia sana y presentó un resultado negativo a PRSV por DAS-ELISA y RT-PCR, sin embargo, resulta conveniente analizar en un futuro un mayor número de muestras de esta especie para determinar si puede actuar como reservorio del virus.

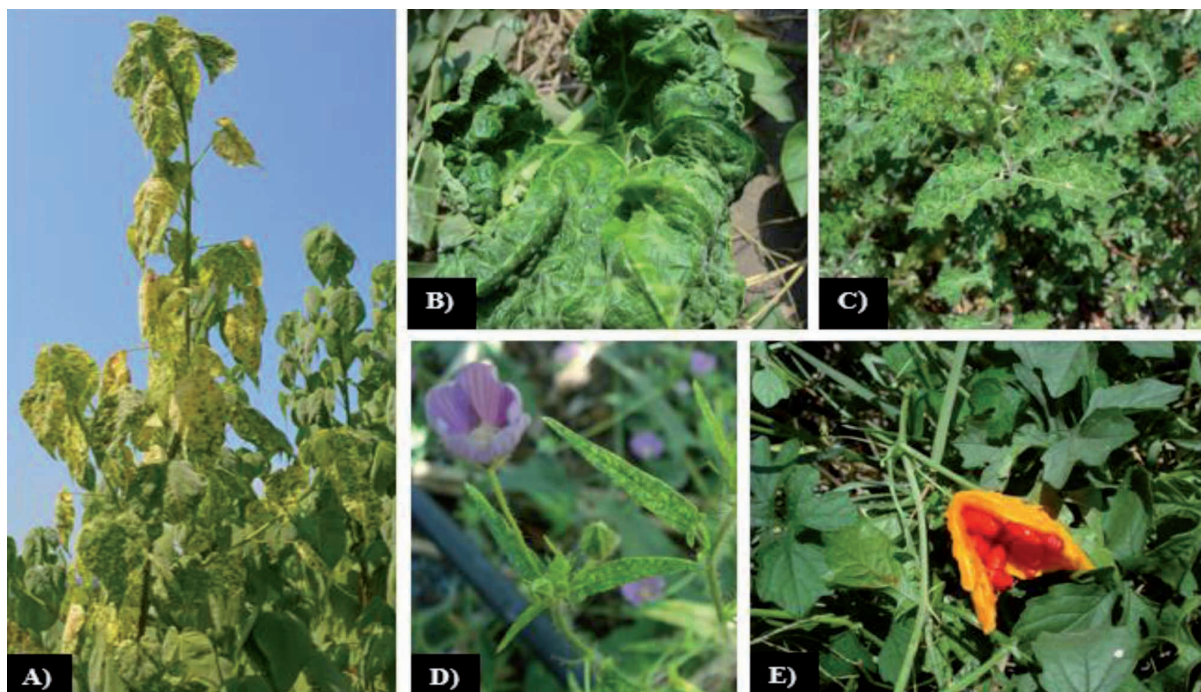
La expresión de la diversidad de síntomas virales en maleza asociada al cultivo del papayo en tres localidades de Colima se muestra en la Figura 2. Las muestras de maleza que presentaron síntomas representa un 72.6% del total muestreado, exceptuando las especies de *Eragrosis* spp. y *Herissantia* spp. Se observaron mosaicos en plantas identificadas como abutilón (*Abutilon abutilastrum*), violeta de campo (*Anoda cristata*) y mala mujer (*Solanum rostratum*). Esta última especie también presentó distorsión de la hoja y clorosis, al igual que la calabacilla (*Cucurbita pepo*), cuya deformación de hoja fue muy severa. Por otra parte, se encontró un ejemplar asintomático de *Momordica charantia* en la localidad de Los Asmoles, la cual está reportada

hand, an asymptomatic specimen of *Momordica charantia* was found in Los Asmoles, which has been reported as host for several viruses; *C. pepo*, *S. rostratum* and *A. cristata* are susceptible to 62, 8 and 1 viruses, respectively; for the *Abutilon* genus, five viral phytopathogens have been reported (Brunt *et al.*, 1996). When weeds serve as a reservoir of a large number of viruses, this often means that the symptoms observed are the result of the synergic expression of a mixture of viral infections (Zhang *et al.*, 2001; Hii *et al.*, 2002; Gastélum *et al.*, 2007; Bermúdez-Guzmán *et al.*, 2016).

### Detection of PRSV

Data on the detection of PRSV through DAS-ELISA and RT-PCR in plants of *C. papaya* and weeds associated with the crop from three Colima sites are shown in Table 1. From the 130 collected samples, 57 collected at La Cumbre were analyzed using DAS-ELISA and gave positive to PRSV in *C. papaya* and *C. pepo*. This result may be explained by the fact that the analyzed samples did not reach the minimum viral concentration since, according to reports, the DAS-ELISA technique does not detect virus in plants if its concentration level is less than 0.1 ng of virus per mL (Salazar, 1996). In this study, up to 50% of positive samples was reported by DAS-ELISA, a percentage highly significant and different from the percentage obtained by Hernández de la Cruz *et al.* (2007), who detected 2.43% of PVY<sup>NTN</sup> in potato tubers using the DAS-ELISA technique.

The BLASTn analysis of the 13 sequences obtained in the present research that correspond to the NIB region of PRSV allowed for the first time the identification of *A. abutilastrum*, *A. cristata* and *S. rostratum* as new natural host species for PRSV. Isolated sequences of *C. papaya* and *C. pepo* were also included, but they have been



**Figura 2.** Diversidad de maleza localizada en tres plantaciones de papayo con síntomas virales. A) *A. abutilastrum* con mosaicos en hojas. B) *C. pepo* con deformación severa de hoja C) *S. rostratum* con mosaicos y clorosis. D) *A. cristata* con mosaicos en hojas. E) *Momordica charantia* asintomática.

**Figure 2.** Diverse weeds in three papaya plantations with viral symptoms. A) *A. abutilastrum* with mosaics in leaves. B) *C. pepo* with severe deformation of leaves. C) *S. rostratum* with mosaics and chlorosis. D) *A. cristata* with mosaic in leaves. E) *Momordica charantia* asymptomatic.

como hospedera de varios virus, mientras que *C. pepo*, *S. rostratum* y *A. cristata* son susceptibles a 62, 8 y 1 virus, respectivamente, así como para el género *Abutilon* se reportan cinco fitopatógenos virales (Brunt *et al.*, 1996). Esta condición en que la maleza sirve como reservorio de una gran cantidad de virus ocasiona frecuentemente que los síntomas observados sean producto de la expresión sinérgica de infecciones virales mixtas (Zhang *et al.*, 2001; Hii *et al.*, 2002; Gastélum *et al.*, 2007; Bermúdez-Guzmán *et al.*, 2016).

### DetECCIÓN DE PRSV

La detección de PRSV mediante DAS-ELISA y RT-PCR en plantas de *C. papaya* y maleza asociada

extensamente reportada como hospedera de PRSV (Noa-Carranza *et al.*, 2006; Sreenivasulu and Sai-Gopal, 2010; Goyal *et al.*, 2012; Mansilla *et al.*, 2013). Phylogenetics (Figure 3) was useful to identify three similar sequence groups. A clear grouping is seen according to the plantation zone; for example, it was observed that sample 11 and 12 corresponding to *C. pepo* and *A. abutilastrum*, respectively, was the same as the one found in *C. papaya* corresponding to sequences 9 and 8 from Los Asmoles. This finding clearly confirms that the weed transmits the same virus to papaya plants. Another major finding was the diverse sequences identified for the Colima zone which are markedly different from other isolates, even from the one reported for Veracruz (AY231130) with 92%

al cultivo procedentes de tres localidades de Colima son mostrados en el Cuadro 1. De las 139 muestras colectadas se analizaron por DAS-ELISA 57 de ellas, provenientes de la localidad de La Cumbre, y resultaron positivas para PRSV *C. papaya* y *C. pepo*. Lo anterior puede atribuirse a que las muestras analizadas no alcanzaron la concentración mínima viral, ya que está reportado que la técnica de DAS-ELISA no detecta virus en plantas si su concentración es menor de 0.1 ng de virus por mL (Salazar, 1996). En el presente estudio se reportó hasta un 50% de muestras positivas por DAS-ELISA; porcentaje significativamente elevado a diferencia del obtenido por Hernández de la Cruz *et al.* (2007) quienes detectaron el 2.43% de PVY<sup>NTN</sup> en tubérculos de papa por DAS-ELISA.

El análisis de BLASTn de 13 secuencias generadas en el presente trabajo correspondientes a la región Nib de PRSV permitió identificar por primera vez a *A. abutilastrum*, *A. cristata* y *S. rostratum* como nuevas especies hospedantes naturales

homology. Such diversity of PRSV isolates has been observed in regions of China due to the high mutation rate of the virus (Zhao *et al.*, 2016), which makes difficult to implement control strategies. As expected, other Potyvirus such as: *Japanese yam mosaic potyvirus* (JYMV), *Potato virus Y* (PVY), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) and *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV) were located farther away in the dendrogram with 70 to 73% identity in the sequence.

28.15% of papaya plants analyzed in this research developed viral symptoms but they gave negative to PRSV when tested using RT-PCR. This may be due to the fact that *C. papaya* is susceptible to more than eight phytopathogen viruses such as *Papaya apical necrosis virus* (PANV), *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), *Papaya Mosaic Virus* (PMV), *Papaya leaf distortion mosaic virus* (PLDMV), among others (Lastra and Quintero, 1981; Brunt *et al.*, 1996), so it may be that the viral symptom may be caused by some of those viruses.

**Cuadro 1. Detección por métodos serológicos y moleculares de PRSV en maleza asociada al cultivo de papayo en tres localidades de Colima, México.**

**Table 1. Detection of PRSV in weeds associated with papaya crop in three sites in Colima Mexico, using serological and molecular methods.**

Localidad	Muestras colectadas	Especie	Familia	Positivas a PRSV (%)	
				DAS-ELISA	RT-PCR
La Cumbre	57	<i>C. papaya</i>	Caricaceae	40	40
		<i>A. cristata</i>	Malvaceae	0	21
		<i>C. pepo</i>	Cucurbitaceae	50	54
		<i>Eragrosis spp.</i>	Poaceae	0	0
		<i>S. rostratum</i>	Solanaceae	0	18
Los Asmoles	35	<i>C. papaya</i>	Caricaceae	40	90
		<i>A. abutilastrum</i>	Malvaceae	0	28
		<i>C. pepo</i>	Cucurbitaceae	50	80
		<i>M. charantia</i>	Cucurbitaceae	0	0
		<i>S. rostratum</i>	Solanaceae	20	33
Chanchopa	47	<i>C. papaya</i>	Caricaceae	40	75
		<i>C. pepo</i>	Cucurbitaceae	0	0
		<i>Herissantia spp.</i>	Malvaceae	0	0

de PRSV. Además, también se incluyeron secuencias aisladas de *C. papaya* y *C. pepo*, aunque estas ya están ampliamente reportadas como hospederas de PRSV (Noa-Carranza *et al.*, 2006; Sreenivasulu y Sai-Gopal, 2010; Goyal *et al.*, 2012; Mansilla *et al.*, 2013). La filogenia (Figura 3) permitió identificar tres grupos de secuencias similares. Se observa una clara agrupación de acuerdo a la zona de plantación, en las que se observó la muestra 11 y 12 correspondiente a *C. pepo* y *A. abutilastrum* respectivamente fue la misma que la encontrada en *C. papaya* correspondiente a la secuencia 9 y 8 perteneciente a Los Asmoles. Este hallazgo confirma de manera clara que la maleza aporta el mismo virus a

## CONCLUSIONS

The DAS-ELISA technique allowed the detection of *Papaya ringspot virus* (PRSV) in *C. papaya* and any other weed present in papaya crops. However, the number of positive samples was underestimated when they were compared using RT-PCR. This technique was useful to identify the presence of PRSV in weed species associated with papaya crop, such as *A. abutilastrum*, *A. cristata*, *C. pepo* and *S. rostratum*. PRSV was not detected in *M. charantia*. This research reports for the first time that *A. abutilastrum* and *A. cristata*, belonging to the Malvaceae family, and *S. rostratum* belonging

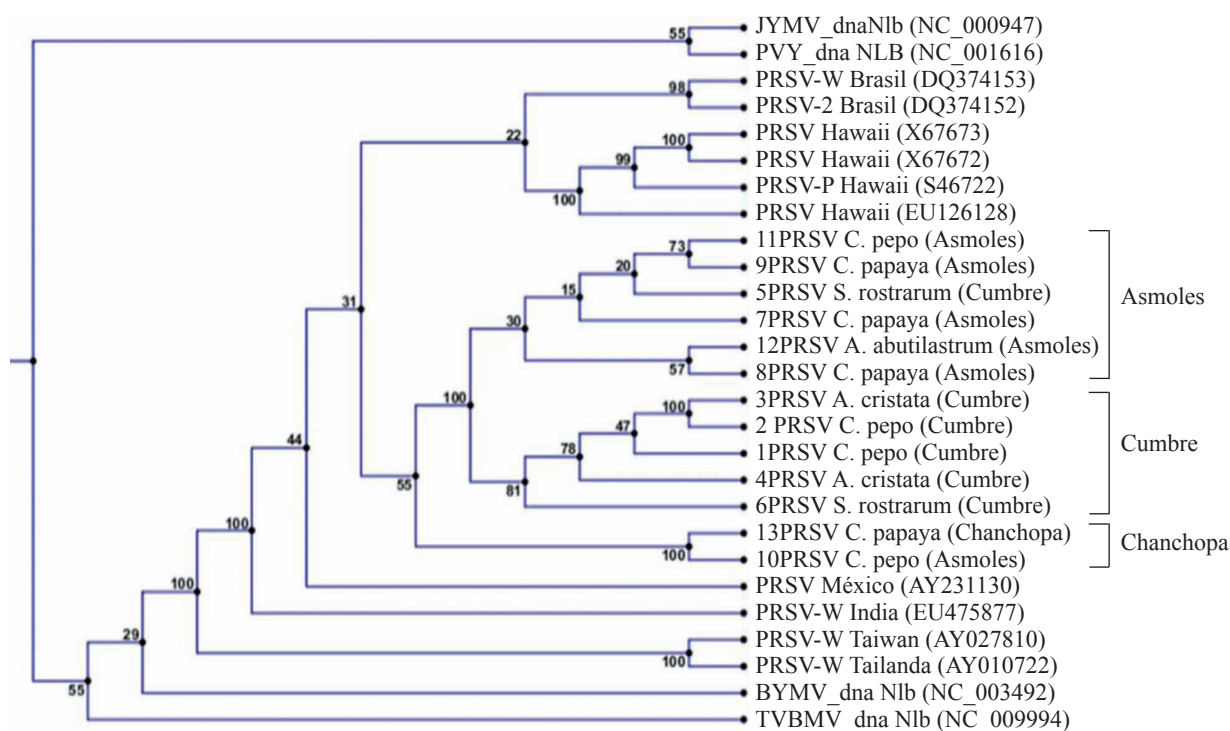


Figura 3. Filogenia generada a partir de la similitud de secuencias de la región Nib del genoma de *Papaya ringspot virus* (PRSV) de aislados de Colima, México (1-13) comparadas con aislamientos de Brasil, Hawái, India, Taiwán, Tailandia y otros Potivirus: *Japanese yam mosaic potyvirus* (JYMV), *Potato virus Y* (PVY), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV).

Figure 3. Phylogeny based on the similarity of the sequences of the Nib region of the *Papaya ringspot virus* (PRSV) genome from isolates collected in Colima, Mexico (1-13) and compared with isolates from Brazil, Hawaii, India, Thailand, and other Potivirus: *Japanese yam mosaic potyvirus* (JYMV), *Potato virus Y* (PVY), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV).

las plantas de papayo. Otra observación importante fue la diversidad en secuencias que se encontraron para la zona de Colima que diferencia claramente con otros aislados incluso con el reportado para Veracruz (AY231130) con un 92% de homología. Esta diversidad en aislados de PRSV se ha observado para regiones de China, debido a la alta tasa de mutación del virus (Zhao *et al.*, 2016), lo que complica las estrategias de control para este virus. Como era de esperarse, otros Potyvirus como: *Japanese yam mosaic potyvirus* (JYMV), *Potato virus Y* (PVY), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV) fueron los más alejados en el dendrograma con un porcentaje de identidad en la secuencia del 70 al 73%.

El 28.15% plantas de papayo analizadas en este estudio presentaron sintomatología viral, pero resultaron negativas a PRSV mediante RT-PCR. Lo anterior puede deberse a que *C. papaya*, es susceptible a más de ocho virus fitopatógenos entre los que destacan *Papaya apical necrosis virus* (PANV), *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), *Papaya Mosaic Virus* (PMV), *Papaya leaf distortion mosaic virus* (PLDMV), entre otros (Lastra y Quintero, 1981; Brunt *et al.*, 1996), por lo que muy probablemente el síntoma viral presentado, podría corresponder a la infección por alguno de estos virus.

## CONCLUSIONES

La técnica de DAS-ELISA permitió la detección del *Papaya ringspot virus* (PRSV) en *C. papaya* y alguna maleza presente en el cultivo sin embargo se subestimó el número de muestras positivas al comparar con la técnica de RT-PCR. La técnica molecular de RT-PCR permitió identificar la presencia de PRSV en las especies de arvenses asociadas al cultivo de papayo como *A. abutilastrum*, *A. cristata*, *C. pepo* y *S. rostratum*. No se detectó

to the Solanaceae family, are host weed species for PRSV.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

la presencia de PRSV en *M. charantia*. El presente trabajo reporta por primera vez a *A. abutilastrum* y *A. cristata* pertenecientes a la familia Malvaceae y *S. rostratum* de la familia Solanaceae como especies arvenses hospederas de PRSV.

## LITERATURA CITADA

- Abreu PMV, Antunes TFS, Magaña-Álvarez A, Pérez-Brito D, Tapia-Tussell R, Ventura JA, Fernandes AAR and Fernandes PMB. 2015. A current overview of the *Papaya meleira virus*, an unusual plant virus. *Viruses* 7: 1853-1870. <http://dx.doi.org/10.3390/v7041853>
- Bermúdez-Guzmán MJ, García-Mariscal KP, Orozco-Santos M, Guzmán-González S, Velázquez-Monreal JJ, García-Preciado JC, Cervantes-Preciado JF y Álvarez-Cilva M. 2016. Enfermedades ocasionadas por virus en caña de azúcar en el Occidente de México. Campo Experimental Tecomán, INIFAP. Folleto técnico No. 13. Tecomán, Col., México. 27p. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.15748.73605>
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L and Zurcher EJ. 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 16th January 1997. Disponible en línea: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Chin M, Ahmad MH and Tennant P. 2007. *Momordica charantia* is a weed host reservoir for *Papaya ringspot virus* Type P in Jamaica. *Plant Disease*. 91: 1518. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-11-1518A>
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselbelguer U and Ball LA. 2005. Virus taxonomy: the eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1st Edition. Academic Press Elsevier. Amsterdam, Holanda. 1162p. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-6607-9>
- Fryxell, P. A. Malvaceae of Mexico. *Syst. Bot. Monogr.* 25: 1-522. 1988. Disponible en línea: <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Flora%2016.pdf>
- Gastélum RB, Magallanes-Tapia MA, Méndez-Lozano J, Huet H, Trigueros-Salmerón JA y Longoria-Espinosa RM. 2007. Detección del *virus mosaico amarillo de la calabaza zucchini* (ZYMV) y su coinfección con otros virus en cucurbitáceas cultivadas y plantas silvestres en el valle del fuerte, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25:95-101. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61225201.pdf>

- Goyal G, Gill HK and McSorley R. 2012. Common weed hosts of insect-transmitted viruses of Florida vegetable crops. Disponible en línea: <http://edis.ifas.ufl.edu/in931>
- Hernández-Castro E, Villanueva-Jiménez JA, Mosqueda-Vázquez R y Mora-Aguilera JA. 2004. Efecto de la erradicación de plantas enfermas por el PRSV-P en un sistema de manejo integrado del papayo (*Carica papaya* L.) en Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 382-388. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222311>
- Hernández-Castro E, Damian-Nava A, Mora-Aguilera A, Villanueva-Jimenez JA, Vargas-Álvarez D and Palemón-Alberto F. 2015. Incidence of the Papaya Ringspot Virus (PRSV-p) and Management in the State of Guerrero, Mexico. Pp:119-127 *In*: S. Dimitrov Todorov and I. Vitanova Ivanova (eds.) *Tropical Fruits*. Chapter 7. Nova Science Publishers, Inc. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.3437.5203>
- Hernández de la Cruz M, Gómez-Leyva JF, López-Muraira IG, Dimas-Estrada MS, Andrade-González I y Ireta-Moreno J. 2007. Detección serológica y molecular del virus PVYN y su variante PVYN<sup>NTN</sup> en papa (*Solanum tuberosum* L.) y hospedantes alternos en Tapalpa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25: 167-172. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61225211.pdf>
- Hii G, Pennington R, Hartson S, Taylor CD, Lartey R, Williams A, Lewis D and Melcher U. 2002. Isolate-specific synergy in disease symptoms between cauliflower mosaic and turnip vein-clearing viruses. *Archives Virology* 147: 1371-1384. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-002-0812-8>
- Kalleshwaraswamy CM and Kumar NK. 2008. Transmission efficiency of *Papaya ringspot virus* by three aphid species. *Phytopathology*. 98: 541-546. Disponible en línea: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-98-5-0541>
- Lastra R and Quintero E. 1981. Papaya apical necrosis, new diseases associated with a *Rhabdovirus*. *Plant Disease* 65: 439-440. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-65-439>
- Mansilla PJ, Moreira AG, Mello APOA, Rezende JAM, Ventura JA, Yuki VA and Levatti FJ. 2013. Importance of cucurbits in the epidemiology of *Papaya ringspot virus* type P. *Plant Pathology* 62: 571-577. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02677.x>
- Martins DS, Ventura JA, Paula RCAL, Fornazier, MJ, Rezende, JAM, Culik MP, Ferreira PSF, Peronti ALBG, Carvalho RCZ and Sousa-Silva CR. 2016. Aphid vectors of *Papaya ringspot virus* and their weed host in orchards in the major papaya producing and exporting region of Brazil. *Crop Protection* 90: 191-196. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.08.030>
- Navanath MD, Anitha P, Gahukar SJ, Akhare AA. 2017. Biological indexing of *Papaya ring spot virus* (PRSV) in *Carica papaya*. *International Journal of Agriculture* 9: 3728-3730. Disponible en línea: [https://bioinfopublication.org/files/articles/9\\_4\\_7\\_IJAS.pdf](https://bioinfopublication.org/files/articles/9_4_7_IJAS.pdf)
- Noa-Carranza JC, González de León D, Ruiz-Castro BS, Piñero D and Silva-Rosales L. 2006. Distribution of *Papaya ringspot virus* and *Papaya mosaic virus* in papaya plants (*Carica papaya*) in Mexico. *Plant Disease*. 90: 1004-1011. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1004>
- Riley SP, Woodman ME and Stevenson B. 2008. Culture of *Escherichia coli* and related bacteria. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Wiley. U 4.2.168p. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0402s00>
- Salazar LF. 1996. Potato viruses and their control. 1st Edition. International Potato Center (CIP). Lima, Perú. 214p. Disponible en línea: <https://cipotato.org/publications/potato-viruses-and-their-control/>
- SIAP 2016. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en línea: [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index)
- Spadotti DMA, Buriolla JE, Rezende JAM and Souza VC. 2013. The wild type of *Momordica charantia* is not infected by potyviruses that cause disease in papaya and cucurbit crops. *Tropical Plant Pathology* 38: 447-451. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762013005000029>
- Sreenivasulu M and Sai-Gopal DVR. 2010. Development of recombinant coat protein antibody based IC-RT-PCR and comparison of its sensitivity with other immunoassays for the detection of *Papaya ringspot virus* isolates from India. *The Plant Pathology Journal*. 26: 25-31. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.2010.26.1.025>
- Tantiwanich Y, Baker CA, Turechek WW and Adkins S. 2014. Detection of *Papaya ringspot virus* type W infecting the cucurbit weed *Cucumis melo* var. *dudaim* in Florida. *Plant Health Progress* 15: 29-30. <http://dx.doi.org/10.1094/PHP-BR-13-0126>
- Tripathi S, Suzuki JY, Ferreira SA and Gonsalves D. 2008. *Papaya ringspot virus*-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Molecular Plant Pathology*. 9: 269-280. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00467.x>
- Zhao H, Zong RJ, Zhang YL, Zhu YJ, Zeng HC, Kong H, McCafferty H, Guo AP, and Peng M. 2016. Geographical and Genetic Divergence Among *Papaya ringspot virus* Populations Within Hainan Province, China. *Virology* 106: 937-944. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-15-0111-R>
- Zhang XS, Holt J and Colvin J. 2001. Synergism between plant viruses: a mathematical analysis of the epidemiological implications. *Plant Pathology* 50: 732-746. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00613.x>
- Zheng L, Rodoni BC, Gibbs MJ and Gibbs AJ. 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathology*. 59: 211-220. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x>