

Estrategias para la obtención de plantas transgénicas de papaya con resistencia al *Virus de la mancha anular de la papaya* (PRSV)

Maylin Cruz^{1*}, Orelvis Portal² *Autor para correspondencia

¹ Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera a Maleza km 2.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: lpsvvc@enet.cu

² Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

RESUMEN

La producción de papaya (*Carica papaya* L.) cada día cobra mayor importancia económica a nivel mundial debido a que se puede consumir como fruta fresca o procesarse para obtener otros productos en el área farmacéutica, culinaria, médica, industria cervecera y bebidas no alcohólicas. Sin embargo, la agricultura se enfrenta a las serias dificultades que supone el control de los virus que constituyen un importante grupo de organismos patógenos para este cultivo. La obtención de resistencia al *Virus de la mancha anular de la papaya* constituye un área de interés creciente pues las principales variedades comerciales de papaya son susceptibles a esta enfermedad. Con este objetivo, la Ingeniería Genética ha generado importantes resultados y al mismo tiempo, ha introducido elementos nuevos en el planteamiento estratégico global del control. Este trabajo resume las principales estrategias utilizadas para la obtención de resistencia al *Virus de la mancha anular de la papaya* durante las últimas dos décadas.

Palabras clave: PRSV, transformación genética

ABSTRACT

The papaya production acquires major economic importance all over the world every day. It is consumed as fresh fruit or processed to obtain other products in the pharmaceutical, cooking, and medical industries and in the brewing industry to obtain nonalcoholic drinks. Currently, Agricultural Science faces serious problems such as plant virus control, which form an important group of pathogenic organisms. To obtain resistance to the *Papaya ringspot virus* is an increasing interest area because main commercial varieties of papaya are susceptible to this disease. Genetic engineering has achieved important results aimed to solve this problem introducing new elements at the global strategic control. Our work summarizes the main strategies used to obtain resistance to *Papaya ringspot virus* during the last two decades.

Keywords: Genetic transformation, PRSV

Contenido

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES DEL CULTIVO DE LA PAPAYA

Características botánicas

Origen y distribución

Comercio

IMPORTANCIA ECONÓMICA

EFFECTOS DEL PRSV

ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DEL PRSV

Métodos convencionales

Resistencia derivada del patógeno

Transformación de papaya con el gen de la CP

Expresión del gen de la proteína de la cápsida

Silenciamiento postranscripcional de genes

La papaya (*Carica papaya* L.) es miembro de una pequeña familia de dicotiledóneas de porte

herbáceo. Dentro del género *Carica*, la papaya es la única especie con importancia económica

(Hautea *et al.*, 1999). En Cuba, se le conoce desde épocas muy remotas, pero adquiere importancia en las décadas del 30 y 40 del siglo XX (Roig y Mesa, 1988).

Los virus de plantas constituyen un importante grupo de organismos patógenos. Los problemas asociados a virosis, dada su capacidad de afectar a cultivos de interés agrícola y las serias dificultades que existen para su control, son uno de los principales retos a los que se enfrenta la agricultura.

Las principales variedades comerciales de papaya son susceptibles a numerosas enfermedades virales, entre ellas, el *Virus de la mancha anular de la papaya* (PRSV), está considerada como la principal causa de la poca duración de las plantaciones e incremento del costo de las producciones debido al uso de agroquímicos para su manejo.

La identificación y creación de resistencia a las principales virosis que afectan las plantas cultivadas y el estudio de los mecanismos mediante las que estas operan, constituyen un área de interés creciente en las Ciencias Agrarias. Probablemente el avance en la eficiencia de la lucha química contra otros patógenos de plantas, no es ajeno a una nueva situación, en la que los virus, antes considerados patógenos menores, adquieren una importancia cada vez mayor. No existe algo parecido a un 'viricida' con el que combatir con éxito las infecciones virales en las plantas, lo cual es un incentivo adicional para el trabajo en la búsqueda de fuentes y mecanismos de resistencia.

La obtención de resistencia artificial a virus de plantas mediante el empleo de la Ingeniería Genética ha derivado en importantes resultados, lo cual ha aumentado significativamente las expectativas de éxito en la lucha contra las virosis y, al mismo tiempo, ha introducido elementos nuevos en el planteamiento estratégico global de control, tales como consideraciones medioambientales, e incluso de salud pública.

La obtención de plantas transgénicas portadoras de caracteres agronómicos que les confieran un alto valor añadido constituye, sin dudas, una de las áreas de mayor actividad científica. El carácter de resistencia a

enfermedades virales no podía ser la excepción. Ya se ha obtenido resistencia a una larga lista de virus mediante el uso de diferentes estrategias.

Este trabajo persiguió como objetivo abordar los principales avances que se han alcanzado en la obtención de variedades de papaya con resistencia al *Virus de la mancha anular de la papaya* en las últimas dos décadas.

GENERALIDADES DEL CULTIVO DE LA PAPAYA

Características botánicas

La papaya es miembro de la familia *Caricaceae*, una pequeña familia de dicotiledóneas consistente en cinco géneros de plantas herbáceas. *Carica* es el mayor género de esta familia con 21 especies distribuidas en la zona subtropical desde el sur de México hasta Argentina y Chile.

El desarrollo de la papaya es rápido y su vida es de aproximadamente dos años, aunque puede vivir hasta 20. Presenta un solo tallo de crecimiento erecto que termina en un manojo de hojas, que puede medir entre 2 y 10 m de altura. Además, el tallo es cilíndrico, suave (esponjoso-fibroso), jugoso, de color gris a café grisáceo, de 10 a 30 cm de diámetro y endurecido por la presencia de cicatrices grandes y prominentes. Las flores se producen en las axilas de los peciolo de las hojas. Las plantas son polígamas, con flores masculinas, femeninas o hermafroditas. Predominan las plantas dioicas, que junto a las hermafroditas son las deseables en las plantaciones. Su crecimiento es rápido (puede crecer 12 pulgadas en un año) y produce frutos maduros entre los 9 y 12 meses de plantadas las semillas. Comercialmente, se plantan entre 1 500 y 2 500 plantas por ha, con una producción anual de 56 700 a 136 000 kg.ha⁻¹. Los frutos se cosecharon por uno a dos años; después, los plantas dejan de ser económicamente rentables (Gonsalves, 1998).

Origen y distribución

La papaya es una planta propia de la América tropical (Reyes, 1983), su origen se ha situado en varios países de esta región (Muñoz, 1983;

Wei y Wing, 2008). La descripción más antigua de esta especie es la del cronista Oviedo en 1535, señalando su origen en la región de Panamá (Muñoz, 1983). El cultivo de la papaya se ha distribuido ampliamente a lo largo de trópicos y subtropicos (Davis, 1996; Wei y Wing, 2008). Se supone que sus semillas se distribuyeron por el Caribe y sureste Asiático durante las exploraciones en el Siglo XVI, y luego se extendió rápidamente a India, el Pacífico y África (Villegas, 1997). Generalmente, no se considera que la papaya sea un cultivo invasivo en ninguna región del mundo (OECD, 2003), no obstante, existen evidencias que en regiones de las Islas Marianas, la papaya puede conformar hábitats desordenados (Space *et al.*, 2000). No se conoce con precisión el momento en que este cultivo fue introducido a Cuba; se piensa que haya sido por los españoles en la etapa colonial (Peña *et al.*, 1996).

Comercio

Brasil, México, India, Nigeria e Indonesia han sido de forma consistente los mayores productores durante los últimos años, con cerca del 70% de la producción mundial. En el año 2006 se alcanzaron valores superiores a los 6 500 000 t, de las cuales Brasil aportó el 24%, México, India y Nigeria el 12% cada uno, Indonesia el 8%, Etiopía el 4%, República Democrática del Congo el 3% y otros 47 países el 25%. El principal exportador es México, seguido por Brasil, Estados Unidos de América y Malasia (FAO, 2006).

La producción de papaya en Cuba, comparada con otros países es pequeña, pero su cultivo se ha fomentado notablemente en los últimos años debido a la importancia y el valor en el mercado internacional, con producciones de 119 000 t en 2004 y un descenso durante el período de 2005 al 2007, con 91 797, 90 309 y 92 000 t respectivamente. Los rendimientos alcanzados durante el 2005 fueron de 15.56 tha^{-1} , en el 2006 y 2007 se incrementaron a 20.16 y 20.44 tha^{-1} (FAO, 2008); no obstante, estos valores se encuentran muy inferiores a los esperados.

Los principales mercados de consumo por lo general están dominados por un sólo proveedor. Estados Unidos recibe la mayor parte de sus importaciones de México; en Europa el principal proveedor es Brasil y en

Japón los Estados Unidos de América por medio de su producción en Hawai (FAO, 2004).

IMPORTANCIA ECONÓMICA

Las exportaciones mundiales del cultivo de papaya son una muestra de su importancia para las economías de muchos países subdesarrollados. Su alto rendimiento, valor nutritivo y por ser además, uno de los pocos frutales de producción continua durante todo el año, lo convierten en una de las joyas de los frutos tropicales. Es muy consumida de forma fresca, en bebidas, dulces, como fruta deshidratada y sus frutos verdes se emplean en ensaladas (Villegas, 1997; Gonsalves *et al.*, 2007). Sus frutos son altamente codiciados a escala mundial, no solo por su valor nutritivo ya que aportan vitamina A, C y E (Gonsalves, 1998; Duxbury, 2003; Gonsalves *et al.*, 2009) y como una buena fuente de calcio, potasio y hierro (Nakasone y Paull, 1998; Gonsalves *et al.*, 2009), sino por las múltiples aplicaciones que tiene en ramas de la industria farmacéutica y de alimentos por ser rica en papaina (con propiedades antibacterianas) y quimopapaina, de donde se extrae el latex. La papaya es una hierba y tiene muchos usos baratos; las hojas se usan a menudo para ablandar carnes y reducir la nebulosidad en la cerveza durante su proceso de elaboración (Starley *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001; Swain y Powell, 2001).

Se explora el uso de la papaya para producir una vacuna contra la tuberculosis, cirticecosis y otras enfermedades infecciosas en animales (Tecson Mendoza *et al.*, 2008).

EFFECTOS DEL PRSV

El PRSV es el responsable de la enfermedad más importante en el cultivo de la papaya en el mundo. Sus efectos en Brasil, Taiwán y Hawai sirven para ilustrar el significado de este virus para la industria a escala mundial.

La industrialización para el comercio de la papaya en Brasil comenzó en 1960 en los estados de Río de Janeiro y Sao Paulo. El PRSV fue detectado en estos dos estados en 1969 (Costa *et al.*, 1969) y posteriormente, en el estado de Ceará (Lima y Gomes, 1975). Los efectos destructivos del virus forzaron a la industria brasileña de papaya a moverse hacia los estados del norte Espiritu Santo y Bahía.

Entre 1973 y 1978, Sao Paulo y Río de Janeiro acumulaban el 90% de las plantaciones y solo el 27% en 1984. En 1993, en estos dos estados solo se plantaban 309 ha comparadas con las 4 792 ha en Espíritu Santo y 16 073 ha en Bahía. La migración de la industria es directamente atribuible a los efectos del PRSV. Desafortunadamente, el PRSV ha afectado la industria y cada vez es más difícil el establecimiento de nuevos campos que temporalmente escapan del virus, convirtiendo el manejo del virus en una práctica cada vez más costosa y no siempre efectiva (Gonsalves, 1998).

Taiwán es una pequeña isla que no ha escapado de la influencia de este virus. Su industria se ha afectado. El PRSV fue detectado en 1974 en el sur de la isla y se distribuyó por todo el territorio en pocos años. Los daños del PRSV han forzado a los campesinos a realizar cultivos anuales. La mayoría de los campesinos han solucionado sus problemas en el cultivo de la papaya con cobertores que evitan la incidencia de los áfidos y garantizan la producción. Los cobertores son retirados después de pasar el período crítico y aunque las plantas son infectadas posteriormente, los daños no afectan la producción. Las plantaciones son eliminadas y vuelven a plantar el año siguiente. La producción de papaya en casa de cultivo es extremadamente costosa pero económicamente viable por los dividendos obtenidos de las ventas. Como en Brasil, en Taiwán el virus es la causa de las mayores pérdidas unido a factores naturales como los tifones (Gonsalves, 1998).

En Hawaii, la situación es muy similar. La industria de la papaya comenzó en 1940 en Oahu con cerca de 20 234 ha. El virus se detectó en 1945 y las pérdidas provocaron que en 1950 se trasladaran las plantaciones al área de Puna. Estas se incrementaron de 650 ha en 1960 a 2 250 ha en 1990 mientras que en Oahu han decrecido hasta 50 ha en 1990 (Gonsalves *et al.*, 2004; Davidson, 2008).

En la India el PRSV provocó pérdidas de un 85-90% de la cosecha (Lokhande *et al.*, 1992; Hussain y Varma, 1994). En Bangladesh se han alcanzado pérdidas de un 70-100% de las producciones (Gonsalves, 2004). En Las Filipinas una erupción de PRSV en 1982 destruyó la industria de la papaya a pequeña

escala de la provincia de Cavite, en la isla de Luzón. Por 1994, la enfermedad se había extendido por toda el área sur de Tagalog y el rendimiento se redujo a un 80%. Desde la erupción de la enfermedad en Las Filipinas, algunas medidas se han emprendido para restringir el movimiento de papaya de la isla de Luzón al resto del país. A pesar de esto, la infección de PRSV fue detectada en Visayas y Mindanao, mientras amenaza las mayores áreas productoras de papaya (Gonsalves, 2004).

En Australia, el virus fue identificado por primera vez en 1991, en Wamuran, al sureste de Queensland, luego se detectó en otras regiones como Bundaberg, Dayboro y en los suburbios norteros de Brisbane (Chay-Prove *et al.*, 2000; Persley, 2004).

En Venezuela, el PRSV ha ocasionado la pérdida total en siembras comerciales por lo que se le considera como severa y endémica en algunos estados (Vegas *et al.*, 1997).

ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DEL PRSV

Métodos convencionales

Los virus han atraído la atención de los investigadores por la importancia de las enfermedades que producen y por las dificultades que entraña su control. Además, han sido clave para la obtención de conocimientos fundamentales sobre la biología de los seres vivos (Robertson *et al.*, 1995; Sevilla y Domingo, 1996; Aranda, 2006).

Se han desarrollado muchas alternativas para el control del PRSV que incluyen el uso de variedades tolerantes, prácticas culturales y la protección de plantas (Tripathi *et al.*, 2008). Ninguno de estos métodos por separado provee de un control eficiente de la enfermedad. En muchos casos, los mejores resultados se logran utilizando estas medidas de forma combinada.

En especies de *Carica* se ha encontrado resistencia a PRSV de forma natural pero no en *C. papaya*. Desafortunadamente, estas especies silvestres son incompatibles con *C. papaya* para realizar cruzamientos. La introducción de genes de resistencia en

cultivares comerciales mediante hibridaciones inter-específicas para lograr resistencia a PRSV no ha sido muy viable ya que los cruces resultan estériles (Yeh *et al.*, 1998).

Galindo *et al.* (1978) emplearon diferentes opciones de manejo para el PRSV como fueron la aplicación de citrolina, con el propósito de limpiar el estilete del insecto vector del PRSV (los áfidos), el establecimiento de barreras vivas con el pasto merkeron (*Pennisetum merkeri*), aspersiones de pintura blanca como repelente de áfidos y bandas de polietileno amarillo con pegamento como trampas para atraparlos. No obstante, ninguna de ellas logró disminuir los efectos de esta enfermedad.

El control de los áfidos, mediante el empleo de pesticidas es inefectivo, además de los problemas medioambientales que causa. Otro intento fallido en las estrategias de control del PRSV, lo ha constituido la táctica de variar las épocas de plantación para evitar la incidencia de los áfidos y la de emplear cultivos intercalados.

El empleo de aislados atenuados del virus para pre-inocular las posturas de papaya antes de ser llevadas a campo, ha permitido lograr resistencia frente a aislados más virulentos del mismo virus. La utilización de esta estrategia permitió una buena protección frente a aislados locales en Hawái y disminuyó la severidad de los síntomas, en dependencia del cultivar, hasta cierta fase del cultivo. Sin embargo, el empleo de este aislado atenuado no aportó los mismos resultados en la isla de Oahu (Mau *et al.*, 1989; Ferreira *et al.*, 1992; Pitz *et al.*, 1994). Finalmente, ha emergido como la única solución para el control de los áfidos el recubrimiento de la huerta entera con una red de *nylon* resistente a la luz ultravioleta, medida poco económica y no respetuosa del medio ambiente (Yeh y Gonsalves, 1984; 1994; Yeh *et al.*, 1988).

Resistencia derivada del patógeno

El fitomejoramiento convencional es un método que utiliza hibridaciones, es lento y se limita a un número reducido de genomas y a la restricción de las barreras naturales de cruzamiento entre especies. Los avances en el campo de la Biotecnología Vegetal, específicamente en la rama de la Biología

Molecular, han permitido sobrepasar estas barreras y ofrecen la posibilidad de incorporar en las plantas, cualidades de interés en tiempos mucho más cortos que los empleados en los procesos de mejora clásica. Constituye una metodología específica, dado que se están transfiriendo o modificando en una planta, de un genoma conocido, solamente unos pocos genes. Se trata, simplemente, de una herramienta adicional que puede facilitar y contribuir al mejoramiento de los cultivos, sin reemplazar los métodos convencionales (Hodson de Jaramillo, 2005).

A diferencia de los sistemas de selección y cruzamiento, la transformación genética permite al mejorador introducir cualquier gen de cualquier organismo en un cultivo. En la práctica, se pueden obtener un gran número de líneas transformadas para un gen específico y efectuar análisis para asegurar que la nueva línea presente exactamente las mismas características de la línea parental a excepción de la nueva característica introducida. De esta manera, se puede tratar de introducir en el genoma de una planta ciertas características que le confieran protección frente a un virus, en base al conocimiento sobre los mecanismos que determinan la infección y la expresión de los síntomas. Se evitan, además, los problemas de las barreras entre especies, géneros o familias y no se modifican las características agronómicas de las plantas (Llacer *et al.*, 1997). No obstante, no debe olvidarse que, una vez introducido el gen deseado, los procesos de selección son similares a los empleados en los métodos convencionales de mejora. Una vez que se obtiene una planta transgénica en el laboratorio, se requieren varios años de mejoramiento, con el fin de, por un lado asegurar que la nueva planta presenta realmente todos los caracteres deseados y, en forma complementaria, multiplicar las semillas o los propágulos para su distribución comercial (Hodson de Jaramillo, 2005).

Durante los últimos años se han alcanzado muchos progresos en las investigaciones que se refieren a la interacción molecular de los virus con sus hospederos. Se ha establecido que para que ocurra una interacción compatible virus-planta, es necesario que el primero complete una serie de etapas y el virus ha de superar la defensa constitutiva y/o inducible de la planta. Si tiene lugar una respuesta de

defensa, esta tiene lugar simultáneamente con los primeros ciclos de replicación del virus y este quedará confinado en unas pocas células muertas. Si no es así, el virus ha de moverse a las células adyacentes a través de los plasmodesmos y de ahí al sistema vascular y colonizar sistémicamente la planta (Simon y Bujarski, 1994; Roossinck, 1997; Aranda, 2006).

La transformación genética de plantas para la obtención de resistencia a virus se ha basado en el concepto de protección o resistencia derivada del patógeno (PDR, del inglés - *Pathogen Derived Resistance*) propuesto por Sanford y Johnston (1985). Ellos plantearon que la forma más directa de generar resistencia a virus era usando una porción del propio genoma del parásito (Fraile *et al.*, 1995).

Los orígenes se remontan a 1929, cuando McKinney demostró que podía proteger de infección por un aislado virulento del *Virus del mosaico del tabaco* (TMV, del inglés - *Tobacco Mosaic Virus*) a plantas de tabaco previamente inoculadas con un aislado avirulento del mismo virus, lo que se denominó protección cruzada (Sanford y Johnston, 1985).

El concepto de resistencia derivada del patógeno propone que la resistencia a un patógeno particular puede ser obtenida mediante la introducción de un gen del genoma del patógeno a su hospedero. Se fundamenta en el hecho de que en cualquier interacción hospedero-patógeno se encuentran presentes ciertas funciones celulares codificadas por el patógeno, las cuales son esenciales para él, pero no para el hospedero. Si se interrumpe alguna de estas funciones, el proceso de infección se puede impedir. Un requisito para el uso de la protección mediada por el patógeno es que ninguno de los mecanismos utilizados puede interferir con funciones esenciales del hospedero. La selección del gen adecuado del patógeno es la clave para este tipo de resistencia (Hodson de Jaramillo, 2005).

Se han descrito dos mecanismos que funcionan en la resistencia a infecciones virales en plantas transgénicas que expresan secuencias virales: la resistencia mediada por proteínas y la mediada por ácido ribonucleico (ARN). La característica común de la resistencia mediada por proteínas, es que

usualmente está correlacionada con altos niveles de expresión del transgen, mientras que la resistencia mediada por ARN, típicamente se asocia con su baja o no detectable expresión. En muchos casos se ha utilizado el gen de la proteína de la cápsida (CP, del inglés - *Capsid Protein*) que ha sido una de las más estudiadas y utilizadas (Chen *et al.*, 2001), pues existen muchos ejemplos que confirman que confiere alta resistencia a virus de varios grupos y se considera como una forma de protección cruzada elaborada (Llacer *et al.*, 1997; Kaniewski y Lawson, 1998; Dasgupta *et al.*, 2003). Estas primeras evidencias, también involucraban a la replicasa viral, proteína de movimiento y a otros genes virales. El gen de la CP está generalmente bien caracterizado y se puede aislar fácilmente. Desde 1986, cuando se describieron los primeros experimentos, muchos han sido los intentos de protección frente a infecciones virales mediante la incorporación al genoma de la planta de la CP del virus, para su expresión de forma constitutiva (Llacer *et al.*, 1997).

La generación de plantas transgénicas que porten la versión no traducible del gen de la CP de un virus, ha mostrado resultados en la inducción de resistencia a virus. Plantas que contengan transgenes en sentido, antisentido, repeticiones invertidas y promotores de estos transgenes y fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) pueden exhibir silenciamiento espontáneo (Dasgupta *et al.*, 2003; Meins *et al.*, 2005; Gonsalves *et al.*, 2006).

En cuanto a la respuesta de defensa, el mayor hito ha consistido en el clonaje y caracterización de genes de resistencia de la planta que están involucrados en el reconocimiento del virus y el desencadenamiento de una respuesta cuyo resultado consiste en el confinamiento de este en unas pocas células inicialmente infectadas. Este tipo de respuesta se denomina hipersensible. Además, en un caso se ha demostrado que un gen de resistencia puede funcionar en un fondo genético heterólogo (gen N de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) confiriendo resistencia a TMV en tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) transgénicos).

La caracterización de factores en el hospedero, las posibles barreras al movimiento vascular y

la determinación de su estructura y funcionamiento son los retos de la investigación en esta área. De lo anterior, se deduce que el estudio de los virus de plantas sigue teniendo una enorme vigencia. En general, el mayor reto para el estudio de la interacción virus-planta consiste en identificar en hospedero y vectores los factores que interaccionan con los que ya se han identificado en los virus. Las aproximaciones genéticas complementadas con el análisis mediante técnicas de biología celular, están generando y han de generar interesantes resultados en el futuro. Es de esperar que el trabajo en esta área identifique dianas específicas cuya manipulación y posterior generación de plantas transgénicas, sirva para atajar o reducir la incidencia de las enfermedades de las plantas inducidas por virus (Aranda, 2006).

El empleo de la Biotecnología ha sido la alternativa más efectiva para el manejo del PRSV. Con los avances de la Ingeniería Genética en los años 90, del siglo pasado, se han abierto nuevas perspectivas de solución al problema (Chen *et al.*, 2001). La utilización de la Ingeniería Genética para inducir resistencia a virus es considerada una opción lógica en muchos casos donde las pérdidas informadas lo justifican y no se ha encontrado resistencia natural o nuevas variedades por cruzamiento. Inicialmente, las pérdidas causadas por enfermedades virales fueron caracterizadas y cuantificadas. Estudios epidemiológicos preliminares sirvieron para determinar la agresividad y prevalencia de razas en diferentes áreas. En el caso de que existiera más de un aislado en el área, se empleaba el más común y agresivo; si existía más de una raza que provocara pérdidas sustanciales, los genes de estas pueden ser seleccionados para la transformación (Kaniewski y Lawson, 1998).

Los complejos escenarios y elevados niveles de divergencia del PRSV en diferentes países constituyen un gran desafío para controlar el virus. El éxito de muchas estrategias para su control, empleando la resistencia mediante Ingeniería Genética (Gonsalves, 1998; Chen *et al.*, 2001) y protección cruzada con aislados atenuados (Rezende y Pacheco, 1998); confían en la baja variación de las secuencias dentro de países o regiones designadas (Tennant *et al.*, 1994) y la continua exclusión de aislados

con mayor variabilidad. Esto puede lograrse en países donde la variación de los aislados sea baja y puedan asegurarse la cuarentena y restricción en el movimiento del material vegetal infectado (Thomas y Dodman, 1993).

Donde la divergencia del PRSV es baja, altas divergencias en poblaciones de cucurbitáceas pueden actuar como depósitos potenciales de nuevos aislados de la raza P, la exclusión de aislados también puede ser más difícil donde los países están más próximos a otros (Bateson *et al.*, 2002). En general, la variación del PRSV está relacionada principalmente con la situación geográfica, más que al rango de las plantas hospedantes (Bateson *et al.*, 1994).

La resistencia derivada del patógeno (PDR) ofrece nuevas perspectivas para el control del PRSV (Gonsalves, 1998). A partir de los resultados informados por Abel *et al.* (1986) se han sucedido un importante grupo de resultados de este tipo de resistencia inducida para controlar muchos virus de plantas (Lomonossoff, 1995).

Expresión del gen de la proteína de la cápsida

Los genes virales para inducir resistencia se seleccionan basados en analogías con experiencias previas. Se ha demostrado fragmentos de genes virales en plantas transgénicas aportando resistencia. En muchos casos se ha empleado el gen de la proteína de la cápsida. Este fue el primero que se empleó pues existen ejemplos que confirman que confiere alta resistencia a virus de varios grupos (Kaniewski y Lawson, 1998).

El desarrollo de plantas transgénicas resistentes a enfermedades virales requiere de una efectiva expresión de los transgenes virales. La expresión del casete viral consiste en un promotor y un terminador que controlan la producción del ARN mensajero del gen viral en las plantas transgénicas. Generalmente, los promotores constitutivos resultan en un alto nivel de expresión del gen. El promotor 35S del *Virus del mosaico del coliflor* en copias simples o dobles es el más frecuentemente utilizado para expresar transgenes virales, aunque existen otros promotores constitutivos que son utilizados ocasionalmente. En situaciones en que el virus se restrinja a ciertas células o

tejidos, se pueden utilizar promotores específicos para esos tejidos, aunque estos no provean resistencia cuando se comparan con promotores constitutivos fuertes que no se expresan en estos mismos tejidos. La expresión de los genes en construcciones particulares debe ser considerada entre diferentes especies de plantas y optimizar la expresión del casete para cada especie. La optimización de la expresión del gen para inducir resistencia involucra muchos elementos genéticos adicionales. En adición al casete de expresión del gen, los vectores de transformación típicos contienen genes de selección utilizados para distinguir los transformantes. No existen evidencias de que estos genes influyan en la resistencia (Kaniewski y Lawson, 1998).

Transformación de papaya con el gen de la CP

La transformación de plantas mediante el empleo del gen de la CP, ha sido el mejor método encontrado para la protección de las plantas frente a la destructiva enfermedad causada por el PRSV (Tripathi *et al.*, 2004).

Los primeros trabajos en papaya fueron realizados por Fitch y Manshardt en 1987 (Gonsalves, 1998). Pang y Sanford (1998) refirieron que las células de papaya podían ser transformadas pero no regeneradas. Posteriormente se desarrollaron numerosos esfuerzos para la regeneración vía organogénesis que no fueron efectivos. Sin embargo, McGranahan *et al.* (1988) desarrollaron una técnica para transformar y regenerar cultivos embriogénicos con buenos resultados. Los éxitos se sucedieron una vez que se tomó la decisión de transformar cultivos embriogénicos (Fitch y Manshardt, 1990). Entre 1988 y 1989 se transformó este tipo de material vegetal mediante pistola de genes y las plantas regeneradas fueron mantenidas durante 15 meses en invernadero (Fitch *et al.*, 1990; 1992). A partir de este momento se continuaron los trabajos de transformación genética y comenzó la evaluación de la resistencia de estas líneas transgénicas frente a aislados autóctonos y de otras partes del mundo, y se lograron diferentes niveles de resistencia (Tennant *et al.*, 1994).

A partir de estos ensayos, se obtuvo una línea con resistencia a todos los aislados con los que fue confrontada, excepto el aislado de

Tailandia, sin tener en cuenta la edad de las plantas (Tennant *et al.*, 1994). El homocigótico de esta línea se inoculó con este aislado tailandés y resultó que en plantas grandes se observaba resistencia o largos retrasos en la manifestación de los síntomas. Esto condujo a la suposición de que este fenómeno estaba regido por la protección mediante ARN (Lindbo y Dougherty, 1992; Baulcombe, 1996). Luego de algunos ensayos se comprobó que efectivamente el transgen con la CP del virus estaba siendo silenciado de forma post-transcripcional (Tennant *et al.*, 1997).

Por otra parte, Lindbo *et al.* (1993) trabajaron en obtener resistencia de plantas transgénicas que expresaban diversas formas del gen de la CP. Ellos demostraron que la protección era más efectiva mientras mayor fuera la homología entre la secuencia introducida en el genoma de la planta y el virus atacante. 'Rainbow' y 'SunUp' son variedades resistentes al PRSV que se comercializan en Hawai (Gonsalves, 1998; Manshardt, 1999). 'SunUp' es una línea resistente que contiene una sola inserción del gen de la CP del virus en su genoma (Fitch *et al.*, 1992) mientras que 'Rainbow' es un híbrido de 'SunUp' y el cultivar no transgénico 'Kapoho' (Manshardt, 1999). Tennant *et al.* (1994; 2001) informaron que 'Rainbow' era resistente a los aislados del PRSV de Hawai, que poseían más de un 97% de homología con el transgen de la CP empleado, mientras que era susceptible a otros aislados con porcentajes de homología menores (89-94%). Sin embargo, la variedad 'SunUp' fue resistente incluso a aislados del virus que no procedían de Hawai (Chiang *et al.*, 2001).

Bau *et al.* (2003) utilizaron el gen de la CP de un aislado severo del PRSV y lograron obtener variados niveles de resistencia, incluyendo dos líneas inmunes.

Igualmente, Davis y Ying (2004) transformaron papaya mediante *Agrobacterium tumefaciens* con diferentes construcciones a partir de la CP: el gen en sentido, en antisentido, con ligeras mutaciones en la cadena en sentido y en el codón de parada. Las líneas transformadas fueron inoculadas mecánicamente con un aislado del virus procedente de La Florida sin lograr inmunidad al PRSV, pero sí se encontraron diferentes niveles de resistencia en cada una de las construcciones.

De igual manera, Huey-Jiunn *et al.* (2004) realizaron ensayos con cuatro líneas de papaya transgénicas en condiciones de campo. En el control no transformado, el 100% de las plantas se infectaron de forma natural entre los tres y cinco meses después de plantadas, mientras que solo entre el 20 y 30% de las plantas transgénicas mostraron síntomas ligeros de la infección consistentes en un moteado clorótico en algunas hojas. Gonsalves *et al.* (2004) obtuvieron resultados similares con el cultivar 'Sunrise', donde todas las líneas no transformadas perecieron a los 11 meses de plantadas.

El número de plantas transgénicas con síntomas de PRSV fluctúa de acuerdo con la estación y las condiciones climáticas, con una tendencia al incremento en las época fría y lluviosa, y decrece en el verano (Huey-Jiunn *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que los aislados de una región, utilizados para inducir resistencia en plantas transformadas con ellos, no son efectivos en otras regiones. Gonsalves (2004) lo demostró utilizando aislados procedentes de Hawaii para ser utilizados en Bangladesh, sin lograr resistencia. A raíz de estos resultados, se desarrolló un proyecto para obtener papaya transgénica resistente al PRSV en este país.

Gonsalves *et al.* (2006) refieren el empleo de una nueva estrategia para la inducción de resistencia al PRSV en papaya: emplear fragmentos de aproximadamente 240 pares de bases de la CP de aislados de diferentes regiones y unirlos para formar diferentes combinaciones y orientaciones para una mayor eficacia en la resistencia al PRSV.

Silenciamiento postranscripcional de genes

El objetivo de la transformación genética para la protección a virus, con o sin expresión de una proteína codificada por una secuencia dada, es interferir con algún aspecto de la multiplicación del virus y de esta manera conferir resistencia funcional.

Se ha identificado un nuevo mecanismo de defensa inducible basado en el silenciamiento postranscripcional de genes (PTGS, del inglés - *Post-transcriptional Gene Silencing*) (Bau *et al.*,

2003; Gonsalves *et al.*, 2006), cuyo modo de acción difiere, aparentemente, de la respuesta hipersensible. Este mecanismo se fundamenta en la degradación específica de ARN viral en el citoplasma de las células infectadas. Intervienen muchos componentes en el proceso donde el ARN es degradado a pequeños fragmentos de 21-27 nucleótidos. Estas moléculas son las responsables de amplificar y transmitir la señal de silenciamiento al resto de la planta (Stange, 2006). Se ha descubierto que los virus cuentan con mecanismos específicos para contrarrestar este efecto (e.g. proteína HC-Pro de *Potyvirus*, proteína 2b de *Cucumovirus*), de donde se puede conjeturar que el silenciamiento postranscripcional de genes pudiera formar una barrera constitutiva y que se emplea por las plantas para su defensa frente al ataque de los virus. La identificación de barreras constitutivas y el esclarecimiento de la cadena de señales que da lugar a la respuesta de defensa, constituyen retos para la investigación (Gal-On *et al.*, 1998; Hodson de Jaramillo, 2005; Lindbo y Dougherty, 2005; Aranda, 2006). Esta resistencia es fuerte, pero tiene un espectro estrecho porque su naturaleza es dependiente de la homología de la secuencia (Masuta *et al.*, 1998; Bau *et al.*, 2003).

Varios modelos han sido propuestos para explicar el mecanismo de cómo ocurre el PTGS y cómo produce resistencia en las plantas transgénicas que expresan el transgen que es homólogo al virus atacante. Estos incluyen el modelo de nivel basal de ARN (Dougherty y Parks, 1995; Smith *et al.*, 1994), modelo de ARN aberrante y apareamiento ectópico (Baulcombe, 1996; Baulcombe e English, 1996; English *et al.*, 1996) y el modelo de PTGS inducido por ARN de doble cadena (Metzlaff *et al.*, 1997; Montgomery y Fire, 1998; Waterhouse *et al.*, 1998). Casi siempre, los modelos proponen un proceso de degradación de la molécula de ARN específica.

Una ARN polimerasa dependiente de ARN sintetiza pequeños fragmentos de ARN en antisentido a partir del ARNm del transgen y este se une a regiones complementarias del ARNm viral en el citoplasma para formar ARN de doble cadena, los cuales son degradados por nucleasas específicas de doble cadena (Mourrain *et al.*, 2000). El ARN viral en el

citoplasma es blanco para la degradación. Trabajos recientes refieren la identificación de pequeñas moléculas de ARN, de entre 21 y 25 pares de bases, que corresponden a partes de la doble cadena de ARN (dsRNA) en sentido o antisentido del transgen que fue introducido dentro del citoplasma (Hamilton y Baulcombe, 1999).

Según Bau *et al.* (2005) las plantas transgénicas con múltiples copias del transcripto de la versión no traducible del gen de la CP del virus, tienen mayores posibilidades de tener niveles estacionarios de ARN del transgen y mayor resistencia al virus, demostrando que estos niveles inducen la actividad de degradación del ARN. La capacidad de inducir la degradación postranscripcional del ARN del transgen en ausencia del virus (alterando el número de la copia del transgen) era una demostración adicional de la naturaleza celular de este sistema secuencia-específico de la degradación del ARN.

Además, recibe una fuerte influencia de factores ambientales y de desarrollo, lo que implica que el mecanismo básico esté estrechamente vinculado con las rutas de sensibilidad al estrés y las señales ambientales. Estas señales actúan en parte, en el gen blanco y el silenciamiento requiere de estos genes blancos para su activación (Meins *et al.*, 2005).

Existen ejemplos diversos del empleo de este método para la inducción de resistencia en plantas transgénicas de papaya, no solo a aislados del PRSV sino a estos unidos con otros virus. Recientemente, Kung *et al.* (2009), desarrollaron plantas transgénicas de papaya que poseían una construcción química no traducible y contenía una región truncada de la CP del *Virus del mosaico distorsionado de la papaya* y una región truncada de la CP unido a la región no traducible 3' del aislado YK del PRSV. Los resultados mostraron que la resistencia a estos dos virus de plantas era el resultado de dos o más copias del inserto a través del mecanismo de silenciamiento postranscripcional de genes mediado por ARN.

REFERENCIAS

- Aranda, M (2006) Avances recientes en el conocimiento sobre la interacción de los virus de las plantas con sus huéspedes. [En línea] En: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros56/virus.html> (Consultado 15 de agosto de 2009)
- Bateson, MF, Henderson J, Chaleeprom W, Gibbs AJ, Dale JL (1994) Papaya ringspot potyvirus: Isolate variability and the origin of PRSV type P (Australia). *Journal of General Virology* 75: 3547-3553
- Bateson, MF, Lines RE, Revil P, Chaleeprom W, Ha CV, Gibbs AJ, Dale JL (2002) On the evolution and molecular epidemiology of the potyvirus Papaya ringspot virus. *Journal of General Virology* 83: 2575-2585
- Bau, HJ, Cheng YH, Yu TA, Yang JS, Yeh SD (2003) Broad-spectrum resistance to different geographic strains of Papaya ringspot virus in coat protein gene transgenic papaya. *Phytopathology* 93: 112-120
- Bau, HJ, Cheng YH, Yu TA, Yang JS, Liou PC, Hsiao CH, Lin CY, Yeh SD (2004) Field evaluation of transgenic papaya lines carrying the coat protein gene of *Papaya ringspot virus* in Taiwan. *Plant Disease* 88: 594-599
- Bau, HJ, Kung YJ, Raja JA J, Chan SJ, Chen KC, Chen YK, Wu HW, Yeh SD (2008) Potential threat of a new pathotype of *Papaya leaf distortion mosaic virus* infecting transgenic papaya resistant to *Papaya ringspot virus*. *Phytopathology* 98: 848-856
- Baulcombe, DC (1996) Mechanisms of pathogen-derived resistance to virus in transgenic plants. *Plant Cell* 8: 1833-1844
- Chay-Prove, P, Ross P, O'Hare P, Macleod N, Kernot I, Evans D, Grice K, Vawdrey L, Richards N, Blair A, Astridge D (2000) Agrilink Series: Your growing guide to better farming. Papaw Information Kit. Queensland Horticulture Institute and Department of Primary Industries, Qld. Nambour
- Chen, G, Ye CM, Huang JC, Li BJ (2001) Cloning of the Papaya ringspot virus (PRSV) replicase gene and generation of PRSV-resistant papayas through the introduction of the PRSV replicase gene. *Plant Cell Reports* 20: 272-277
- Chiang, C, Wang J, Jan F, Yeh S, Gonsalves D (2001) Comparative reactions of recombinant Papaya ringspot viruses with chimeric coat protein (CP) genes and wild-type viruses on CP-transgenic papaya. *Journal of General Virology* 82: 2827-2836
- Dasgupta, I, Malathi VG, Mukherjee SK (2003) Genetic engineering for virus resistance. *Current Science* 84: 341-353
- Davidson, S (2008) Forbidden fruit: Transgenic papaya in Thailand. *Plant Physiology* 147: 487-493

- Davis, MJ, Kramer JB, Fewerda FH, Brunner BR (1996) Association of a bacterium and not a phytoplasma with Papaya bunchy top disease. *Phytopathology* 86: 102-109
- dos Santos, AA, Cardoso JE, Vidal J (2004) Eficiência do uso da barreira com cana de açúcar no controle da Mancha anelar do mamoeiro. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical. [En línea] En: http://www.cnpq.br/publica/pub/BolPesq/bd_18.pdf. (Consultado 9 de enero de 2009)
- Duxbury, JM (2003) Food systems approaches to nutrition and health: The role of transgenic papaya. En: *Virus resistant transgenic papaya in Hawaii: A case study for technology transfer to lesser developed countries: Proceedings of an OECD/USAID/ARS Conference*, pp. 133-138. Hilo, USA
- FAO (2006) FAOSTAT database. Agricultural production. Crops primary. [En línea] En: <http://faostat.fao.org/faostat/collections> (Consultado 7 de abril de 2009)
- FAO (2008) FAOSTAT, FAO statistics division. Crops production quantity. [En línea] En: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx> (Consultado 7 de abril de 2009)
- Ferreira, SA, Mau RFL, Manshardt R, Pitz KY, Gonsalves D (1992) Field evaluation of Papaya ringspot virus cross protection. En: *Proceedings of the 28th Annual Hawaii Papaya Industry Association Conference*, pp. 14-19. Honolulu, USA
- Fitch, MMM, Manshardt R (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Cell Reports* 9: 320-24
- Fitch, MMM, Manshardt R, Gonsalves D, Slightom JL, Sanford JC (1990) Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 9: 189-94
- Fitch, MMM, Manshardt R, Gonsalves D, Slightom JL, Sanford JC (1992) Virus resistant papaya derived from tissues bombarded with the coat protein gene of *Papaya ringspot virus*. *Bio-Technology* 10: 1466-72
- Fraile, A, Aranda MA, García-Arenal F (1995) Evolution of the *Tobamoviruses*. En: Gibbs A, Calisher CH, García-Arenal F (Eds) *Molecular basis of virus evolution*, pp. 338-350. Cambridge University Press, Cambridge
- Gal-On, A, Meiri E, Raccach B, Gaba V (1998) Recombination of engineered defective RNA species produces infective potyvirus in planta. *Journal of Virology* 72: 5268-5270
- Gonsalves, C, Lee DR, Gonsalves D (2007) The adoption of genetically modified papaya in Hawaii and its implications for developing countries. *Journal of Developmental Studies* 43: 177-191
- Gonsalves, D (1998) Control of *Papaya ringspot virus* in papaya: A case study. *Annual Reviews Phytopathology* 36: 415-37
- Gonsalves, D (2004) Development of Ringspot virus resistant transgenic papaya for Bangladesh. [En línea] En: http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=406546 (Consultado 13 de julio de 2009)
- Gonsalves, D, Gonsalves C, Ferreira S, Pitz K, Fitch M, Manshardt R y Slightom J (2004) Transgenic virus resistant papaya: From hope to reality for controlling *Papaya ringspot virus* in Hawaii. [En línea] En: <http://www.apsnet.org/online/feature/ringspot/> (Consultado 13 de julio de 2009)
- Gonsalves, D, Vegas A, Prasartsee R, Drew R, Suzuki J, Tripathi S (2006) Developing papaya to control Papaya ringspot virus by transgenic resistance, intergeneric hybridization and tolerance breeding. *Plant Breeding Reviews* 26: 35-781
- Gonsalves, D, Suzuki JY, Tripathi S, Ferreira SA (2009) Transgenic tropical and subtropical fruits and nuts. En: Chittaranjan, Kole y Timothy CH (Eds) *Compendium of Transgenic crop plants*, pp. 1-258. Wiley-Blackwell Nuw York
- Hamilton, AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952
- Hautea RA, YK Chan, Attathom S, Krattige AF (1999) The papaya biotechnology network of southeast Asia: Biosafety considerations and papaya background information. ISAAA Briefs N° 11. ISAAA: Ithaca, NY
- Hernández E, Riestra D, García E, Mosqueda DL (2000) Respuesta del *Virus de la mancha anular del papayo (PRSV)* en tres sistemas de manejo. *Manejo Integrado de Plagas* 58
- Hodson de Jaramillo, E (2005) Transformación genética de plantas para resistencia a virus. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias* 29: 5-24
- Hossain, M, Rahman N, Islam S, Joarder O (1993) High efficient plant regeneration from petiole explants of *Carica papaya* L. through organogenesis. *Plant Cell Reports* 13: 99-102
- Huey-Jiunn, B, Ying-Huey C, Tsong-Ann Y, Jiu-Sherng Y, Pan-Chi L, Chi-Hsiung H, Chien-Yih L, Shyi-Dong Y (2004) Field evaluation of transgenic

- papaya lines carrying the coat protein gene of Papaya ringspot virus in Taiwan. *Plant Disease* 88: 594-599
- Hussain, S, Varma A (1994) Occurrence of Papaya ringspot virus from Amritsar (Punjab) India. *Journal of Phytopathology Research* 7: 77-78
- Kaniewski, W, Lawson C (1998) Coat protein and replicase-mediated resistance to plant viruses. En: Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa E (Eds) *Plant Viral Disease Control*, pp. 65-78. APS Press, St. Paul
- Kung, YJ, Bau HJ, Wu YL, Huang CH, Chen TM, Yeh SD (2009) Generation of transgenic papaya with double resistance to *Papaya ringspot virus* and *Papaya leaf-distortion mosaic virus*. *Phytopathology* 99: 1312-1320
- Lindbo, JA, Dougherty WG (1992) Untranslatable transcripts of the *Tobacco etch virus* coat protein gene sequence can interfere with *Tobacco etch virus* replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189: 725-33
- Lindbo, JA, Dougherty WG (2005) Plant pathology and RNAi: A brief history. *Annual Review of Phytopathology* 43: 191-204
- Lindbo, JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM, Dougherty WG (1993) Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5: 1749-59
- Llacer, G, López MM, Trapero A, Bello A (1997) *Patología Vegetal*. Sociedad Española de Fitopatología. Madrid
- Lokhande, NM, Moghe PG, Matte AD, Hiware BJ (1992) Occurrence of Papaya ringspot virus (PRSV) in Vidharbha regions of Maharashtra. *Journal of Soils and Crops* 2: 36-39
- Lomonosoff, GP (1995) Pathogen-derived resistance to plant virus. *Annual Review of Phytopathology* 33: 323-43
- Masuta, C, Uyeda S, Suzuki M, Uyeda I (1998) Evolution of a quadripartite hybrid virus by interspecific exchange and recombination between replicase components of two related tripartite RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 10487-10492
- Mau, RFL, Gonsalves D, Bautista R (1989) Use of cross protection to control Papaya ringspot virus at Waianae. En: *Proceedings of the 25th Annual Hawaii Papaya Industry Association Conference*, pp. 77-84. Hilo. USA
- McGranahan, GH, Leslie CA, Uratsu SL, Martin LA, Dandekar AM (1998) *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Bio-Technology* 6: 800-804
- Meins, F Jr, Si-Ammour A, Blevins T (2005) RNA silencing systems and their relevance to plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 297-318
- Muñoz, S (1983) Programa de mejoramiento genético de la fruta bomba *Carica papaya* L. *Ciencia y técnica en la agricultura. Cítricos y otros frutales*. La Habana
- Nakasone, HY, Paull RE (1998) Papaya. En: Nakasone HY y Paull RE (Eds) *Tropical Fruits*, pp. 239-269. CAB International. UK
- OECD (2003) Draft consensus document on the biology of *Carica papaya* (L.) (Papaya). Report No. 5, OECD, France
- Pang, SZ, Sanford JC (1998) *Agrobacterium*-mediated gene transfer in papaya. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 113: 287-91
- Peña H, Díaz JA, Martínez T (1996) *Fruticultura Tropical*. 2^{da} parte. Colombia
- Persley D (2004) Papaya Ringspot Disease. [En línea] En: <http://www.dpi.qld.gov.au/horticulture/5333.html> (Consultado 1 de diciembre de 2008)
- Pitz K, Ferreira S, Mau R, Gonsalves D (1994) Papaya cross protection; the near-commercialization experience on Oahu. En: *Proceedings of the 30th Annual Hawaii Papaya Industry Association Conference*, pp. 4-6. Maui. USA
- Reyes RD (1983) *Manual Técnico de producción de papaya*. Instituto de Investigación Agropecuaria. Panamá
- Rezende, JAM, Pacheco DA (1998) Control of Papaya ringspot virus type-W in zucchini squash by cross protection in Brazil. *Plant Disease* 82: 171-175
- Robertson, DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn BH (1995) Recombination in HIV-1. *Nature* 374: 124-126
- Roig y Mesa JT (1988) *Diccionario Botánico de nombres vulgares cubanos*. Editorial Científico-Técnica. La Habana
- Roossinck, M (1997) Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology* 35: 191-209
- Sanford JC, Johnston SA (1985) The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* 113: 395-405

- Sevilla, N, Domingo E (1996) Evolution of a persistent aphthovirus in cytolitic infections: Partial reversion of phenotypic traits accompanied by genetic diversification. *Journal of Virology* 70: 6617-6624
- Yeh, S, Bau H, Cheng Y, Yang J (1998) Greenhouse and field evaluations of coat-protein transgenic papaya resistant to *Papaya ringspot virus*. *International Symposium Biotechnology Tropical and Subtropical Species, 2^{da} Parte*
- Simon, AE, Bujarski JJ (1994) RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 32: 337-362
- Space, JC, Waterhouse B, Denslow JS y Nelson D (2000) Invasive plant species on Rota, commonwealth of the Northern Mariana Islands. USDA Forest Service, Honolulu. [En línea] En: <http://www.hear.org/pier/reports/rreport.htm> (Consultado 18 de mayo de 2009)
- Stange C (2006) Plant-virus interactions during the infective process. *Ciencia e Investigacion Agraria* 33: 1-18
- Starley, IF, Mohammed P, Schneider G, Bickler SW (1999) The treatment of pediatrics burns using tropical papaya. *Burns* 25: 636-639
- Swain, S, Powell DA (2001) *Papaya ringspot virus resistant papaya: A case study technical report*. [En línea] En: <http://www.foodsafetynetwork.ca/gmo/papayarep.htm> (consulta: 1 de diciembre de 2008)
- Tecson Mendoza, EM, C Laurena A, Botella JR (2008) Recent advances in the development of transgenic papaya technology. *Biotechnology Annual Reviews* 14: 423-62
- Tennant, PF, Fitch M, Manshardt R, Slightom JL (1997) Resistance against *Papaya ringspot virus* isolated in coat protein transgenic papaya is affected by transgene dosage and plant development. *Phytopathology* 87: S96
- Tennant, PF, Gonsalves C, Ling KS, Fitch M, Manshardt R, Slightom JL, Gonslaves D (1994) Differential protection against *Papaya ringspot virus* isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathology* 84: 1359-1366
- Thomas, JE, Dodman RL (1993) The first record of *Papaya ringspot virus* type P in Australia. *Australian Plant Pathology* 22: 2-7
- Tripathi, S, Bau HJ, Chen LF, Yeh CD (2004) The ability of *Papaya ringspot virus* strains overcoming the transgenic resistance of papaya conferred by the coat protein gene is not correlated with higher degrees of sequence divergence from the transgene. *European Journal of Plant Pathology* 110: 871-88
- Tripathi, S, Suzuki JY, Ferreira SA, Gonsalves D (2008) Pathogen profile: *Papaya ringspot virus*-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Molecular Plant Pathology* 9: 269-280
- Vegas, A, González A, Trujillo G, Pino I (1998) Dificultad en el diagnóstico serológico de cepas atenuadas del *Virus de la mancha anillada distorsionante de la lechosa* (PRSV). *Fitopatología Venezolana* 11: 40-44
- Villegas, VN (1997) *Edible fruits and nuts-Carica papaya* L. Wageningen University. Wageningen
- Wei, F, Wing RA (2008) A fruitful outcome to the papaya genome project. *Genome Biology* 9: 227