

Tres Potyvirus que Afectan las Cucurbitáceas en Puerto Rico: Resistencia Genética y Comportamiento Biológico

Por
Giseiry M. Rosa Valentín

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado

MAESTRO EN CIENCIAS
en
AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2012

Aprobado por:

Jose Carlos Verle Rodrigues, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Consuelo Estévez de Jensen, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Linda Wessel-Beaver, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Ana Vélez Díaz, M.S.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Skip Van Bloem, Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

ABSTRACT

Tropical pumpkin (*Cucurbita moschata*) and watermelon (*Citrullus lanatus*) are the most important cucurbit crops in Puerto Rico (PR). *Potyviridae* is an important family of viruses that severely affects these crops in PR. Among these viruses are: *Squash vein yellowing virus* (SqVYV), *Papaya ringspot virus* (PRSV) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). An experiment was conducted with each of these viruses. In Experiment 1, USDA accessions not in the watermelon core collection were tested for SqVYV resistance. Accessions were inoculated, and disease severity and absorbance (ELISA) were evaluated in the field. In Experiment 2, the biological behavior of a collection of PRSV strains from PR were tested in susceptible and resistant lines of tropical pumpkin and in susceptible lines of watermelon. Plants were inoculated and severity of symptoms and absorbance were measured. In Experiment 3, accessions of *C. lanatus* and *C. citroides* previously identified as resistant to ZYMV were inoculated with the local ZYMV strain. Severity of ZYMV and absorbance were observed to determine if these accessions are also resistant to this strain. No watermelon accessions evaluated for SqVYV showed complete resistance (defined as symptom free and negative ELISA), but some demonstrated moderate levels of resistance, particularly PI277997 and PI526237. Strains 874 and 903 of PRSV caused more severe symptoms on pumpkin and watermelon than the standard strain 231. These strains were also able to infect *Cucurbita moschata* cv. Nigerian Local, a cultivar that has previously been always resistant to PRSV. Subsequently, tissues of these plants of Nigerian Local were able to infect susceptible genotypes of *C. moschata* cv. Waltham and *Citrullus lanatus* cv. Sugar Baby and Crimson Sweet. *C. citroides* PI537277 was highly resistance to the local strain of ZYMV, while *C. lanatus* accessions PIs 485580, 494528, 494529, 595200, 595201, and 595203 were moderately resistant to ZYMV.

RESUMEN

En Puerto Rico (PR) las cucurbitáceas de mayor importancia son calabaza (*Cucurbita moschata*) y sandía (*Citrullus lanatus*). Una importante familia de virus que afecta severamente este grupo de plantas en PR es la familia *Potyviridae*. Entre ellos están: *Squash vein yellowing virus* (SqVYV), *Papaya ringspot virus* (PRSV) y *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). Se realizó un experimento con cada uno de estos virus. En Experimento 1 se evaluaron accesiones de sandía de la colección de USDA para resistencia a SqVYV. Para esto se realizaron inoculaciones mecánicas y se tomaron medidas de severidad de síntomas y lecturas de absorbancia de una prueba ELISA de plantas en el campo. En Experimento 2 se estudió el comportamiento biológico de nuevas cepas de PRSV recolectadas en PR en cultivares de calabazas susceptibles y resistentes y sandías susceptibles. Se inocularon estas plantas y se tomaron medidas de severidad de síntomas y lecturas de absorbancia. En Experimento 3 se evaluaron accesiones de *C. lanatus* y *C. citroides* previamente identificadas como resistentes para ZYMV. Se inocularon estas accesiones con la cepa local de ZYMV. Se observó la severidad y absorbancia para determinar si estas accesiones también resultan resistentes a esta cepa. Ninguna accesión de sandía evaluada para SqVYV mostró resistencia completa (sin síntomas y con ELISA negativa), pero algunas mostraron niveles moderados de resistencia, en particular PI277997 y PI526237. Las cepas 874 y 903 de PRSV fueron más severas que la cepa estándar 231. Estas fueron capaces de infectar Nigerian Local. Posteriormente tejido de estas plantas de Nigerian Local, identificado como resistente, fue capaz de infectar genotipos susceptibles de calabaza ‘Waltham’ y sandía ‘Sugar Baby’ y ‘Crimson Sweet’. La sandía PI537277 fue altamente resistente a la cepa local de ZYMV, mientras que PI485580, PI494528, PI494529, PI595200, PI595201 y PI595203 fueron moderadamente resistentes.

A mi familia...

Especialmente mis padres Víctor Rosa Vélez y Nydia M. Valentín Pérez por su ayuda e incondicional apoyo a lo largo de mi vida. Siempre a mi lado cuando más los he necesitado. Porque me han enseñado lo que es verdaderamente importante en la vida y luchar por lo que uno quiere. Gracias a ellos soy todo lo que soy y por eso les dedico este trabajo.

A mi pequeña hija Grace Isabelle quien ha cambiado mi razón de vivir. Me hace no rendirme y cada vez ser mejor ejemplo para ella.

¡Los amo infinitamente!

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo gracias a Dios por permitirme llegar a hasta aquí y por la fortaleza de culminar mi investigación a pesar de los tropiezos.

A la Dra. Linda Wessel-Beaver mi más sincero agradecimiento por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación bajo su supervisión. Por compartir sus conocimientos, consejos, ayuda y apoyo que me ha ofrecido durante este tiempo. A los miembros del comité graduado, la Dra. Consuelo Estévez de Jensen y Dr. Jose Carlos Verle Rodrigues por toda su aportación y ayuda.

A Obed Román y mi gran amiga Verónica Acevedo Torres por toda su colaboración en pruebas, experimentos y trabajo de campo. Al personal de la Finca Alzamora y de la Estación Experimental Agrícola de Lajas por la colaboración en ensayos de campo.

Al Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales especialmente Floripe Cancel y Jeannette Morales por siempre estar a la mejor disposición de ayudarme.

A mis hermanos Yarelis Rosa Valentín y Víctor Rosa Valentín por su ayuda, apoyo y estar siempre a mi lado a pesar de las adversidades.

A mi esposo Edwin Pérez Pérez por su amor, paciencia y ayuda durante estos años de estudios y sacrificios.

A los proyectos USDA-NIFA-Tropical Subtropical Agricultural Research Program número 2008-34135-19505 y 2010-34135-21022 y USDA-NIFA-Hispanic Serving Institutions Educational Grants Program número 2006-38422-17106.

A mis compañeros, amigos y todas las personas que de una forma u otra hicieron posible este trabajo y crearon una experiencia única e inolvidable.

¡Gracias!

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Sandía (<i>Citrullus lanatus</i>).....	5
2.2 Virus en Plantas.....	6
2.3 Interacción Virus-Vector.....	7
2.4 Diagnóstico de Enfermedades Virales en Plantas.....	8
2.5 Virus en Cucurbitáceas.....	9
2.6 <i>Squash vein yellowing virus</i>	10
2.7 <i>Papaya ringspot virus</i>	12
2.8 <i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	12
2.9 Fitomejoramiento en sandía.....	13
3. EXPERIMENTO 1: Evaluación de Germoplasma de Sandía (<i>Citrullus lanatus</i>) para Identificar Fuente de Resistencia a WVD Causada por SqVYV	16
3.1 Objetivos.....	16
3.2 Materiales y Métodos.....	17
3.2.1 Recolección de Tejido de SqVYV, Producción y Mantenimiento de Inóculo.....	17
3.2.2 Escala de Severidad de Síntomas para WVD.....	19
3.2.3 Evaluación de Germoplasma.....	20
3.3 Resultados.....	23
3.4 Discusión.....	32
4. EXPERIMENTO 2: Evaluación de cepas de PRSV recolectadas en Puerto Rico	35
4.1 Objetivos.....	35
4.2 Materiales y Métodos.....	36
4.3 Resultados.....	41
4.4 Discusión.....	50
5. EXPERIMENTO 3: Evaluación de Acciones de Sandía Previamente Identificadas como Resistentes a ZYMV	52
5.1 Objetivo.....	52
5.2 Materiales y Métodos.....	53
5.3 Resultados.....	55
5.4 Discusión.....	63
6. CONCLUSIONES	65
7. LITERATURA CITADA	67
8. APÉNDICE	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ensayos realizados para la evaluación de germoplasma de sandía (<i>Citrullus lanatus</i>) con sus respectivas localidades y épocas de siembra (Experimento 1).....	21
Tabla 2. Valores promedios de severidad de síntomas y lecturas absorbancia (405 nm) en la prueba ELISA indirecta de POTY en 117 accesiones de sandía inoculadas mecánicamente con <i>Squash vein yellowing virus</i> evaluadas en Mayagüez y Lajas durante 2010 y 2011.....	24
Tabla 3. El 20% superior e inferior de las accesiones de sandía (<i>Citrullus sp.</i>) según los valores promedios de severidad de síntomas y lectura de absorbancia en la prueba ELISA indirecta de POTY inoculadas mecánicamente con <i>Squash vein yellowing virus</i> en Lajas y Mayagüez durante 2010 y 2011.....	30
Tabla 4. Descripción de cepas de <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV) utilizadas en Experimento 2, incluyendo el hospedero y localidad en que fue recolectado, síntomas presentes, la similitud a PRSV en el banco de genes y resultados de pruebas serológicas (ELISA).....	37
Tabla 5. Valores promedios de severidad de síntomas y lecturas de absorbancia (405 nm) en la prueba DAS-ELISA de plantas de Waltham y Nigerian Local inoculadas con diferentes cepas de <i>Papaya ringspot virus</i>	48
Tabla 6. Valores promedios de severidad de síntomas y lecturas de absorbancia (405 nm) en plantas de Crimson Sweet , Sugar Baby y Waltham inoculadas con diferentes cepas de <i>Papaya ringspot virus</i> obtenidas de Nigerian Local y Waltham.....	49
Tabla 7. Germoplasma de sandía evaluado para resistencia de <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> en el invernadero Recinto Universitario de Mayagüez.....	53
Tabla 8. Valores promedios de severidad de síntomas en hojas 1, 3, 5 y 7 de sandía (<i>Citrullus lanatus</i>) inoculadas mecánicamente con <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV) y resultados de absorbancia (405 nm) en la prueba DAS-ELISA para ZYMV.....	60
Tabla 9. Coeficientes de correlación entre lecturas de absorbancia (405 nm) en la prueba DAS-ELISA de <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV) y severidad de síntomas en accesiones inoculadas mecánicamente con ZYMV.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cronología de ensayos para experimento con cepas de <i>Papaya ringspot virus</i> recolectadas en Puerto Rico.....	38
Figura 2. Plantas de Waltham inoculadas mecánicamente con cepas de <i>Papaya ringspot virus</i> en el invernadero. (A) Plantas inoculadas con cepa estándar 231. (B) Plantas inoculadas con cepas 874. (C) Plantas inoculadas con cepas 903.....	42
Figura 3. Valores de absorbancia (405 nm) obtenidos de una pruebas DAS-ELISA para <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV) en plantas de Waltham (n=3) inoculadas mecánicamente con cepas de PRSV en Ensayo 1. Los distintos símbolos representan cada categoría de severidad donde 0=sin síntomas y 3=síntomas severos. La cepa 231 corresponde a la cepas estándar de PRSV y la 239 es la cepa estándar de ZYMV.....	43
Figura 4. Valores de absorbancia (405 nm) obtenidos de una prueba DAS-ELISA para <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV) en plantas de Waltham (n=2 ó n=6) inoculadas mecánicamente con cepas de PRSV en Ensayo 2. Los distintos símbolos representan cada categoría de severidad donde 0=sin síntomas y 3=síntomas severos. C=plantas inoculadas solo con amortiguador (controles negativos). La cepa 231 corresponde a la cepas estándar de PRSV y la 239 es la cepa estándar de ZYMV	44
Figura 5. Valores de absorbancia (405 nm) obtenidos de una prueba DAS-ELISA para <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV) en plantas de Nigerian Local (n=2 ó 3) inoculadas mecánicamente inoculadas con cepas de PRSV en Ensayo 3. Todas las plantas resultaron con severidad=0 (sin síntomas de virus). C=plantas inoculadas solo con amortiguador (controles negativos). La cepa 231 corresponde a la cepas estándar de PRSV y la 239 es la cepa estándar de ZYMV	47
Figura 6. Valores de absorbancia (405 nm) de una prueba DAS-ELISA para <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV) en 11 accesiones de sandía (<i>Citrullus lanatus</i>) y dos variedades comerciales ‘Crimson Sweet’ (CS) y ‘Sugar Baby’ (SB) inoculadas mecánicamente con ZYMV. Los símbolos diferentes representan cada una las categorías para severidad en la primera hoja donde 0=sin síntomas y 3=síntomas severos. Número de plantas utilizadas: 8 a 16.....	56
Figura 7. Valores de absorbancia (405 nm) de una prueba DAS-ELISA para <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV) en 11 accesiones de sandía (<i>Citrullus lanatus</i>) y dos variedades comerciales ‘Crimson Sweet’ (CS) y ‘Sugar Baby’ (SB) inoculadas mecánicamente con ZYMV. Los símbolos diferentes representan cada una las categorías para severidad en la tercera hoja donde 0=sin síntomas y 3=síntomas severos. Número de plantas utilizadas: 8 a 16.....	57
Figura 8. Valores de absorbancia (405 nm) de una prueba DAS-ELISA para <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV) en 11 accesiones de sandía (<i>Citrullus lanatus</i>) y dos variedades comerciales ‘Crimson Sweet’ (CS) y ‘Sugar Baby’ (SB) inoculadas mecánicamente con	

ZYMV. Los símbolos diferentes representan cada una las categorías para severidad en la quinta hoja donde 0=sin síntomas y 3=síntomas severos. No todas las plantas estuvieron suficientemente desarrolladas para tener la quinta hoja al momento de la evaluación. Número de plantas utilizadas: 5 a 15.....

58

Figura 9. Valores de absorbancia (405 nm) de una prueba DAS-ELISA para *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) en 11 accesiones de sandía (*Citrullus lanatus*) y dos variedades comerciales ‘Crimson Sweet’ (CS) y ‘Sugar Baby’ (SB) inoculadas mecánicamente con ZYMV. Los símbolos diferentes representan cada una las categorías para severidad en la séptima hoja donde 0=sin síntomas y 3=síntomas severos. No todas las plantas estuvieron suficientemente desarrolladas para tener la séptima hoja al momento de la evaluación. Número de plantas utilizadas: 4 a 15.....

59

1. INTRODUCCIÓN

Varios virus afectan las cucurbitáceas en las regiones de Florida y el Caribe. Un estudio de incidencia viral realizado en febrero 2001 a febrero 2002 en Puerto Rico reveló que *Papaya ringspot virus* (PRSV-W=WMV-1) y *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) se encuentran entre los principales virus que afectan las cucurbitáceas en la isla (Paz-Carrasco &Wessel-Beaver, 2002). Estos dos virus son de la familia *Potyviridae*, una familia de importantes virus que limitan la producción de las cucurbitáceas a nivel mundial (Lecoq et al, 1998).

En el 2003 se reportó en el estado de Florida una nueva enfermedad viral conocida como el marchitamiento súbito de la sandía (“watermelon vine decline” o WVD, por sus siglas en inglés) causando serios impactos económicos (Adkins et al., 2007). Durante los mismos años que Paz-Carrasco y Wessel-Beaver (2002) realizaron catastros de virus en Puerto Rico, investigadores de la Universidad de Florida realizaron un estudio similar en Florida (Wessel-Beaver, comunicación personal). Mediante ese estudio, notaron una clorosis intervenal en calabacín (*Cucurbita pepo*) que no era causada por ninguno de los virus comunes identificados en Florida y comenzaron a investigar la causa de este problema. Mediante pruebas de rango de hospederos, se ha demostrado que el virus se limita a la familia *Cucurbitaceae* (Webb et al., 2006). Al inocular la sandía [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. y Nakai] con el aislado no identificado, encontraron síntomas más severos, causando marchitez súbita provocando la muerte de la planta. Finalmente en el 2007 investigadores trabajando en Florida identificaron el *Squash vein yellowing virus* (SqVYV) como el agente causal de WVD (Adkins et al., 2007). Los síntomas que produce SqVYV son amarillamiento de venas, necrosis de brotes y anillo necrótico dentro del fruto, marchitez de las hojas y en plantas con infección severa la muerte súbita del cultivo a pocas semanas antes de la cosecha. SqVYV es también de la familia *Potyviridae*, así

que esta familia representa una amenaza importante a la producción de cucurbitáceas en Florida y el Caribe.

Se cree que en Puerto Rico el SqVYV también es el responsable de WVD, el cual ha causado grandes pérdidas económicas a los productores de sandía principalmente del área sur de Puerto Rico. El WVD descrito por Estévez de Jensen, et al. (2006) y Polanco-Florián (2009) afecta la producción de sandía en el área sur de Puerto Rico impactando negativamente el rendimiento del cultivo. La incidencia de WVD fue de 100% en tres fincas del municipio de Santa Isabel influyendo negativamente en el rendimiento del cultivo (Estévez de Jensen et al., 2006). En el caso del cultivo de sandía se han detectado plantas infectadas por ZYMV, PRSV, y posiblemente SqVYV a la misma vez (Polanco-Florián, 2009). Kosaka y Fukunishi (1997) han observado que plantas que presentan co-infección viral exhiben síntomas muchos más severos en la mayoría de los casos. En 2007 se comprobó la transmisión por moscas blancas en Puerto Rico (Rodriguez et al., 2007) y en 2011 fueron obtenidas secuencias genómicas correspondientes al SqVYV, comprobando su ocurrencia en Puerto Rico (Torrez y Rodriguez, comunicación personal).

En Puerto Rico las cucurbitáceas de mayor importancia son la calabaza (*Cucurbita moschata*) y la sandía. Ambos cultivos se siembran en la misma área de la costa sur de Puerto Rico. Cada cultivo sirve como un posible acervo de virus de la familia *Potyviridae* que pueden infectar el otro cultivo. Por esta razón se interesa estudiar los virus pertenecientes a la familia *Potyviridae* en ambos cultivos.

Actualmente se cuenta con un programa para incorporar resistencia a ZYMV y PRSV en calabaza. Es por eso que se realizaron experimentos en *C. moschata* donde el objetivo era estudiar en comportamiento biológico de PRSV y la resistencia a ZYMV en accesiones de sandía

(*Citrullus sp.*). Hay varios trabajos realizados sobre la búsqueda de resistencia a ZYMV y PRSV en la sandía (Strange et al, 2002, Guner y Wehner, 2008, entre otros).

No existen variedades comerciales de sandía que posean resistencia genética a WVD (Wessel-Beaver, comunicación personal). Al no encontrar resistencia en las variedades comerciales, el siguiente paso es evaluar materiales apropiados de una colección de un banco de germoplasma (Marshall, 1990). En el caso de la sandía, una búsqueda de resistencia a una nueva enfermedad debería concentrarse en la evaluación de germoplasma de su centro de origen en África.

Recientemente, virólogos y fitomejoradores ha realizado esfuerzos importantes en la identificación de fuentes de resistencia en colecciones de germoplasma (Lecoq et al., 1998). Kousik et al. (2009) evaluaron la colección central (“Core Collection”) de germoplasma de *Citrullus spp.* mantenida por el Departamento de Agricultura (USDA) de los Estados Unidos para resistencia a SqVYV. De 218 accesiones evaluadas en ese estudio ninguna demostró resistencia completa al virus. Ellos observaron moderada resistencia en algunas accesiones las cuales obtuvieron un progreso menor de la enfermedad en comparación con los cultivares susceptibles ‘Sugar Baby’, ‘Mickey Lee’ y ‘Crimson Sweet’. En este trabajo se evaluaron accesiones adicionales de la colección, en particular accesiones de África pero incluyendo una muestra representativa de accesiones de todas partes del mundo. Los objetivos generales del estudio son:

1. encontrar genotipos que demuestren resistencia a SqVYV
2. estudiar el comportamiento biológico en calabaza y sandía a nuevas cepas de PRSV recolectadas en Puerto Rico

3. determinar si la resistencia a ZYMV en accesiones previamente identificadas como resistentes se mantienen en la presencia de la cepa estándar de ZYMV en Puerto Rico

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Sandía

La sandía conocida en Puerto Rico como melón de agua, pertenece a la familia *Cucurbitaceae*, al igual que el melón (*Cucumis melo* L.), pepinillo (*Cucumis sativus* L.) y la calabaza (*Cucurbita spp.*), entre otros. La producción de cucurbitáceas es de gran importancia agrícola, ya que sus frutos son parte de la dieta de la mayoría de los países del mundo (Robinson y Decker-Walters, 1997). A nivel mundial la cucúrbita de mayor importancia económica es la sandía (FAO, 2009). Hay cuatro especies que componen el género *Citrullus*: *C. lanatus*, *C. ecirrhosus*, *C. colocynthis* y *C. rehmii*. (Juárez, 2006). La sandía es nativa del sur de África donde crece en forma silvestre y su cultivo data de aproximadamente 4,000 años (Robinson y Decker-Walters, 1997).

Actualmente la sandía está extendida por todo el mundo, cultivándose intensamente en las regiones tropicales y subtropicales del planeta. La sandía se siembra en más de 96 países con una producción de 93,173,368 toneladas métricas a nivel mundial para 2007, siendo China el mayor productor con un 67.7% de la producción mundial (FAO,2009). En Puerto Rico (PR) la sandía se encuentra principalmente en la zona sur oeste de la isla siendo el séptimo frutal de mayor importancia económica (Dept. de Agricultura de PR, 2010). Para el año 2008-2009 se reportó en PR un ingreso bruto de \$2,124,000 en una producción de 4,361,214 kg de sandía. Es un cultivo importante consumido principalmente como fruta fresca. Las enfermedades virales en la sandía son el principal factor limitante en la producción alrededor del mundo (Guner and Wehner, 2008).

2.2 Virus en Plantas

En el 1991 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) define especie de virus como una clase politética que constituye un linaje de replicación y ocupa un nicho ecológico en particular. Los virus son parásitos obligados intracelulares que afectan a la mayor parte de los seres vivos (Astier et al., 2007). Los virus de plantas tienen un impacto económico negativo en la agricultura cuando producen reducciones significativas en el rendimiento o en la calidad de los productos vegetales (Matthews, 1991; Agrios 2005). Estos organismos son formados por una o varias moléculas de ácido nucleico, normalmente protegidas por una cubierta de proteínas, o proteínas y lipoproteínas. Los ácidos nucleicos pueden ser DNA (ácido desoxirribonucleico) y RNA (ácido ribonucleico), formados de cadena sencilla o doble de ácidos nucleicos, con sentido positivo, negativo o ambos.

Los virus realizan su replicación en el interior de las células del huésped y utilizan el mecanismo metabólico de las células de su hospedero (Astier et al., 2007). De esta forma producen muchas copias del virus original perjudicando la célula y en algunos casos causando muerte o alteración de la fisiología celular. Los virus en plantas son muy difíciles de controlar ya que no pueden controlarse con tratamientos químicos; una vez el tejido de la planta es infectado no se puede curar. Ante la imposibilidad de la lucha directa, el control es preventivo y se basa en evitar la infección o minimizar sus efectos. La resistencia genética es la mejor solución en muchos casos. Para ensayar otros métodos en el control de virus se requiere conocimientos con el virus involucrado y su epidemiología para encontrar la vulnerabilidad para la interrupción del ciclo de la infección. Principalmente lo que se trata de controlar es el vector que transmite el virus. Algunos virus pueden ser transmitidos a través del polen, semillas, equipo agrícola, y

propagación vegetativa (Hull, 2002; Agrios, 2005). Otra forma de lograr controlar enfermedades causadas por virus es implementando medidas de saneamiento (Agrios, 2005).

2.3 Interacción Virus-Vector

La mayoría de los virus de plantas son absolutamente dependientes de un vector para propagación de una planta a otra. Aunque un número de diversos tipos de organismos son vectores de diferentes virus de plantas, los hemípteros que se alimentan del floema son los más comunes y transmiten la gran mayoría de virus de plantas (Ng y Bryce, 2006). Los virus poseen tres mecanismos de transmisión en plantas: no persistente, semi-persistente y persistente. Los virus transmitidos de forma no persistente son retenidos en el estilete del insecto vector. Transmiten el virus a las plantas sólo por segundos hasta minutos después de su adquisición, donde el vector pierde la capacidad de infectar después de la muda. Estos virus no necesitan periodo de latencia, el virus no se multiplica en el insecto vector ni se transmite a la progenie y no requieren un tejido vegetal específico. La transmisión semi-persistente permite que el virus infecte las plantas de horas a días después de su adquisición y pierden esta capacidad después de la muda del vector (Nault, 1997). De manera persistente los insectos pueden transmitir el virus a las plantas por largos periodos de tiempo (días y semanas) incluyendo después de la muda y a través de toda su vida (Watson y Roberts, 1939). El vector es la única forma de diseminación de estos virus en la naturaleza. Se movilizan del lumen del tracto digestivo a la hemolinfa de los insectos o a otros tejidos y finalmente a las glándulas salivares (Astier et al., 2007).

2.4 Diagnóstico de Enfermedades Virales en Plantas

Se realizan diagnósticos preliminares de infecciones virales mediante la sintomatología que presentan las plantas (Clark & Bar-Joseph, 1984; Torrance & Jones, 1981). Luego se conducen pruebas para determinar el tipo de patógeno presente en el tejido de la planta. Entre las técnicas más comúnmente utilizadas para la identificación de virus de plantas se encuentran las pruebas serológicas y de reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR, por sus siglas en inglés). El método más utilizado en la actualidad como prueba serológica es conocido por sus siglas en inglés como ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) (Clark y Bar-Joseph, 1984). Es un método específico, sensible, confiable, rápido, fácil de realizar y aplicable a un gran número de muestras. Otra prueba serológica comúnmente utilizada es la RIPA (“Rapid Immunofilter Paper Assay”) la cual consta de latex cubierto con anticuerpo (Tsuda et al., 1992).

El PCR es una técnica que imita la forma en que el DNA se replica en el interior de la célula ofreciendo una alternativa a la clonación basada en vectores como medio de generar numerosas copias de DNA a partir de una muestra (Agrios, 2005). La mayoría de los virus que infectan las plantas son de RNA. En estos casos se realiza un RT-PCR donde se utiliza la enzima transcriptasa en reversa para covertir RNA a cDNA (copia DNA) y posteriormente realizar el PCR con cebadores específicos para la identificación de dichos virus (Astier et al., 2007). Esto hace posible la detección de secuencias virales amplificando una cadena de ácidos nucleicos de caracterización. La amplificación se visualiza mediante la observación de bandas separadas por electroforesis en un gel con bromuro de etidio. Esta prueba es principalmente adaptada para detectar virus donde no hay una prueba de detección serológica disponible.

2.5 Virus en Cucurbitáceas

Las enfermedades virales en las cucurbitáceas constituyen un sistema complejo y cambiante de patógenos (Lecoq et al., 1998). La diversidad de los virus en las cucurbitáceas se debe en parte a la diversidad genética y ecológica de las cucurbitáceas hospederas. Los síntomas típicos generales se dividen en tres categorías (Blancard et al., 1991 citado por Lecoq et al., 1998): 1) mosaico asociado con deformaciones, reducción del tamaño de la hoja, rugosidad, enanismo; descoloración y deformación de frutos haciéndolos no mercadeables, 2) amarillamiento en hojas viejas y eventualmente todas las hojas se tornan amarillas y engrosadas; se reduce la producción de frutos, la calidad del fruto por lo general no se afecta, y 3) necrosis comenzando con puntos necróticos de diferentes tamaños en hojas o de forma generalizada, eventualmente causando la muerte de la planta; los frutos no alcanzan la madurez y desarrollan necrosis. En el campo se pueden encontrar varios virus infectando una misma planta principalmente de la familia *Potyviridae* (Lecoq et al., 1998). Algunos nuevos virus probablemente puedan estar presentes en cucurbitáceas por un largo tiempo, pero se encuentran sin identificar por que los síntomas están enmascarados por otro virus o se han atribuido a causas como desordenes nutricionales o fisiológicos.

En PR se han reportado virus infectando plantas de la familia de las Cucurbitaceae tales como ZYMV, PRSV, WMV, y en menor incidencia, SqMV (*Squash mosaic virus*) de la familia Secoviridae, TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) de la familia Bunyaviridae y Geminivirus (Paz-Carrasco y Wessel-Beaver, 2002). Tres de ellos pertenecen a la familia *Potyviridae*: ZYMV, PRSV y WMV. Se han distribuido mundialmente, causando reducciones en el rendimiento de melón, pepinillo, calabacín y sandía (Lecoq et al., 1998).

2.6 *Squash vein yellowing virus*

En el 2003 se reportó SqVYV en calabacín (*Cucurbita pepo*, conocido en inglés como “summer squash”) y luego en sandía (*Citrullus lanatus*) (Webb et al. 2003, Adkins et al. 2007). El rango de hospederos, modo de transmisión y la secuenciación del genoma indicaron que SqVYV, transmitido por mosca blanca, no había sido previamente descrito (Baker et al., 2008). Este virus ha sido designado *Squash vein yellowing virus* (SqVYV) y pertenece al género *Ipomovirus*, y a la familia *Potyviridae* (Adkins et al. 2007, Li et al. 2008). Es la misma familia de virus al cual pertenece ZYMV, WMV y PRSV. Adkins et al. (2007) han determinado que SqVYV causa la marchitez súbita en sandía (WVD). El SqVYV se ha distribuido por el suroeste y oeste central del estado Florida y por el sur de Indiana (Adkins et al., 2007; Egel y Adkins, 2007). El SqVYV ha sido el mayor limitante para la producción de sandía en el suroeste y oeste central del estado de Florida donde se estima que la pérdidas económicas fueron de 60 a 70 millones de dólares para el 2004 (Hubber, 2006). La enfermedad WVD ha causado grandes pérdidas en el suroeste de Puerto Rico (Polanco-Florián, 2009). Los síntomas de clorosis intervenal, hojas erectas y amarillamiento limitado a los bordes de las hojas, marchitez y muerte repentina de la planta fueron observados en el 2009 en Guánica y Santa Isabel (Acevedo-Torres, 2012). Acevedo-Torres (2012) observó aclaramiento en las venas y clorosis intervenal en las hojas en plantas de calabaza ‘Waltham’ en Mayagüez. Se identificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) a SqVYV como el agente causal de estas pérdidas causadas por marchitez súbita en Puerto Rico en el 2011.

El SqVYV es transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*, Biotipo B) y mecánicamente, pero no se transmite por áfidos (*Myzus persicae*) (Adkins et al., 2007). Los virus transmitidos por mosca blanca causan enfermedades que ocurren a lo largo del Trópico. La

mosca blanca es un insecto pequeño y de corto ciclo de vida, pero bajo condiciones favorables puede multiplicarse para formar enormes poblaciones a una tasa extremadamente rápida (Byrne y Bellows, 1991). Algunas especies incluidas en el género *Bemisia* son eficientes vectores de virus afectando cultivos de importancia económica en muchas partes de mundo.

Actualmente se conoce que el rango de hospederos de SqVYV está limitado a la familia de las cucurbitáceas incluyendo a malezas *Momordica charantia* y *Melothria pendula* (Adkins et al., 2008). En el otoño 2007 alrededor de una siembra de sandía en Florida encontraron plantas de *M. charantia* infectadas con SqVYV indicando que estas plantas podían servir como hospederos reservorio del virus. No se observaron síntomas obvios de la enfermedad en *M. charantia*, pero se ha demostrado definitivamente que la mosca blanca es capaz de transmitir el SqVYV de *M. charantia* a plantas de sandía. La *Melothria pendula* fue experimentalmente infectada con SqVYV (Adkins et al. 2008). Los síntomas más dramáticos de SqVYV han sido observados en *C. pepo* y sandía (Adkins et al., 2007).

Los daños causados por WVD han sido el principal factor limitante en el cultivo de sandía en Florida (Kousik et al., 2009), causando pérdidas devastadoras a los productores del sureste y la parte oeste central de Florida (Huber, 2006; Roberts et al., 2005). Las pérdidas económicas estimadas causadas por WVD fue de 60 a 70 millones de dólares en Florida para el 2004 (Hubber, 2006). Los síntomas de marchitez ocurren típicamente antes de la cosecha, los tallos colapsan rápidamente, causa epinastia y necrosis de hojas y tallos (Adkins et al., 2007; Hubber, 2006; Roberts et al, 2005). La parte exterior de la fruta parece normal, al ser cortada se observa degradación de la pulpa y cáscara, llegando a no ser mercadeable (Adkins et al., 2007; Hubber, 2006; Roberts et al, 2005).

2.7 *Papaya ringspot virus*

El *Papaya ringspot virus* (PRSV) es otro de los virus que más se ha encontrado afectando la familia *Cucurbitaceae*. Este virus fue descrito por primera vez en 1949 como una enfermedad en árboles de papaya en donde presentaba manchas anilladas en las hojas y frutos (Jensen, 1949). El PRSV se divide en dos grupos: PRSV-P el cual infecta plantas de la familia *Caricaceae*, *Cucurbitaceae* y *Chenopodiaceae* y PRSV-W que infecta *Cucurbitaceae* y *Chenopodiaceae* (Tripathi et al., 2008). Entre los síntomas comúnmente reportados se encuentran: lesiones aceitosas en forma de anillos concéntricos sobre tallos, hojas y pecíolos, mosaicos bien severos, deformaciones en hojas y frutos, clorosis en hojas, aclaramiento de venas en hojas jóvenes, aborto de flores y hasta necrosis sistémica en algunos cultivares de melón (Lecoq et al., 1998; Purcifull et al., 1984, Tripathi et al., 2008). Sus vectores son los áfidos y la transmisión se da de manera no persistente. La resistencia para PRSV se ha encontrado en sandía (*Citrullus lanatus*) (Strange et al., 2002), pepinos (*Cucumis sativus*) (Wang et al., 1984; Wai y Grument, 1995) y varias especies de *Cucurbita* spp. (Provvidenti, 1993; Maluf et al., 1986; Maluf et al., 1997). En la especie *C. moschata* se ha encontrado resistencia al PRSV en los cultivares ‘Nigerian Local’ (Brown et al., 2003) y ‘Duda’ (De Oliveira et al., 2003).

2.8 *Zucchini yellow mosaic virus*

El mosaico amarillo del calabacín causado por *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) induce mosaico extremadamente severo y deformación en hojas y frutos en todas las cucúrbitas cultivables (Lecoq et al., 1998). Las infecciones en etapas tempranas del cultivo pueden ocasionar pérdidas económicas por completo. Este virus es transmitido por áfidos de manera no persistente y mecánica. Es uno de los virus más encontrado afectando las cucurbitáceas. Se ha

encontrado resistencia para ZYMV en pepinillos, melón, sandía, *Cucurbita moschata* y especies silvestres de *Cucurbita*. Se ha encontrado altos niveles de resistencia en *Cucurbita ecuadorensis* (Ecuador) y *Cucurbita moschata* ‘Nigerian Local’ controlando cepas de ZYMV de África, América, Asia, Europa y Oceanía (Provvidenti, 1997).

2.9 Fitomejoramiento en Sandía

Las características del cultivo de sandía han sido mejoradas a través de los años por medio de programas de fitomejoramiento (Juárez, 2006). Alrededor del mundo, investigadores en el sector público y privado han desarrollado nuevos cultivares con mejores características agronómicas. El énfasis ha sido en la producción de variedades resistentes a enfermedades, mejor contenido nutricional, variados tamaños y formas del fruto, así como diversidad en color y tonalidad de pulpa. Aunque el esfuerzo investigativo para mejorar características de la sandía ha sido notable, todavía el rendimiento del cultivo se ve afectado grandemente por un sin número de enfermedades y plagas.

Las enfermedades virales causan importantes pérdidas económicas en las cucurbitáceas por todo el mundo (Lecoq et al., 1998). Se han encontrado infectando naturalmente a las cucurbitáceas a más de 35 virus caracterizados pertenecientes a los grupos principales de virus de plantas (Brunt et al., 1996; Lovisolo, 1980; Provvidenti, 1986, 1996). El control de las enfermedades virales es complicado, ya que no existe un método químico para controlar directamente el virus. Actualmente se toman medidas de control químico contra los vectores, que son los responsables de la transmisión de las partículas virales a las células de las plantas.

Hasta el momento, el método más efectivo para el manejo de enfermedades virales es mediante la incorporación de genes de resistencia en cultivares de importancia agronómicas

(Matthews, 1991; Lecoq et al., 1998; Agrios, 2005). Se han descrito varios métodos que han tenido éxito en la incorporación de genes de resistencia en ciertos cultivos específicos. Tradicionalmente se ha utilizado la implementación de técnicas de fitomejoramiento, donde mediante varias generaciones de cruces y selección, se logran incorporar genes que confieren resistencia de una planta a otra altamente relacionada. Por tal razón es de suma importancia identificar genotipos con resistencia o cierta tolerancia a plagas y enfermedades que afectan con mayor frecuencia al cultivo de sandía.

Más de 1200 accesiones (PI) de sandía se encuentran en la colección de USDA localizadas en Griffin, Georgia. Los detalles de la colección de PI pueden ser obtenidos de la base de datos “Germoplasm Resources Information Network” que aparece en línea a través de la página <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/crop.pl?151>. La colección de germoplasma de sandía ha sido evaluada para resistencia de varias enfermedades causadas por virus.

Varias accesiones (PI) resistentes han sido utilizadas por fitomejoradores de sandía para desarrollar cultivares resistentes a virus de importancia económica. Kousik et al. (2009) evaluaron 218 accesiones de la colección central de germoplasma de sandía en Fort Pierce, Florida. El estudio incluyó evaluaciones a nivel de campo e invernadero utilizando ‘Crimson Sweet’ y ‘Mickey Lee’ como testigos. En el invernadero de Florida mencionado en el estudio anterior, las plántulas fueron inoculadas mecánicamente y se utilizó una escala de 1 a 9 (1 = planta sana, 9 = planta muerta) para cuantificar el grado de severidad de los síntomas. Las variedades comerciales obtuvieron una media de 9 lo que indican que son susceptibles a la enfermedad mientras que siete de las accesiones tuvieron una media de severidad menor de 4.0. Los testigos y el grupo de PI que mostraron la mayor resistencia fueron evaluados en el campo. Durante los dos años de ensayos de campo ‘Crimson Sweet’ y ‘Mickey Lee’ desarrollaron

enfermedad severa antes y más rápidamente que los PI resistentes comparados en el estudio. Dos PI de *Citrullus colocynthis* de zona desértica de Irán desarrollaron significativamente menos enfermedad que las variedades comerciales antes mencionadas. También tres accesiones de *Citrullus lanatus* var. *lanatus* del sur de África (PI 482266, PI 381734 y PI 392291) y otra *Citrullus lanatus* var. *citroides* (PI 299378) desarrollaron significativamente menos enfermedad en comparación con las variedades comerciales de Estados Unidos. Pero ningún PI evaluado demostró ser completamente resistente a SqVYV según Kousik et al. (2009).

Guner y Wehner (2008) reportaron resistencia a PRSV-W en sandía en PI 244017, PI 244018, PI 244019, PI 482342, PI 482318, PI 482379, PI 485580 y PI 595203. Esta resistencia es conferida por un solo gen (*prv*) de manera recesiva. PI 595203 también mostró resistencia a ZYMV y moderada resistencia a WMV. En Florida evaluaron 1613 accesiones del germoplasma de sandía para resistencia a ZYMV-FL (una cepa de Florida) y encontraron un alto nivel de resistencia en PI 386019, PI 490377, PI 596662, PI 485580, PI 560016, PI 494528, PI 386016, PI 482276 y PI 595201. La resistencia encontrada para ZYMV es conferida por un solo gen recesivo llamado *zym* (Provvidenti, 1991). Se conocen al menos 25 cepas de ZYMV que han sido identificadas (Guner y Wehner, 2008). La virulencia, severidad de síntomas y la habilidad de inducir síntomas en plantas con resistencia puede diferir entre cepas. ‘Nigerian Local’ tiene alto nivel de resistencia a ZYMV-FL y ZYMV-CT (cepa de Connecticut), pero algunos cultivares con resistencia derivada de esta fuentes tienen resistencia a una de las cepas y no a la otra (Provvidenti, 1997).

3. EXPERIMENTO 1

Evaluación de Germoplasma de Sandía (*Citrullus lanatus*) para Identificar Fuente de Resistencia a la Marchitez Súbita de la Sandía (WVD) Causada por SqVYV.

3.1 OBJETIVOS

1. Desarrollar un protocolo para mantener el inóculo del SqVYV causante de WVD en Puerto Rico.
2. Establecer una escala de severidad de síntomas para WVD para facilitar la evaluación de germoplasma de sandía.
3. Evaluar germoplasma de sandía no incluido en el estudio de Kousik et al. 2009 para resistencia a SqVYV.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Recolección de Tejido de SqVYV, Producción y Mantenimiento de Inóculo.

Se muestrearon fincas comerciales y experimentales en la zona sur de P.R. donde se recolectó tejido de plantas con síntomas de WVD. Se extrajo una planta completa (incluyendo la corona de la base del tallo) en estado de madurez. Una investigación no publicada en Florida sugería que un elevado título viral de SqVYV se concentraba en la base del tallo (Scott Adkins, comunicación personal).

Las muestras con aparente infección de WVD fueron evaluadas para ZYMV y PRSV utilizando pruebas DAS-ELISA (“double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay”) (Clark y Adams, 1997) y para potyvirus se utilizó una prueba indirecta. En este trabajo se designó estas pruebas ZYMV, PRSV y POTY, respectivamente. Las pruebas serológicas fueron hechas utilizando “kits” comerciales de Agdia® (Elkhart, Indiana) siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante. El procedimiento general de ELISA para las muestras recolectadas consistió en colocar 1 g de tejido de hoja en una bolsa plástica pequeña a la cual se añadió 1 ml de la solución amortiguadora de extracción. Se utilizó un rolo con bolines para macerar el tejido y extraer la savia. Luego de la misma bolsita se extrajo 100 µl del macerado y se colocó en las fosas de una placa de poliestireno. Para las pruebas DAS-ELISA (ZYMV y PRSV) se utilizó una microplaca de poliestireno cubierta con el anticuerpo seguido por la adición de la muestra (antígeno) y posteriormente el conjugado enzimático. Para la prueba indirecta de POTY se utilizó una microplaca primeramente cubierta con la muestra sucedida por la adición de un anticuerpo y posteriormente el conjugado enzimático. En cada prueba ELISA se utilizaron controles positivos y negativos de Agdia® (Elkhart, Indiana). Finalmente se añadió la solución con el sustrato PNP (*p*-nitrophenol) en cada una de las fosas para dar color (amarillo) a la

reacción en cada una de las pruebas. Para obtener de manera cuantitativa el virus presente, se tomaron lecturas por espectrofotometría de la absorbancia a 405 nm mediante un lector óptico (Dynex Technologies Inc., Chantilly, VA). Además se obtuvieron datos visuales de los resultados indicando cuáles muestras fueron positivas por la coloración amarilla que adquirió la prueba indicando la presencia de partículas virales. Las fosas que permanecieron translúcidas o incoloras se identificaron como negativas para el virus probado (prueba ZYMV y PRSV) o para la familia *Potyviridae* (prueba POTY). Como no existe una prueba serológica específicamente para SqVYV se utilizaron los resultados de pruebas ELISA de PRSV, ZYMV y POTY como un indicador indirecto de la presencia de un virus diferente a PRSV y ZYMV y a la vez Potyvirus como lo es el SqVYV. El tejido de las plantas con síntomas de WVD que resultaron positivas a POTY, pero negativas para PRSV y ZYMV fue utilizado como fuente de inóculo en la prueba de inoculación mecánica. Tejido con resultados positivos para PRSV, ZYMV o con infecciones mezcladas fue eliminado.

En el invernadero se sembraron semillas de varias cucurbitáceas (sandía ‘Crimson Sweet’, calabaza ‘Waltham’ (*C. moschata*) y calabacín “Yellow Crookneck” (*C. pepo*) en bandejas con Promix PGX® (Premier, Hort Inc., Quakertown, PA) como sustrato y se regaron manualmente con agua. Luego fueron transplantadas a tiesto de 4 pulgadas con Promix como sustrato. La temperatura varió entre 33°C a 38°C durante el día y no se utilizaron luces artificiales. Se mantuvo el invernadero libre de insectos utilizando aplicaciones del insecticida sistémico marathon (imidacloprid). Al cabo de dos a tres semanas las plántulas fueron inoculadas mecánicamente con tejido recolectado del campo, que presentó síntomas de WVD y que resultaron negativos para ZYMV y PRSV, pero positivo a POTY de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente.

Para realizar las inoculaciones mecánicas se utilizó 1 g del tejido infectado recolectado de la finca comercial Odito Farm, Santa Isabel y se añadió con 10 ml de amortiguador en un mortero frío donde el tejido fue macerado. Se usó un amortiguador 20 mM de sulfato de sodio al 0.1% (pH 7) y 1% de celite anteriormente descrito por Adkins et al. (2007, 2008). Se colocó carborúmdum de 800 mesh sobre los cotiledones y la primera hoja verdadera para causar micro-lesiones, facilitando el contacto del virus a las células de la planta. Una gaza mojada con inóculo se friccionó suavemente sobre los cotiledones y la primera hoja. Posteriormente se regaron las plantas inoculadas para remover completamente el abrasivo del tejido de la planta. Se comparó la sintomatología de plántulas de calabaza *C. moschata*, calabacín *C. pepo* y sandía *Citrullus lanatus*. A los 15 días después de las inoculaciones se evaluó los síntomas de las plantas inoculadas de sandía, calabaza y calabacín con síntomas de virus, las cuales se utilizaron para inocular nuevas plantas de estas mismas especies. Se verificó mediante pruebas serológicas ELISA que las plantas inoculadas no estuviesen infestadas por los virus ZYMV y PRSV.

3.2.2 Escala de Severidad de Síntomas para WVD

Para este estudio se utilizaron 222 accesiones sandía de la colección del USDA (Apéndice-Tabla 1). Cada accesión se identificó con el número de introducción o “plant introduction o PI number”. Se tomó en consideración los resultados del trabajo realizado por Kousik et al. (2009) donde evaluaron la colección central de sandía. Esto sirvió como guía para solicitar el germoplasma a ser evaluado en esta investigación. De la Tabla 1 de Kousik et al. (2009), se seleccionaron accesiones de sandía con una media de severidad ≤ 5.0 , para un total de 17 PI. Dos de estas accesiones no se encontraron disponibles (PI 381734 y PI 381749). El origen más común de estas accesiones fue el sur de África. La mayoría de las 222 accesiones (incluidos

en este número están las 15 accesiones resistentes del estudio de Kousik et al., 2009) provenientes del sur de África. Las accesiones fueron seleccionadas de la colección general considerando el país de origen, y tratando de no incluir muchas accesiones de la misma área geográfica. Además se incluyeron accesiones representativas de otros lugares del mundo. Con la excepción de las 15 accesiones identificadas como resistentes por Kousik et al. (2009), no se incluyeron accesiones previamente evaluadas con SqVYV.

La fuente del virus empleado fue de tejido fresco de las plantas en el invernadero de *Citrullus lanatus* ‘Crimson Sweet’ o *Cucurbita moschata* ‘Waltham’ inoculadas con SqVYV que resultaron positivas a las pruebas moleculares y serológicas de dicho virus únicamente (objetivo 1). Se realizó un ensayo preliminar con 50 de las accesiones de sandía. Para esto se escogieron aleatoriamente 33 de las accesiones de sandía para realizar inoculaciones mecánicas, incluyendo las mejores 17 identificadas por Kousik et al. (2009). De acuerdo a estos resultados se desarrolló una escala para evaluación de severidad a los síntomas observados en el campo utilizando valores de 0 al 9 según Bioversity International (2007). Se tomó en consideración la escala utilizada por Kousik et al. (2009) y Bioversity International (2007) para generar una escala modificada. La escala utilizada en este estudio fue la siguiente:

0 = planta libre de síntomas

1= pocos síntomas

2= leve clorosis, puntos cloróticos, sin necrosis

3=leve clorosis/aclaramiento de venas y/o leve epinastia, no necrosis

4= clorosis/aclaramiento de venas y/o leve epinastia, sin necrosis

5= leve bronceado en el ápice, clorosis en hojas basales y/o estrías necróticas en tallos, peciolo, zarcillos;

6= necrosis en la mayoría de las hojas basales, comienzo de colapso de peciolo;

7= necrosis en casi todas las hojas, colapso total de los peciolo;

8 = necrosis en casi todas las hojas, tallo necrótico y ligero colapso, ápice del tallo muerto;

9 = planta muerta

3.2.3 Evaluación de Germoplasma de Sandía

La fuente del virus utilizado para las inoculaciones mecánicas de las accesiones de sandía en la evaluación de resistencia a la marchitez súbita fue de tejido fresco de las plantas *Citrullus lanatus* ‘Crimson Sweet’ o *Cucurbita moschata* ‘Waltham’ inoculadas con SqVYV que resultaron positivas a las pruebas moleculares y serológicas de dicho virus únicamente (objetivo 1). Se realizó la evaluación de germoplasma en la Finca Alzamora del Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico (UPR) localizada en Mayagüez, PR y en la Estación Experimental Agrícola de la UPR localizada en Lajas, PR (Tabla 1).

Tabla 1. Ensayos realizados para la evaluación de germoplasma de sandía (*Citrullus lanatus*) con sus respectivas localidades y épocas de siembra (Experimento 1).

Ensayo	Localidad	Fechas de siembra
1	Mayagüez	4 de enero de 2010
2	Lajas	9 de febrero de 2010
3	Lajas	18 de junio de 2010
5	Mayagüez	6 de junio de 2011

El diseño experimental fue en bloques completos aleatorizados. Para cada bloque (ensayo) se sembró aleatoriamente una semilla de cada accesión y varias plantas de ‘Sugar Baby’ (SB), ‘Mickey Lee’ (ML) y ‘Crimson Sweet’ (CS) en bandejas de celdas con un diámetro de 3.5

cm, utilizando Promix PGX® (Premier, Hort Inc., Quakertown, PA) como sustrato. Las inoculaciones fueron llevadas a cabo en plantas de 3 a 4 semanas de edad según lo descrito anteriormente. Se inocularon plantas de las variedades comerciales solo con buffer: SB-B, ML-B y CS-B. Al cabo de cinco semanas después de la siembra se hizo el trasplante a la Finca Alzamora en Mayagüez (2 bloques) o la subestación de Lajas (2 bloques). Dado el espacio y trabajo que se requería para cada bloque, se sembraron en diferentes épocas.

Se utilizó riego por goteo, plástico como cubierta, un sistema de espeques y alambre para que la planta se desarrollara verticalmente y fuese evaluada con mayor facilidad. También se emplearon “hamacas” de tela de algodón o plástico para retener los frutos tendidos del alambre. Se llevaron a cabo semanalmente observaciones de la sintomatología utilizando la escala de severidad de síntomas (objetivo 2) hasta finalizar el experimento. Aproximadamente a las 8 semanas luego de la siembra se tomaron muestras de tejido a partir de hojas jóvenes. Las muestras se conservaron mediante bolsas plásticas, en hieleras portátiles, y posteriormente trasladadas al Laboratorio de Dra. Beaver, Recinto Universitario de Mayagüez, para análisis de prueba DAS- ELISA de ZYMV, PRSV y la prueba Indirecta para POTY.

Se analizaron los datos de severidad de síntomas y las lecturas de ELISA con un análisis de varianza utilizando el programa estadístico InfoStat (Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina). Se compararon las medias de severidad de síntomas para SqVYV y lecturas de absorbancia en la prueba ELISA Indirecta de POTY utilizando la prueba de LSD Fisher. Debido a la alta posibilidad de errores tipo I en un estudio con muchos tratamientos se utilizó un nivel de α más conservador de lo normal: 0.01. Para accesiones exhibiendo un grado de resistencia, se observó la consistencia de los datos (severidad, lecturas ELISA) en varios de los bloques del experimento.

3.3 RESULTADOS

Las accesiones evaluadas mostraron una gran diversidad genética en cuanto a follaje, vigor de la planta, tamaño de fruta, color de la fruta, color de semillas y color de pulpa. También se observó mucha variación en cuanto a los días de la germinación de semillas, desarrollo de las plantas y síntomas del virus en estudio. La germinación afectó el número de accesiones en este experimento debido a que en los 4 bloques realizados no germinaron todas las accesiones. De las 222 accesiones sembradas 214 germinaron en al menos un bloque. Al final se realizó el análisis de varianza en bloques completos aleatorizados utilizando las 117 accesiones que germinaron en todos los bloques y los controles ‘Crimson Sweet’, ‘Mickey Lee’ y ‘Sugar Baby’. Las evaluaciones se iniciaron aproximadamente 2 semanas después de las inoculaciones. Se presenta los datos de las semanas 4, 8 y 12. Desde la semana 4 hasta la semana 12 luego de las inoculaciones todas las accesiones presentaron síntomas de virus (Tabla 2). Los primeros síntomas que se observaron al principio del experimento fueron clorosis leve, puntos cloróticos y epinastia en las hojas. A las 12 semanas luego de que las plantas fueron inoculadas la mayoría de las plantas resultaron con síntomas severos tales como: tallos bronceados, necrosis en hojas y/o bejucos y muerte prematura de la planta.

Cuatro semanas después de las inoculaciones la severidad de síntomas de ‘Crimson Sweet’ inoculadas solo con buffer resultó más baja con una media de 0.88 (Tabla 2). Esta fue significativamente diferente a las accesiones 525086, 537274, 378615, 379230, 275632, 512361, 482337, 212288, 482253, 532811, 525088, 485583, 254624, 379252, 326516, 482266, 176913, 167222, 296334, 381733, 431579 y Sugar Baby las cuales obtuvieron una media de 4.75 hasta 7.00. Las accesiones 526237 y Crimson Sweet fueron diferentes a 167222, 296334, 381733, 431579 y Sugar Baby.

Tabla 2. Valores promedios de severidad de síntomas y lecturas absorbancia (405 nm) en la prueba ELISA indirecta de POTY en 117 accesiones de sandía inoculadas mecánicamente con *Squash vein yellowing virus* evaluadas en Mayagüez y Lajas durante el 2010 y 2011.

		Severidad ¹			ELISA-POTY
		Semana 4 ²	Semana 8 ²	Semana 12 ²	Absorbancia*
Controles sin inocular³					
Crimson Sweet		0.88 a	4.63 abcd	5.63 a	0.776 bcd
Mickey Lee		2.38 abcde	4.13 abc	5.63 a	0.765 bcd
Sugar Baby		1.62 abcd	5.62 abcd	7.50 abc	0.698 abcd
Controles inoculados					
Crimson Sweet		1.00 ab	5.38 abcd	6.88 abc	0.897 bcd
Mickey Lee		2.38 abcde	6.13 abcd	7.75 abc	0.889 bcd
Sugar Baby		7.00 f	7.50 abcd	8.75 c	0.766 bcd
Accesión	País de origen				
500334	Zambia	2.25 abcde	5.00 abcd	5.75 ab	0.923 bcd
438675	Mexico	4.50 abcdef	5.75 abcd	6.25 abc	0.893 bcd
482250	Zimbabwe	4.25 abcdef	6.25 abcd	6.25 abc	0.845 bcd
525086	Egipto	4.75 bcdef	6.25 abcd	6.25 abc	0.909 bcd
500310	Zambia	4.25 abcdef	6.25 abcd	6.50 abc	0.889 bcd
500336	Zambia	4.50 abcdef	5.75 abcd	6.50 abc	0.891 bcd
505594	Zambia	4.00 abcdef	7.00 abcd	6.50 abc	0.918 bcd
249010	Nigeria	3.50 abcdef	4.25 abcd	6.75 abc	0.858 bcd
270550	Ghana	4.25 abcdef	5.75 abcd	6.75 abc	0.885 bcd
277994	Turquía	3.75 abcdef	6.75 abcd	6.75 abc	0.977 cd
326516	Ghana	5.00 bcdef	5.50 abcd	6.75 abc	0.824 bcd
482248	Zimbabwe	3.25 abcde	4.50 abcd	6.75 abc	0.914 bcd
482337	Zimbabwe	4.75 bcdef	6.50 abcd	6.75 abc	0.822 bcd
525096	Egipto	4.25 abcdef	7.75 abcd	6.75 abc	0.879 bcd
526237	Zimbabwe	1.00 ab	3.50 a	6.75 abc	0.689 abcd
560011	Nigeria	4.25 abcdef	5.25 abcd	6.75 abc	0.923 bcd
255136	Sur África	2.50 abcde	5.00 abcd	7.00 abc	0.803 bcd
296334	Sur África	5.50 cdef	7.00 abcd	7.00 abc	0.847 bcd
482246	Zimbabwe	2.00 abcde	4.50 abcd	7.00 abc	0.923 bcd
500354	Zambia	2.25 abcde	4.50 abcd	7.00 abc	0.978 cd
512854	España	2.00 abcde	3.75 ab	7.00 abc	0.897 bcd
277997	Turquía	2.00 abcde	4.25 abcd	7.00 abc	0.783 bcd
357753	Serbia y Montenegro	4.50 abcdef	6.50 abcd	7.00 abc	0.897 bcd
381733	India	5.75 def	6.50 abcd	7.00 abc	0.868 bcd
526232	Zimbabwe	2.25 abcde	4.00 abc	7.00 abc	0.812 bcd
535948	Cameron	4.00 abcdef	5.75 abcd	7.00 abc	0.904 bcd
596659	Sur África	4.50 abcdef	6.00 abcd	7.25 abc	0.959 cd
Grif1734	China	3.50 abcdef	5.50 abcd	7.25 abc	0.877 bcd
164992	Turquía	2.75 abcde	3.75 ab	7.25 abc	0.953 bcd

Tabla 2. Continuación

Accesión	País de origen	Severidad ¹			ELISA-POTY
		Semana 4 ²	Semana 8 ²	Semana 12 ²	Absorbancia*
186490	Nigeria	2.75 abcde	4.00 abc	7.25 abc	0.877 bcd
211013	Afganistán	4.00 abcdef	5.50 abcd	7.25 abc	0.821 bcd
277971	Turquía	2.25 abcde	4.00 abc	7.25 abc	0.909 bcd
293765	Unión Soviética	4.25 abcdef	6.50 abcd	7.25 abc	0.933 bcd
379227	Serbia y Montenegro	4.50 abcdef	6.50 abcd	7.25 abc	0.934 bcd
385963	Kenya	2.50 abcde	4.25 abcd	7.25 abc	0.892 bcd
431579	India	6.00 ef	6.75 abcd	7.25 abc	0.838 bcd
459075	Botswana	1.50 abcd	3.75 ab	7.25 abc	0.787 bcd
500347	Zambia	3.75 abcdef	5.75 abcd	7.25 abc	0.770 bcd
526231	Zimbabwe	1.75 abcde	4.00abc	7.25 abc	0.699 abcd
532811	China	5.00 bcdef	6.50 abcd	7.25 abc	0.917 bcd
606135	Federación Rusa	2.75 abcde	4.50 abcd	7.50 abc	0.974 cd
174108	Turquía	2.50 abcde	4.75 abcd	7.50 abc	0.880 bcd
212288	Afganistán	4.75 bcdef	5.75 abcd	7.50 abc	0.967 cd
217937	Pakistan	2.25 abcde	5.25 abcd	7.50 abc	0.799 bcd
254624	Sudan	5.00 bcdef	8.50 cd	7.50 abc	0.904 bcd
269680	Belice	1.75 abcde	4.00 abc	7.50 abc	0.740 bcd
271751	Ghana	2.25 abcde	4.50 abcd	7.50 abc	0.932 bcd
277279	India	1.25 abc	4.25 abcd	7.50 abc	0.944 bcd
278046	Turquía	3.50 abcdef	5.25 abcd	7.50 abc	0.939 bcd
379230	Serbia y Montenegro	4.75 bcdef	6.50 abcd	7.50 abc	0.933 bcd
381725	India	3.75 abcdef	7.00 abcd	7.50 abc	0.916 bcd
381734	India	4.50 abcdef	6.75 abcd	7.50 abc	0.662 abc
482267	Zimbabwe	4.50 abcdef	5.75 abcd	7.50 abc	0.907 bcd
482348	Zimbabwe	2.00 abcde	3.75 ab	7.50 abc	0.862 bcd
512382	España	1.75 abcde	3.75 ab	7.50 abc	0.834 bcd
559999	Nigeria	4.50 abcdef	6.25 abcd	7.50 abc	0.816 bcd
485583	Botswana	5.00 bcdef	7.25 abcd	7.75 abc	0.826 bcd
169241	Turquía	3.25 abcde	6.00 abcd	7.75 abc	0.916 bcd
169291	Turquía	2.00 abcde	4.25 abcd	7.75 abc	0.901 bcd
178873	Turquía	2.00 abcde	4.50 abcd	7.75 abc	0.818 bcd
212208	Grecia	4.25 abcdef	7.50 abcd	7.75 abc	0.817 bcd
270306	Filipinas	4.25 abcdef	6.75 abcd	7.75 abc	0.729 abcd
381721	India	4.00 abcdef	6.50 abcd	7.75 abc	0.924 bcd
482253	Zimbabwe	4.75 bcdef	6.00 abcd	7.75 abc	0.799 bcd
482266	Zimbabwe	5.00 bcdef	6.75 abcd	7.75 abc	0.940 bcd
482289	Zimbabwe	4.50 abcdef	8.00 abcd	7.75 abc	0.824 bcd
482351	Zimbabwe	4.00 abcdef	6.75 abcd	7.75 abc	0.882 bcd
494529	Nigeria	4.25 abcdef	6.50 abcd	7.75 abc	0.806 bcd

Tabla 2. Continuación

Accesión	País de origen	Severidad ¹			ELISA-POTY
		Semana 4 ²	Semana 8 ²	Semana 12 ²	Absorbancia*
507859	Hungría	4.50 abcdef	7.25 abcd	7.75 abc	0.944 bcd
512366	España	4.00 abcdef	7.00 abcd	7.75 abc	0.952 bcd
525088	Egipto	5.00 bcdef	6.75 abcd	7.75 abc	0.925 bcd
549162	Chad	4.50 abcdef	6.50 abcd	7.75 abc	0.934 bcd
176913	Turquía	5.25 bcdef	7.00 abcd	8.00 abc	0.931 bcd
227204	Japón	4.00 abcdef	6.25 abcd	8.00 abc	0.906 bcd
278029	Turquía	4.00 abcdef	7.25 abcd	8.00 abc	0.829 bcd
278058	Turquía	4.00 abcdef	6.75 abcd	8.00 abc	0.802 bcd
378615	Zaire	4.75 bcdef	7.50 abcd	8.00 abc	0.801 bcd
420320	Italia	3.75 abcdef	6.50 abcd	8.00 abc	0.856 bcd
438671	México	2.25 abcde	4.50 abcd	8.00 abc	0.849 bcd
482254	Zimbabue	1.75 abcde	4.75 abcd	8.00 abc	0.852 bcd
526234	Zimbabue	2.00 abcde	7.25 abcd	8.00 abc	0.881 bcd
536449	Maldivas	3.00 abcde	4.50 abcd	8.00 abc	0.882 bcd
543210	Bolivia	4.50 abcdef	7.25 abcd	8.00 abc	0.841 bcd
164998	Turquía	4.00 abcdef	7.25 abcd	8.25 bc	1.000 d
274561	Portugal	3.75 abcdef	6.50 abcd	8.25 bc	0.870 bcd
357664	Serbia y Montenegro	2.75 abcde	4.75 abcd	8.25 bc	0.886 bcd
505595	Zambia	2.75 abcde	5.25 abcd	8.25 bc	0.699 abcd
512361	España	4.75 bcdef	8.25 bcd	8.25 bc	0.996 cd
534588	Siria	4.25 abcdef	6.25 abcd	8.25 bc	0.764 bcd
537461	España	2.75 abcde	5.50 abcd	8.25 bc	0.911 bcd
593350	China	3.25 abcde	7.25 abcd	8.25 bc	0.945 bcd
386015	Irán	3.75 abcdef	6.25 abcd	8.50 bc	0.845 bcd
167222	Turquía	5.50 cdef	8.50 cd	8.50 bc	0.829 bcd
180277	India	4.00 abcdef	7.50 abcd	8.50 bc	0.593 ab
200733	Guatemala	2.75 abcde	5.75 abcd	8.50 bc	0.824 bcd
296332	Sur África	4.25 abcdef	6.50 abcd	8.50 bc	0.939 bcd
306366	Gabón	4.50 abcdef	7.75 abcd	8.50 bc	0.966 cd
345544	Ucrania	2.50 abcde	6.00 abcd	8.75 c	0.879 bcd
357661	Serbia y Montenegro	3.75 abcdef	8.25 bcd	8.75 c	0.844 bcd
357668	Serbia y Montenegro	2.50 abcde	5.75 abcd	8.75 c	0.785 bcd
379249	Serbia y Montenegro	3.50 abcdef	7.75 abcd	8.75 c	0.933 bcd
379252	Serbia y Montenegro	5.00 bcdef	8.25 bcd	8.75 c	0.953 bcd
459074	Botswana	1.25 abc	5.00 abcd	8.75 c	0.670 abcd
482314	Zimbabue	3.75 abcdef	7.25 abcd	8.75 c	0.978 cd
512386	España	3.50 abcdef	7.25 abcd	8.75 c	0.939bcd
381749	India	3.50 abcdef	8.00 abcd	8.75 c	0.733 abcd
179878	India	2.00 abcde	5.50 abcd	9.00 c	0.408 a

Tabla 2. Continuación

Accesión	País de origen	Severidad ¹			ELISA-POTY
		Semana 4 ²	Semana 8 ²	Semana 12 ²	Absorbancia*
223764	Afganistán	4.25 abcdef	8.75 d	9.00 c	0.678 abcd
270309	Filipinas	2.50 abcde	4.75 abcd	9.00 c	0.921 bcd
275632	India	4.75 bcdef	7.50 abcd	9.00 c	0.975 cd
278007	Turquía	4.00 abcdef	7.50 abcd	9.00 c	0.686 abcd
307608	Nigeria	2.00 abcde	5.50 abcd	9.00 c	0.857 bcd
379233	Serbia y Montenegro	4.25 abcdef	8.25 bcd	9.00 c	0.871 bcd
500353	Zambia	2.25 abcde	5.50 abcd	9.00 c	0.632 abc
537270	Pakistan	2.50 abcde	5.75 abcd	9.00 c	0.875 bcd
537274	Pakistan	4.75 bcdef	8.75 d	9.00 c	-
593383	China	4.25 abcdef	8.25 bcd	9.00 c	0.835 bcd

Dentro de la misma columna medias con letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.01$) en la prueba de diferencias minimas significativas de Fisher.

¹Escala utilizada: valor 0 = planta libre de síntomas, 1= pocos síntomas, 2= leve clorosis, puntos cloróticos, sin necrosis, 3=leve clorosis/aclaramiento de venas y/o leve epinastia, no necrosis; 4= clorosis/aclaramiento de venas y/o leve epinastia, sin necrosis; 5= leve bronceado en el ápice, clorosis en hojas basales y/o estrías necróticas en tallos, peciolo, zarcillos; 6= necrosis en la mayoría de las hojas basales, comienzo de colapso de peciolo; 7= necrosis en casi todas las hojas, colapso total de los peciolo; 8 = necrosis en casi todas las hojas, tallo necrótico y ligero colapso, ápice del tallo muerto; 9 = planta muerta.

² semanas después de las inoculaciones.

³Crimson Sweet, Mickey Lee y Sugar Baby inoculadas solo con amortiguador.

*Pruebas realizadas durante semana 10-12 después de las inoculaciones.

Las accesiones 459074 y 277279 fueron diferentes a 381733, 431579 y Sugar Baby las cuales presentaron síntomas más severos (Tabla 2). La accesión 381733 fue distinta de Crimson Sweet-Buffer, 526237, Crimson Sweet, 459074 y 277279. Accesoión 431579 con media de 6.00 no fue diferente a 381733 con media de 5.75, pero sí mostró diferencias con Crimson Sweet-Buffer, 526237, Crimson Sweet, 459074, 277279, 459075 y Sugar Baby- buffer las cuales obtuvieron valores muy bajos de severidad de síntomas. La accesión 526237 mostró muy baja severidad en comparación con las demás y una lectura ELISA similar a la de los controles sin inocular a pesar de que en semana 12 la severidad de síntomas fue de 6.75. Las plantas de Sugar Baby tuvieron la severidad más alta de 7.00 siendo significativamente diferentes a las accesiones de medias de 3.25 ó menos. En la semana 8 se observó un progreso en la severidad de la enfermedad con medias mucho más altas a las de la semana 4 (Tabla 2). En la mayoría de las accesiones el valor de severidad se duplica en la semana 8 después de las inoculaciones. La accesión 526237 exhibió la menor severidad con una media de 3.50, aunque es significativamente diferente a accesiones 593383, 357661, 512361, 379252, 379233, 167222, 254624, 537274 y 223764. Las accesiones 223764 y 527274 tuvieron la media de severidad numéricamente más altas (8.75) pero esta severidad fue significativamente diferente solo a 526237, 459075, 482348, 164992, 512854, 512382, 526232, 277971, 526231, 269680 y 186490.

Durante la semana 12 hubo aumento en las medias de severidad de síntomas virales en casi todas las accesiones (Tabla 2). Las plantas con menor severidad de síntomas fueron Mickey Lee-Buffer y Crimson Sweet-Buffer (controles negativos) con una media de 5.63. Estas plantas fueron diferentes a 34 de las accesiones analizadas con medias de 8.25, 8.50, 8.75 9.00 y también fueron significativamente diferentes a Sugar Baby la cual resultó con una media de 8.75. La

accesión 500334 con una media de 5.75 fue significativamente diferente a las accesiones que obtuvieron una media de 8.75 ó más.

Los resultados de la prueba ELISA para POTY mostraron que todas las plantas obtuvieron resultados considerados positivos con medias de lecturas de absorbancia de 0.400 o más (Tabla 2). Accesiones como 179878, 180277, 500353, 381734, 459074, 223764, 278007, 526237, 505595, 526231, 270309 y 381749 mostraron los valores más bajos de absorbancia. La accesión 179878 con media de 0.408 resultó la más baja siendo significativamente diferente a la gran mayoría de las accesiones y de las plantas control. No demostró ser distinta de las accesiones 180277, 500353, 381734, 459074, 223764, 278007, 526237, 505595, 526231, 270309 y 381749 las cuales obtuvieron valores de absorbancia de 0.733 ó menos. La accesión 180277 es significativamente diferente a 596659, 306366, 212288, 606135, 275632, 277994, 482314, 500354, 512361 y 164998 las cuales fueron las de lecturas de absorbancia más alta en la prueba indirecta de POTY. La accesión 164998 fue diferente a las accesiones 179878, 180277, 500353 y 381734 obteniendo la mayor absorbancia con un valor promedio de 1.000 resultando ser la lectura más alta para esta prueba. Los controles sin inocular obtuvieron valores de absorbancia positivos aunque más bajos que los controles inoculados. Los controles inoculados mostraron mayor severidad de síntomas en las semanas 4, 8 y 12 en comparación a los controles sin inocular.

Las accesiones 277997 y 526237 se encontraron entre el 20% de las accesiones con menor severidad de síntomas durante semanas 4 a la 12 y baja lectura de absorbancia (Tabla 3). Las accesiones 275632 y 379252 siempre estuvieron entre el 20% de accesiones con la mayor severidad y absorbancia. Las accesiones 306366, 379249 y 379252 resultaron entre el 20% con mayor severidad de síntomas en las semanas 8 y 12 y lecturas de absorbancia.

Tabla 3. El 20% superior e inferior de las accesiones de sandía (*Citrullus sp*) según los valores promedios de severidad de síntomas y lectura de absorbancia en la prueba ELISA indirecta de POTY inoculadas mecánicamente con *Squash vein yellowing virus* en Lajas y Mayagüez durante 2010 y 2011.

	Severidad ¹			Absorbancia ³
	Semana 4 ²	Semana 8 ²	Semana 12 ²	ELISA-POTY
El 20 % de las accesiones de sandía con menor severidad y lectura de absorbancia	169291	164992	249010	179878
	178873	169291	255136	180277
	179878	178873	270550	217937
	217937	186490	277994	223764
	269680	249010	277997	255136
	271751	269680	326516	269680
	277279	271751	357753	270306
	277971	277279	438675	277997
	277997	277971	482246	278007
	307608	277997	482248	278058
	438671	385963	482250	357668
	459074	438671	482337	378615
	459075	459075	500310	381734
	482246	482246	500334	381749
	482254	482248	500336	459074
	482348	482348	500354	459075
	500334	500354	505594	482253
	500353	512382	512854	494529
	500354	512854	525086	500347
	512382	526231	525096	500353
	512854	526232	526232	505595
	526231	526237	526237	526231
	526234	536449	535948	526237
	526237	606135	560011	534588
El 20 % de las accesiones de sandía con mayor severidad y lectura de absorbancia	167222	164998	167222	164992
	176913	167222	179878	164998
	212288	180277	180277	212288
	254624	212208	223764	275632
	275632	223764	270309	277279
	296334	254624	275632	277994
	326516	275632	278007	278046
	378615	278007	296332	296332
	379230	278029	306366	306366
	379252	306366	307608	379227
	381733	357661	345544	379230

Tabla 3. Continuación

	Severidad ¹		Absorbancia ³
	Semana 4 ²	Semana 8 ²	Semana 12 ² ELISA-POTY
381734	378615	357661	379249
431579	379233	357668	379252
482253	379249	379233	482266
482266	379252	379249	482314
482289	381749	379252	500354
482337	482289	381749	507859
485583	485583	386015	512361
512361	507859	459074	512366
525086	512361	482314	512386
525088	525096	500353	549162
532811	537274	512386	593350
537274	543210	537270	596659
559999	593383	593383	606135

¹Escala utilizada: valor 0 = planta libre de síntomas, 1= pocos síntomas, 2= leve clorosis, puntos cloróticos, sin necrosis, 3=leve clorosis/aclaramiento de venas y/o leve epinastia, no necrosis; 4= clorosis/aclaramiento de venas y/o leve epinastia, sin necrosis; 5= leve bronceado en el ápice, clorosis en hojas basales y/o estrías necróticas en tallos, peciolo, zarcillos; 6= necrosis en la mayoría de las hojas basales, comienzo de colapso de peciolo; 7= necrosis en casi todas las hojas, colapso total de los peciolo; 8 = necrosis en casi todas las hojas, tallo necrótico y ligero colapso, ápice del tallo muerto; 9 = planta muerta.

²Semanas después de la inoculación.

³Pruebas realizada durante semana 10-12 después de las inoculaciones.

Las accesiones 296332, 482314 y 512386 estuvieron en el 20% inferior en la escala de severidad de síntomas durante semana 12 y lectura de absorbancia más alta. La accesión 381749 estuvo entre el 20% de menor lectura de absorbancia, pero entre el 20% con mayor severidad de síntomas durante la semana 4 y 8. En contraste, la accesión 500354 se encontró entre el 20% de mayor absorbancia, pero también entre el 20 % de menor severidad de síntomas en semana 12. De igual forma 277279 estuvo entre el 20% con mayor lectura de absorbancia y durante semana 4 y 8 se encontraba entre el 20% con menor severidad de síntomas.

3.4 DISCUSIÓN

En las accesiones de sandía evaluadas, la enfermedad WVD causada por SqVYV demostró un progreso de severidad de síntomas en las semanas 4, 8 y 12 después de la inoculación. Los síntomas que se observaron con mayor frecuencia fueron: puntos cloróticos en las hojas, clorosis en las hojas, epinastia, bronceado en los tallos, arrugamiento de las hojas, necrosis en las hojas y/o bejucos completos, marchitez causando la muerte prematura de la planta. Las plantas de calabaza ‘Waltham’ utilizadas como fuente de inóculo en el invernadero mostraron aclaramiento de venas, que es el síntoma característico de SqVYV. Síntomas similares como aclaramiento de venas, necrosis de tallo y hojas, marchitez severa y muerte de la planta fueron reportados en Florida afectando especies de Cucurbitáceas (Adkins et al., 2007). Estos síntomas fueron atribuidos al virus conocido como *Squash vein yellowing virus*. Dicho virus fue identificado en Puerto Rico afectando el cultivo de la sandía ‘Star Bright’ en fincas productoras de Santa Isabel y Guánica produciendo síntomas parecidos a los reportados por Adkins en el 2007 (Acevedo-Torres, 2012). También fue identificado SqVYV en calabaza ‘Waltham’ en invernaderos del Recinto de Mayagüez presentando síntomas de aclaramiento de venas y clorosis intervenal en el estudio anterior. En el mismo estudio se obtuvo un 100% de potyvirus en los muestreos realizados en sandía en el suroeste de Puerto Rico.

Ninguna accesión mostró resistencia completa a la enfermedad de la marchitez súbita de la sandía ya que los valores de severidad fueron mayores de 5 en la escala durante la semana 12. Esto confirma lo encontrado por Kousik et al. (2009) donde no encontraron resistencia completa (a lo que ellos se refieren como “inmunidad”) en las accesiones estudiadas. Accesiones como 526237, 459075, 482348, 164992, 512854 y 512382 mostraron posible resistencia a SqVYV de acuerdo a la escala de severidad con medias menores de 4.0 en la semana 8. Estas accesiones

fueron diferentes a las estudiadas por Kousik en el 2009 donde accesiones con medias de severidad menores de 4.0 como 500354, 392291, 482266, 381734, 386015, 295850 y 381749 fueron identificadas con resistencia moderada al SqVYV en la semana 8. En general las accesiones con menor severidad de síntomas no obtuvieron menor valor de absorbancia en la prueba de POTY. Esto sugiere que no hay relación entre la severidad de síntomas y las lecturas de absorbancia para POTY. Resende et al. (2000) observaron que no siempre se presenta una correlación entre severidad de síntomas y multiplicación de virus en la planta (medida con DAS-ELISA) para *Tomato spotted wilt virus* en tomate. Odu et al. (2011), trabajando con *Yam mosaic virus* encontraron que plantas de ñame (*Dioscorea rotundata*) pueden estar libre de síntomas y tener lecturas positivas de ELISA.

Accesiones como 179878, 180277, 500353, 381734, 459074, 223764, 278007, 526237, 505595, 526231, 270309 y 381749 mostraron cierta resistencia a las inoculaciones con SqVYV de acuerdo a las prueba de POTY obteniendo las medias más bajas. Estas no son significativamente diferentes a muchas de las otras accesiones, pero sí son distintas de las que obtuvieron las medias más altas en la lectura de absorbancia en la prueba indirecta de POTY. Esto indica que ese grupo de plantas posee algún grado de resistencia. Las accesiones con origen de Zimbabwe mostraron mayor tolerancia al SqVYV en particular la accesión 526237 la cual permaneció en el 20% con menor severidad de síntomas durante semana 4, 8 y 12 y lectura de absorbancia más bajo aunque positivo. La accesión 277997 con procedencia de Turquía mostró un comportamiento similar con menor severidad de síntomas durante semana 4, 8 y 12 y menor absorbancia. Las accesiones 275632 y 379252 se encontraban en el 20% con mayor severidad de síntomas durante semanas 4, 8 y 12 y mayor severidad de síntomas incando ser muy susceptibles a SqVYV.

Se observó que algunas accesiones tuvieron pocos síntomas y luego muchos síntomas, mientras que otras mostraban muchos síntomas en las primeras semanas. Otras accesiones presentaron pocos síntomas al principio del experimento y repentinamente las plantas mostraron síntomas bien severos y eventualmente las plantas murieron. Se pudo apreciar que cuando la severidad de síntomas es muy alta no necesariamente las lecturas de absorbancia son las más altas. Se encontraron casos muy variados con altos valores de lectura de absorbancia y pocos síntomas y viceversa. Se observaron accesiones con síntomas más severos que otras accesiones que no tenían las lecturas de absorbancia más altas, lo que sugiere que no siempre la planta con mayor lectura de absorbancia corresponde al genotipo con mayor severidad de síntomas.

Los controles sin inocular fueron infectados con enfermedades secundarias ya que fueron positivos para *Potyvirus*. Esto se debe a que no estaban protegidos en el campo. Es por esto que las lecturas de absorbancia no fueron diferentes en la prueba Indirecta de POTY.

4. EXPERIMENTO 2

Estudio de la Variación Biológica en Cepas de PRSV Recolectadas en Puerto Rico en *Cucurbita moschata* y *Citrullus lanatus*.

4.1 OBJETIVO

1. Estudiar el comportamiento de plantas de calabaza y sandía inoculadas con distintas cepas de PRSV encontradas en Puerto Rico.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

En el 2010 y 2011 se realizó una recolección de plantas de la familia *Cucurbitaceae* (cultivadas y silvestres) que mostraban síntomas de virus. El Dr. Jose Carlos V. Rodrigues y colaboradores recolectaron muestras en Puerto Rico, Vieques y Culebra (Tabla 4). Este muestreo fue realizado bajo el mismo proyecto global que auspició la investigación actual. Las muestras fueron procesadas por el Dr. Jose Carlos V. Rodrigues y otros en el laboratorio de Virología, Estación Experimental Agrícola, Rio Piedras (J.C.V. Rodrigues, comunicación personal). Este tejido se conserva liofilizado en la colección de virus de la Estación Experimental de Rio Piedras. De esta colección se utilizaron 21 muestras, provenientes de 13 municipios, identificadas por medio de pruebas serológicas y PCR como infectadas con distintas cepas de PRSV (Dr. Rodrigues, comunicación personal).

Por cada cepa de PRSV se inocularon los cotiledones de 3 plantas de *Cucurbita moschata* cv. Waltham que tenían 7 días de edad en el laboratorio de Virología mediante la técnica de inoculación mecánica descrita en el Experimento 1 (pero con un amortiguador fosfatado 0.1M a un pH de 7 y sin utilizar 1% celite en el amortiguador). Se maceró en un mortero utilizando 10 ml de amortiguador por cada gramo (1g) de tejido fresco de las diferentes cepas. Sobre los cotiledones se colocó el abrasivo, luego se frotó una gaza impregnada con la mezcla de amortiguador junto con savia infectada. Se dejó secar y se lavaron las plántulas para remover los residuos del abrasivo (carborúmdum) que pudiesen quedar sobre los cotiledones. Además se inocularon 3 plantas con una cepa estándar de ZYMV (239) y PRSV (231). Posteriormente estas fueron llevadas al laboratorio de Fitomejoramiento, Recinto Universitario de Mayagüez. En la Figura 1, estas primeras inoculaciones se designaron como “Ensayo 1”. El propósito de estas inoculaciones fue aumentar la cantidad de inóculo para hacer los Ensayos 2 y 3 (Figura 1).

Tabla 4. Descripción de cepas de *Papaya ringspot virus* (PRSV) utilizadas en Experimento 2, incluyendo el hospedero y localidad en que fue recolectado, síntomas presentes, la similitud a PRSV en el banco de genes y resultados de pruebas serológicas (ELISA).

Cepa	Hospedero	Familia	Síntomas	Pueblo	Similitud	POTY	PRSV	ZYMV
809	<i>Melothia</i> sp.	<i>Cucurbitaceae</i>	deformidad	Arecibo	80%	+	+	
874	<i>Cucurbita</i> pepo	<i>Cucurbitaceae</i>	no síntoma visible	Adjuntas	96%	+	-	
903	<i>Carica</i> papaya	<i>Caricaceae</i>	enanismo y deformidad	Vieques	94%	+	-	
587	<i>Momordica</i> charantia	<i>Cucurbitaceae</i>	clorosis	Salinas	80%	+	+	+
595		<i>Fabaceae</i>	mosaico y arrugamiento	Guayama	90%	+		
608	<i>Momordica</i> charantia	<i>Cucurbitaceae</i>	no síntomas visibles	Patillas	88%	+		
609	<i>Momordica</i> charantia	<i>Cucurbitaceae</i>	no síntomas visibles	Patillas	86%	+	+	
619	<i>Momordica</i> charantia	<i>Cucurbitaceae</i>	mosaico ampollas	Corozal	87%	+		
657	<i>Momordica</i> charantia	<i>Cucurbitaceae</i>	no síntoma visible	Camuy	91%	+		
724	<i>Desmodium</i> sp.	<i>Fabaceae</i>	mosaico	Culebra	89%	+		
732	<i>Passiflora</i> fetida	<i>Passifloraceae</i>		San Juan	86%	+		
814	<i>Luffa</i> sp.		puntos cloróticos	Carolina	77%	+	+	
848	<i>Momordica</i> charantia		no síntoma visible	Ponce	86%	+	-	
852		<i>Fabaceae</i>	puntos negros	Adjuntas	84%	+	-	
853		<i>Fabaceae</i>	no síntoma visible	Adjuntas	89%	+	-	
854	<i>Momordica</i> charantia	<i>Cucurbitaceae</i>	puntos cloróticos	Adjuntas	88%	+	-	
855	<i>Momordica</i> charantia	<i>Cucurbitaceae</i>	no síntoma visible	Adjuntas	83%	+		
883	<i>Momordica</i> charantia	<i>Cucurbitaceae</i>	no síntoma visible	Vieques	86%	+	-	
884	<i>Momordica</i> charantia	<i>Cucurbitaceae</i>	mosaico	Vieques	93%	+	-	
911	<i>Momordica</i> charantia	<i>Cucurbitaceae</i>	mosaico	Vieques	83%	+		+
954	<i>Momordica</i> charantia	<i>Cucurbitaceae</i>	no síntoma visible	Yauco	84%	+		

Fuente: Comunicación personal de Dr. J.C.V. Rodrigues.

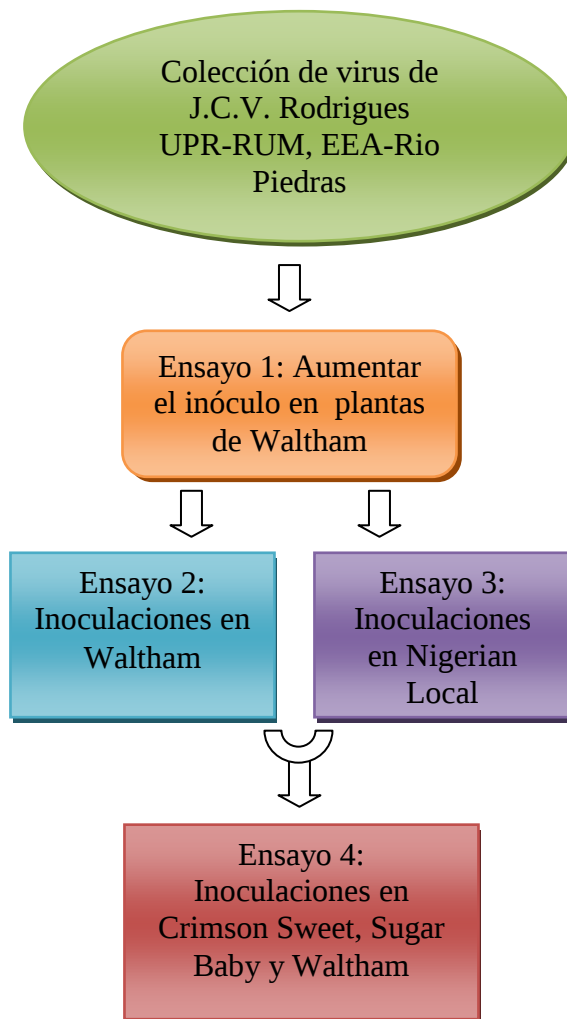


Figura1. Cronología de ensayos para experimento con cepas de *Papaya ringspot virus* recolectadas en Puerto Rico.

En el Ensayo 2 se inocularon 6 plantas de ‘Waltham’ con cada una de las cepas de PRSV provenientes del Laboratorio de Virología de Rio Piedras y las cepas estándares de ZYMV(239) y PRSV (231). Se inocularon mecánicamente los cotiledones de plantas con 7 días de edad utilizando un amortiguador fosfatado 0.1M (pH 7). Se maceró en un mortero utilizando 10 ml de amortiguador por cada gramo (1g) de tejido fresco de los aislados. Sobre los cotiledones se colocó el abrasivo, luego se frotó una gaza impregnada con la mezcla de amortiguador junto con savia infectada. Se dejó secar y finalmente se lavaron las plántulas para remover los residuos del abrasivo que pudiesen quedar sobre los cotiledones.

Se tomaron observaciones de sintomatología y severidad durante varias semanas después de las inoculaciones. Para la evaluación de severidad de síntomas se utilizó una escala de 0 a 3 tomando en cuenta la planta completa, donde 0= sin síntomas, 1= síntomas leves (manchas, clorosis leve en hojas), 2= síntomas fuertes (clorosis y arrugamiento en las hojas) y 3= síntomas severos (deformación y mosaico severo en las hojas). Al cabo de 28 días después de la inoculación en los cotiledones se tomaron muestras de la tercera y/o cuarta hoja más joven con las que se realizaron pruebas serológicas ELISA (Agdia Inc., Elkhart, IN). Se probaron para DAS-ELISA PRSV y ZYMV más la prueba general indirecta de POTY siguiendo el procedimiento descrito para el Experimento 1. Utilizando un lector de ELISA (Dynex Technologies Inc., Chantilly, VA) se tomaron las medidas de absorbancia a 405 nm. El protocolo para el Ensayo 3 fue igual a lo realizado en el Ensayo 2, pero se inocularon 2 a 3 plantas del cultivar ‘Nigerian Local’ la cual fue descrita como resistente por Brown y colaboradores (2003).

Para observar el comportamiento de estas diferentes cepas de PRSV en sandía (*Citrullus lanatus*) se realizó un ensayo similar en plantas de ‘Sugar Baby’ y ‘Crimson Sweet’ denominado Ensayo 4. También se incluyó ‘Waltham’ (*C. moschata*). Se inocularon mecánicamente según

descrito anteriormente. Se observó la sintomatología y severidad en estas plantas a los 21 días después de la inoculación. Se utilizó una escala para la severidad de síntomas de 0 a 3, donde 0=sin síntomas y 3=síntomas severos. Se realizaron pruebas serológicas para la detección de PRSV, ZYMV y la prueba general de POTY a los 21 días después de la inoculación mecánica, tomando tejido de la tercera hoja más joven.

Se analizaron los datos de observaciones de severidad de síntomas y lectura de absorbancia para PRSV en el programa estadístico InfoStat (Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina). Se compararon las medias usando la prueba de diferencias minimas significativas de Tukey ($\alpha=0.05$). Los datos fueron analizados usando el diseño completamente aleatorizado.

4.3 RESULTADOS

En el Ensayo 1 ninguna de las plantas de *C. moschata* cv. Waltham inoculadas con las cepas de PRSV estuvo libre de síntomas (severidad=0) (Figura 3). Las plantas controles inoculadas con cepas 239 de ZYMV o 231 de PRSV expresaron síntomas severos (severidad=3) como mosaico y deformación. Estas dos cepas son estándares utilizados en el programa de fitomejoramiento de cucurbitáceas en la Estación Experimental Agrícola de la UPR. Se confirmó mediante una prueba DAS-ELISA que plantas inoculadas con 239 (ZYMV) fueron positivas a ZYMV. Además se confirmó que las plantas inoculadas con las cepas 239 PRSV fueron negativas para ZYMV.

La reacción de plantas de ‘Waltham’ inoculadas con las nuevas cepas de PRSV (recolectadas en 2010 a 2011) varió de síntomas leves (severidad=1) a síntomas severos (severidad=3) (Figura 3). Cuatro cepas tuvieron efectos severos (severidad=3) en las plantas: 809, 874, 903 y 231. Las cepas 809, 874, 903 y 231 presentaron lecturas positivas (mayor de 0.500) en la prueba ELISA para PRSV.

Las otras cepas de PRSV presentaron síntomas más leves o moderados comparados con las cepas 809, 874, 903 y 231 (Figura 2 y 3). Las lecturas de absorbancia de la prueba ELISA de PRSV para estas cepas fueron negativas en la mayoría de los casos. Las plantas inoculadas con 874 y 903 murieron aproximadamente 4-5 semanas después de las inoculaciones a consecuencia de la enfermedad viral siendo las que presentaron síntomas más severos.

En el Ensayo 2, donde el inóculo utilizado fue tejido fresco del Ensayo 1, se incluyeron plantas inoculadas con amortiguador solamente, las cuales mostraron severidad=0 (sin síntomas) y absorbancias negativas en la prueba ELISA para PRSV (Figura 4). Las plantas inoculadas con la cepa estándar PRSV 231 mostraron síntomas desde leves a severos (severidad de 1 a 3).

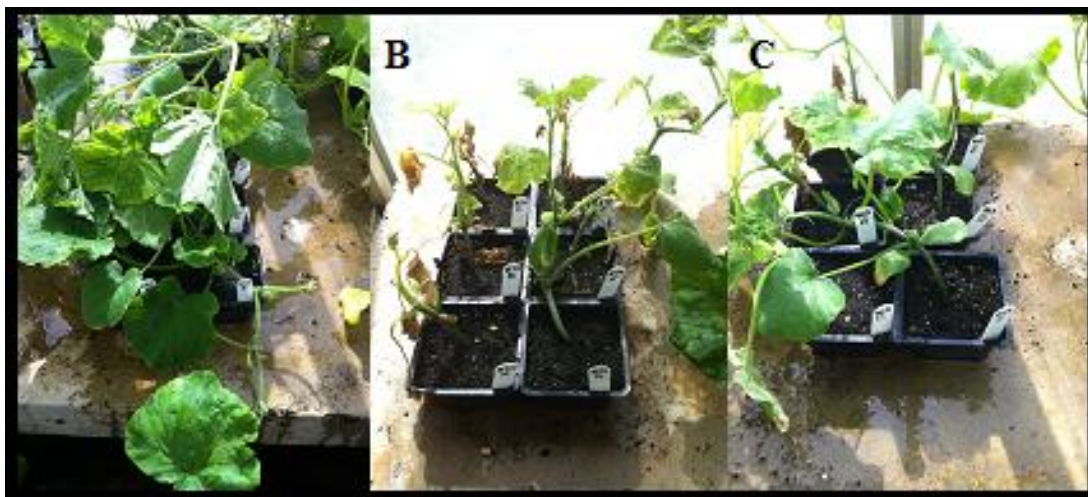


Figura 2. Plantas de Waltham inoculadas mecánicamente con cepas de *Papaya ringspot virus* en el invernadero. (A) Plantas inoculadas con cepa estándar 231. (B) Plantas inoculadas con cepas 874. (C) Plantas inoculadas con cepas 903.

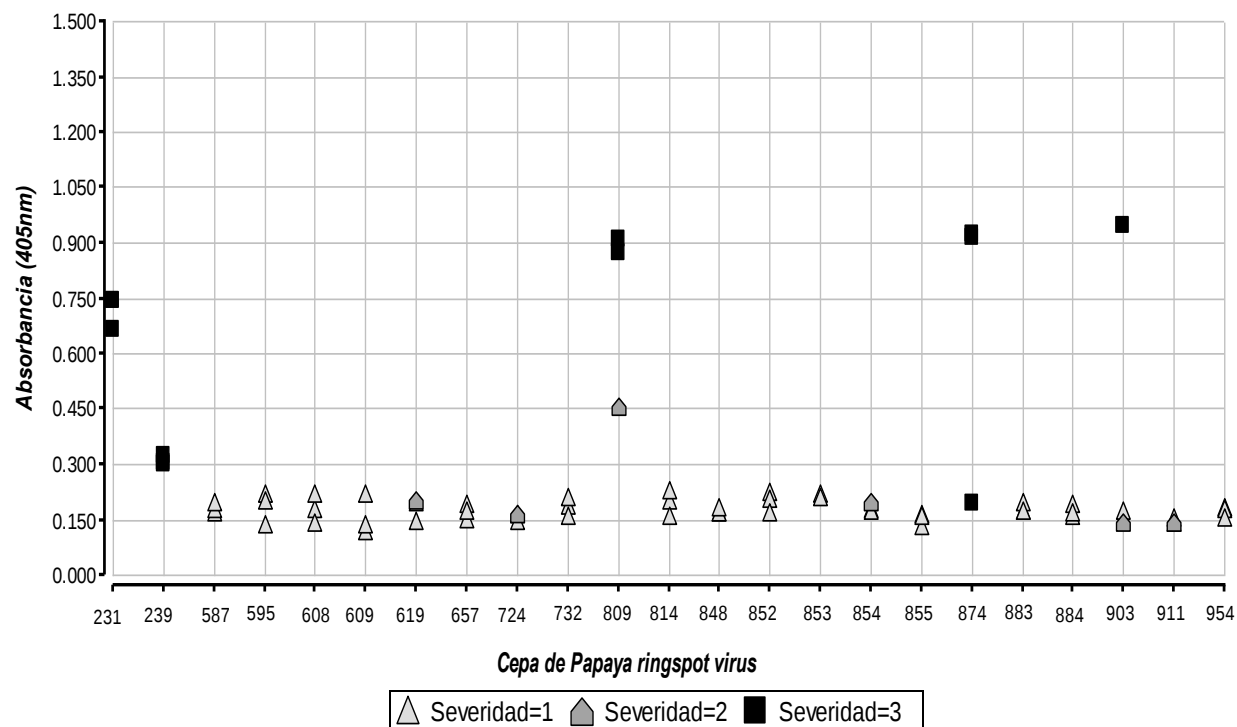


Figura 3. Valores de absorbancia (405 nm) obtenidos de una prueba DAS- ELISA para *Papaya ringspot virus* (PRSV) en plantas de Waltham (n=3) inoculadas mecánicamente con cepas de PRSV en Ensayo 1. Los distintos símbolos representan cada categoría de severidad donde 0=sin síntomas y 3=síntomas severos. La cepa 231 corresponde a la cepa estándar de PRSV y la 239 es la cepa estándar de ZYMV.

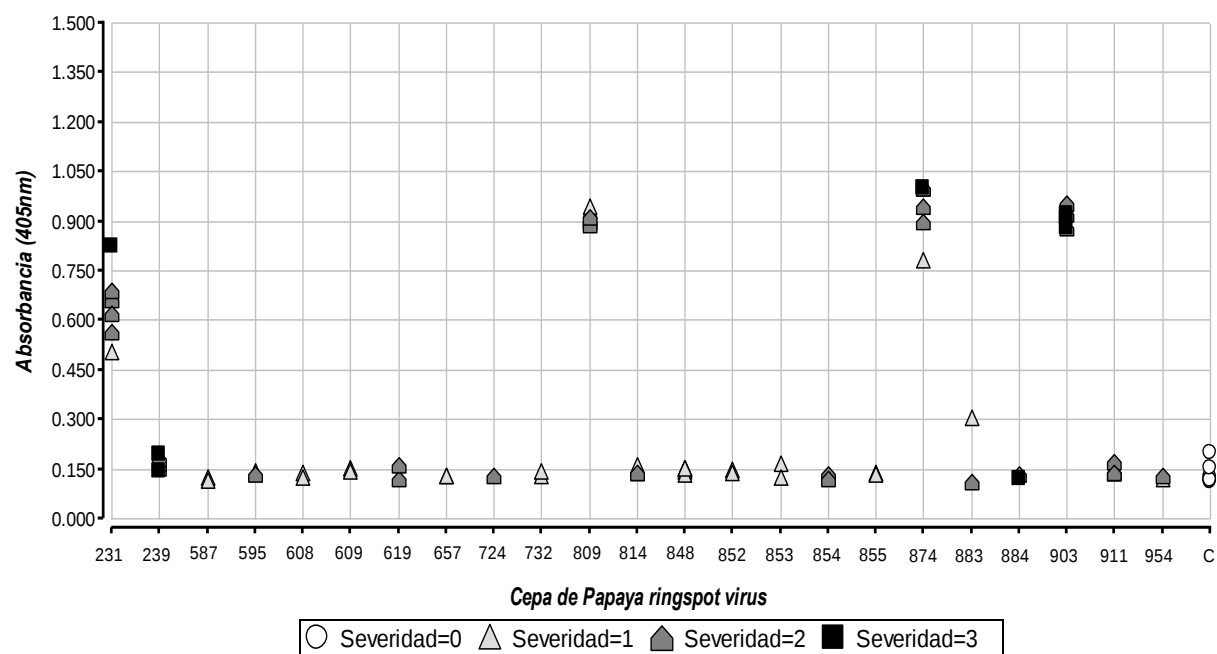


Figura 4. Valores de absorbancia (405 nm) obtenidos de una prueba DAS-ELISA para *Papaya ringspot virus* (PRSV) en plantas de Waltham (n=2 ó n=6) inoculadas mecánicamente con cepas de PRSV en Ensayo 2. Los distintos símbolos representan cada categoría de severidad donde 0=sin síntomas y 3=síntomas severos. C= plantas inoculadas solo con amortiguador (controles negativos). La cepa 231 corresponde a la cepa estándar de PRSV y la 239 es la cepa estándar de ZYMV.

Las absorbancias también fueron positivas con valores mayores a 0.450 hasta 0.800. Las plantas inoculadas con ZYMV (cepa 239) mostraron síntomas severos (3) y estas fueron negativas a PRSV con lecturas de absorbancia bajas en la prueba ELISA para PRSV. Estos valores fueron similares al control inoculado solo con amortiguador. Las cepas 809, 874, 903 y 231 de PRSV resultaron con las mayores lecturas de absorbancia y fueron las mismas cepas que en el Ensayo 1. Las plantas inoculadas con la cepa 809 mostraron severidad de 1 y 2 pero los valores de absorbancia fueron todos cercanos a 0.900 resultando positivos a PRSV. En el Ensayo 1 la severidad fue mayor para esta cepa. Plantas inoculadas con la cepa 874 obtuvieron lecturas positivas en la prueba serológica, pero presentaron mayor variación en cuanto a la severidad de síntomas con valores de 1, 2 y 3. Todas las plantas inoculadas con 903 tuvieron lecturas altas de absorbancia en el Ensayo 2 mientras que algunas plantas en el Ensayo 1 no fueron positivas para PRSV. El nivel promedio de severidad de síntomas también fue mayor que en el Ensayo 2. En el Ensayo 1, las plantas inoculadas con la cepa 884 solamente mostraron síntomas leves a moderados. Al contrario, en el Ensayo 2 las plantas con esta cepa mostraron síntomas severos, aunque la absorbancia fue baja. La prueba para ZYMV fue negativa en las plantas inoculadas con la cepa 884, así que los síntomas no fueron causados por ZYMV. Las inoculaciones con las demás cepas mostraron patrones similares entre ellas con severidad de 1 y 2 pero con lecturas de ELISA negativas para PRSV.

Igual que en el Ensayo 2, en el Ensayo 3 se utilizó inóculo de las plantas de Waltham del Ensayo 1 para inocular plantas de *C. moschata* cv. Nigerian Local. No hubo síntomas de virus en ninguna planta inoculada (Figura 4). Todas las plantas fueron clasificadas con severidad=0, pero las cepas 874 y 903 resultaron con lecturas positivas para PRSV en todas las plantas. Las Figuras

2, 3 y 4 presentan los datos observados de plantas individuales y ayudan a ver la consistencia en la reacción de diferentes plantas.

Para estudiar mejor los efectos promedios de las cepas de PRSV, se combinaron los resultados de Ensayo 1, 2 y 3 en la Tabla 4. Solamente las plantas inoculadas con cepas 231 y 903 mostraron síntomas significativamente más severos que las plantas control (inoculadas solo con amortiguador). La cepa 903 no fue significativamente diferente a las cepas de 231 y 239 en cuanto a severidad de síntomas de PRSV producidos en plantas de 'Waltham'. Según la prueba DAS-ELISA las cepas 231, 809, 874 y 903 son significativamente diferentes a las demás, resultando positivas a PRSV con valores de 0.578, 0.670, 0.793 y 0.721 respectivamente.

Se comparó la capacidad de las cepas de PRSV con mayor severidad 874, 809, 903 y 231 en infectar sandía con inóculo obtenido de Waltham (Ensayo 2) y Nigerian Local (Ensayo 3) en el Ensayo 4 (Tabla 5). Se observó que la mayoría de las lecturas de absorbancia positivas corresponden a plantas de Crimson Sweet, Sugar Baby y Waltham donde la fuente de inóculo fue Waltham. Las plantas de Crimson Sweet inoculadas con cepa 903, con Waltham como fuente de inóculo, obtuvieron lecturas de absorbancia significativamente más altas que la mayoría de las plantas con Nigerian Local como fuente de inóculo, excepto en algunos casos de cepa 874 en Crimson Sweet, Sugar Baby y Waltham y 903 en plantas de Waltham. Las lecturas de absorbancia de las plantas inoculadas con cepa 903 provenientes de Waltham como fuente de inóculo fueron significativamente diferentes a los controles inoculados con amortiguador solamente. La severidad de síntomas promedio entre plantas de Waltham inoculadas con tejido de Nigerian Local de cepas 239, 809 y 854, Sugar Baby inoculada con tejido de Nigerian Local con cepa 809 y los controles no son significativamente diferentes entre sí, pero si son diferentes a las demás.

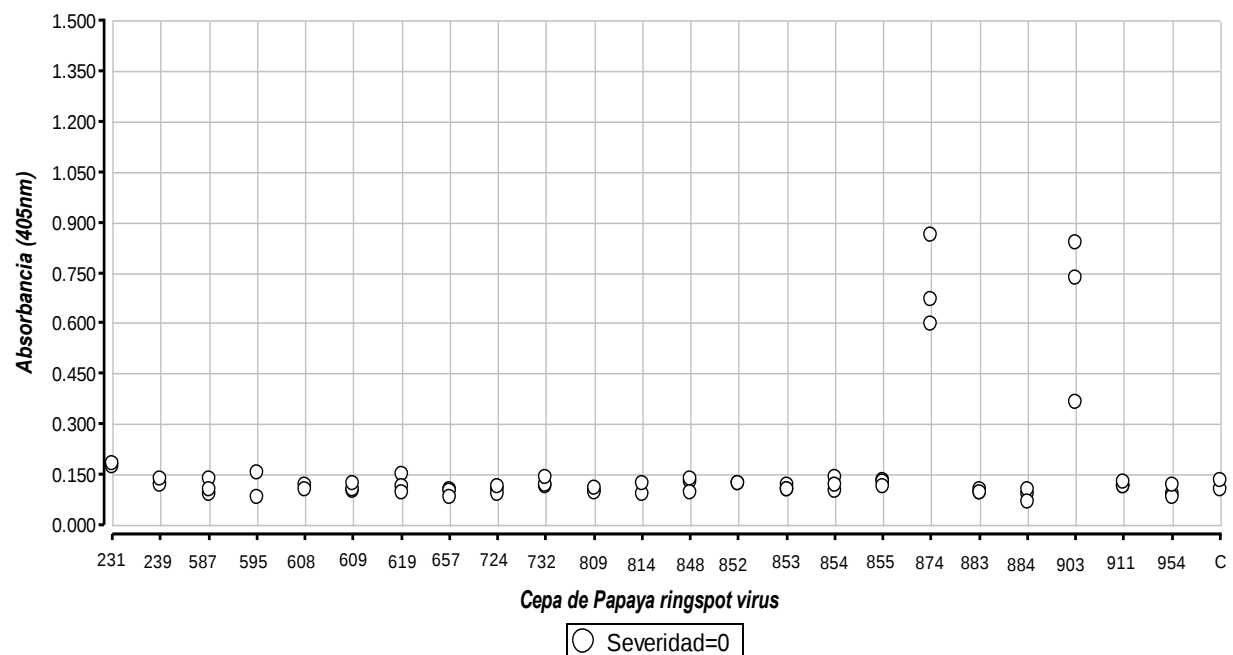


Figura 5. Valores de absorbancia (405 nm) obtenidos de una prueba DAS-ELISA para *Papaya ringspot virus* (PRSV) en plantas de Nigerian Local (n=2 ó 3) inoculadas mecánicamente inoculadas con cepas de PRSV en Ensayo 3. Todas las plantas resultaron con severidad=0 (sin síntomas de virus). C=plantas inoculadas solo con amortiguador (controles negativos). La cepa 231 corresponde a la cepa estándar de PRSV y la 239 es la cepa estándar de ZYMV.

Tabla 5. Valores promedios de severidad de síntomas y lecturas de absorbancia (405 nm) en la prueba DAS-ELISA de plantas de Waltham y Nigerian Local inoculadas con diferentes cepas de *Papaya ringspot virus*.

Aislado	n	Severidad ¹	Absorbancia ²
231	11	1.90 bc	0.578 b
239 ³	11	2.09 c	0.200 a
587	8	0.62 ab	0.138 a
595	7	0.85 abc	0.152 a
608	7	0.71 abc	0.144 a
609	8	0.62 ab	0.135 a
619	8	1.00 abc	0.148 a
657	8	0.62 ab	0.131 a
724	8	1.12 abc	0.130 a
732	8	0.62 ab	0.148 a
809	12	1.41 abc	0.670 b
814	11	0.90 abc	0.151 a
848	12	0.75 abc	0.144 a
852	7	0.71 abc	0.160 a
853	7	0.57 ab	0.148 a
854	8	1.00 abc	0.145 a
855	8	0.62 ab	0.136 a
874	12	1.33 abc	0.793 b
883	8	0.75 abc	0.155 a
884	8	1.00 abc	0.130 a
903	12	1.75 bc	0.721 b
911	12	1.08 abc	0.138 a
954	8	0.75 abc	0.130 a
Control*	8	0.00 a	0.132 a

En la misma columna medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) en la prueba de diferencias mínimas significativas de Tukey.

¹escala de severidad utilizada 0=sin síntomas y 3=síntomas severos.

²lectura de absorbancia en la prueba DAS-ELISA para *Papaya ringspot virus*.

³cepa estándar de ZYMV

*inoculadas solo con amortiguador.

Tabla 6. Valores promedios de severidad de síntomas y lecturas de absorbancia (405 nm) en plantas de Crimson Sweet, Sugar Baby y Waltham inoculadas con diferentes cepas de *Papaya ringspot virus* obtenidas de Nigerian Local y Waltham.

Cepa	Fuente de inóculo	Planta inoculada	N	Severidad ¹	Absorbancia ²
239 ³	Nigerian Local	Crimson Sweet	4	2.00 bcd	0.122 a
239 ³	Waltham	Sugar Baby	1	2.00 bcd	0.135 ab
809	Nigerian Local	Sugar Baby	2	0.00 a	0.137 ab
239 ³	Nigerian Local	Sugar Baby	4	2.25 cd	0.139 ab
854	Nigerian Local	Crimson Sweet	2	1.50 bc	0.145 ab
854	Nigerian Local	Sugar Baby	2	1.50 bc	0.147 ab
Control*		Crimson Sweet	2	1.00 ab	0.149 ab
Control*		Sugar Baby	2	1.00 ab	0.151 ab
Control*		Waltham	1	0.00 a	0.156 ab
239 ³	Nigerian Local	Waltham	4	0.00 a	0.164 ab
809	Nigerian Local	Crimson Sweet	2	2.00 bcd	0.165 ab
809	Nigerian Local	Waltham	2	0.00 a	0.177 ab
854	Nigerian Local	Waltham	2	0.00 a	0.179 ab
903	Nigerian Local	Crimson Sweet	4	1.50 bc	0.243 ab
903	Nigerian Local	Sugar Baby	4	2.50 cd	0.336 abc
874	Waltham	Sugar Baby	5	2.60 cd	0.407 bcd
809	Waltham	Sugar Baby	4	1.50 bc	0.416 bcd
874	Nigerian Local	Crimson Sweet	3	3.00 d	0.437 bcd
874	Waltham	Waltham	4	2.60 cd	0.458 bcd
874	Waltham	Crimson Sweet	4	2.60 cd	0.469 bcd
874	Nigerian Local	Sugar Baby	4	3.00 d	0.497 bcd
809	Waltham	Waltham	4	1.75 bc	0.520 bcd
874	Nigerian Local	Waltham	4	3.00 d	0.548 bcd
903	Nigerian Local	Waltham	4	3.00 d	0.550 bcd
239 ³	Waltham	Crimson Sweet	1	3.00 d	0.557 bcd
809	Waltham	Crimson Sweet	4	2.75 cd	0.561 bcd
239 ³	Waltham	Waltham	1	3.00 d	0.568 bcd
903	Waltham	Sugar Baby	4	2.50 cd	0.577 cd
903	Waltham	Waltham	4	2.50 cd	0.578 cd
903	Waltham	Crimson Sweet	4	2.50 cd	0.602 d

En la misma columna medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.01$) en la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher.

¹escala de severidad utilizada 0=sin síntomas y 3=síntomas severos.

²lectura de absorbancia en la prueba DAS-ELISA para *Papaya ringspot virus*.

³cepa estándar de ZYMV

*inoculada solo con amortiguador.

4.4 DISCUSIÓN

Las inoculaciones mecánicas en plantas de ‘Waltham’ con tejido liofilizado de la colección de virus del laboratorio de Virología de Rio Piedras para realizar el Ensayo 1 resultaron exitosas ya que se observaron síntomas en todas las plantas. El no obtener lecturas significativas de absorbancia en la prueba ELISA para muchas cepas puede deberse a que la concentración del virus no fue suficiente para ser detectado por esta prueba. Se podría realizar pruebas ELISA aumentando la cantidad de anticuerpo para ayudar a atrapar mayor cantidad de partículas virales. Otra posible explicación es la presencia de otros virus como causantes de los síntomas observados lo cual no fue determinado. Los ensayos fueron realizados en un invernadero cerrado, donde la presencia de vectores y la posibilidad de contaminación fue mínima.

Posteriormente las inoculaciones mecánicas en el Ensayo 2 con el tejido fresco del Ensayo 1 mostraron síntomas y lecturas de absorbancia similares al Ensayo 1. Las plantas inoculadas con cepas 231, 809, 874 y 903 mostraron síntomas más rápido (a los 5 días después de las inoculaciones, datos no presentados) y con mayor severidad que las otras cepas de *Papaya ringspot virus*. Esto se confirma con las lecturas de la prueba ELISA para PRSV donde se observa que estas plantas inoculadas con cepas 231, 809, 874 y 903 obtuvieron las absorbancias más altas siendo significativamente diferentes de las demás. Por otro lado se demuestra que las plantas inoculadas con cepa 231 obtuvieron un valor de lectura de absorbancia más bajo que las plantas inoculadas con las cepas 809, 874 y 903, lo que sugiere que estas últimas son más severas que la cepa local (estándar) 231. Durante el Ensayos 1 y 2 las plantas que primero murieron fueron las inoculadas con las cepas 874 y 903 presentando los síntomas más

dramáticos. Las cepas 874 y 903 resultaron con los valores más altos de lecturas de absorbancia para PRSV.

Aunque las plantas con inoculaciones de las cepas de PRSV en ‘Nigerian Local’ no presentaron síntomas visuales en ninguna planta inoculada con las diferentes cepas, resulta interesante que en inoculaciones con las cepas 874 y 903 las lecturas de absorbancia fueron positivas. Esta planta fue identificada como resistente a PRSV (Brown et al, 2003) y ha sido utilizada en programas de fitomejoramiento para tratar de incorporar genes de resistencia. Las lecturas positivas indican que Nigerian Local puede ser hospedero de estas cepas más severas de PRSV, aún cuando no aparecen síntomas. Las cepas 903 y 874 fueron capaces de infectar plantas de Crimson Sweet, Sugar Baby y Waltham con inóculo proveniente de tejido fresco de Nigerian Local con resultados positivos en la prueba ELISA-PRSV. La cepa 809 fue positiva a PRSV en las plantas de Sugar Baby, Crimson Sweet y Waltham con la fuente de inóculo procedente de Waltham.

5. EXPERIMENTO 3

Evaluación de Acciones de Sandía Previamente Identificadas como Resistente a ZYMV (cepa 239).

5.1 OBJETIVO

1. Evaluar acciones previamente identificadas como resistentes a ZYMV con una cepa local de ZYMV.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Guner y Wehner (2008) previamente identificaron accesiones (“PI”) de sandía con alto nivel de resistencia a la cepa de Florida de *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV-FL). Se solicitaron estas accesiones (“PI”) de la colección de sandía del USDA localizadas en Griffin, Georgia (Tabla 7).

Tabla 7. Germoplasma de sandía evaluado para resistencia de *Zucchini yellow mosaic virus* en el invernadero Recinto Universitario de Mayagüez.

ID	Número de accesión	Taxonomía	País de Origen
1	PI 494528	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Nigeria
2	PI 494529	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Nigeria
3	PI 560016	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Nigeria
4	PI 595200	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Zaire
5	PI 595201	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Zaire
6	PI 595203	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>lanatus</i>	Nigeria
7	PI 537277	<i>Citrullus colocynthis</i>	Pakistán
8	PI 482261	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>citroides</i>	Zimbabwe
9	PI 482276	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>citroides</i>	Zimbabwe
10	PI 485580	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>citroides</i>	Botswana
11	PI 596662	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>citroides</i>	Sur África

En el Ensayo 1 se sembraron las accesiones en tiestos de cuatro pulgadas con Promix PGX® (Premier, Hort Inc., Quakertown, PA) como sustrato en un invernadero del edificio Piñero, UPR de Mayagüez. Los tiestos de las 11 accesiones fueron arreglados en un diseño completamente aleatorizado con 6 repeticiones de cada accesión. A los 14 días después de la siembra se realizaron las inoculaciones mecánicas siguiendo el protocolo descrito en los en Experimento 2.

Para el Ensayo 2 se realizó el mismo procedimiento mencionado anteriormente y en un diseño completamente aleatorizado, solo que se aumentó la cantidad de plantas (repeticiones) a

10 de cada una de las accesiones y también se incluyó ‘Sugar Baby’, ‘Mickey Lee’ y ‘Crimson Sweet’. En ambos ensayos se tomaron observaciones aproximadamente a los 20 días luego de inoculadas las plantas donde se evaluó la severidad de síntomas individualmente en las primeras siete hojas en cada planta. Se utilizó una escala de 0 a 3, donde 0= sin síntomas y 3= síntomas severos. Utilizando la tercera y/o cuarta hoja más joven se realizaron pruebas de serología para la detección de los virus PRSV, ZYMV y la prueba general de POTY a los 28 días después de las inoculaciones mecánicas utilizando la tercera hoja más joven. Se utilizaron “kits” comerciales de Agdia® (Elkhart, Indiana) y los protocolos sugeridos según lo descrito previamente.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para los datos de observaciones de severidad de síntomas y lectura de absorbancia (405 nm) para ZYMV en el programa estadístico InfoStat (Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina). Se compararon las medias de severidad y absorbancia usando la prueba de diferencias mínimas significativas de Tukey ($\alpha=0.05$).

5.3 RESULTADOS

La primera hoja evaluada no presentó síntomas de mosaico y deformación (severidad=3) ya que en la plantas evaluadas la severidad fue entre 0, 1 y 2 en la escala (Figura 6). Todas las accesiones obtuvieron resultados positivos en la prueba ELISA en al menos una planta. Las plantas de Sugar Baby fueron las de mayor número de plantas con severidad=2, mientras que Crimson Sweet mostró severidad=1 en todas las plantas. En la mayoría de las plantas de la accesión 537277 no se observaron síntomas (severidad=0) y los valores de las lecturas de absorbancia resultaron negativos para ZYMV; solo una planta obtuvo severidad=1 con lectura positiva a ZYMV (0.800).

En las evaluaciones de la tercera hoja la mayoría de las accesiones presentaron mayor severidad de síntomas de virus, excepto en 537277 que permaneció con los mismo valores de 0 y 1 (Figura 7). Hubo muchas más plantas con severidad 2 y 3. En la quinta hoja las accesiones 482261, 482276, 485580, 494528, 494529, 560016, 596662, Crimson Sweet y Sugar Baby mostraron severidad=3 aún cuando en algunos casos las lecturas de absorbancia fueron negativas para ZYMV (Figura 8). La accesión 537277 no mostró síntomas en la quinta hoja. Las accesiones 595201 y 595203 llegaron a mostrar severidad 1 y 2, aunque 595201 obtuvo severidad=0 en la mayoría de las plantas. Las plantas de Sugar Baby y Crimson Sweet fueron las que menos se desarrollaron hasta lograr hoja 5 y 7 debido a su susceptibilidad. En el experimento la severidad de síntomas evaluados en la séptima hoja se observó que los resultados fueron similares a los observados en la quinta hoja en todas las plantas (Figura 8 y 9).

La accesión 537277 presentó la media más baja para la clasificación de severidad de síntomas y la lectura de la prueba DAS-ELISA para ZYMV (Tabla 8). No hubo diferencias entre las accesiones 537277, 482261, 482276, 494529, 560016, 595200, 595201, 595203 y 596662.

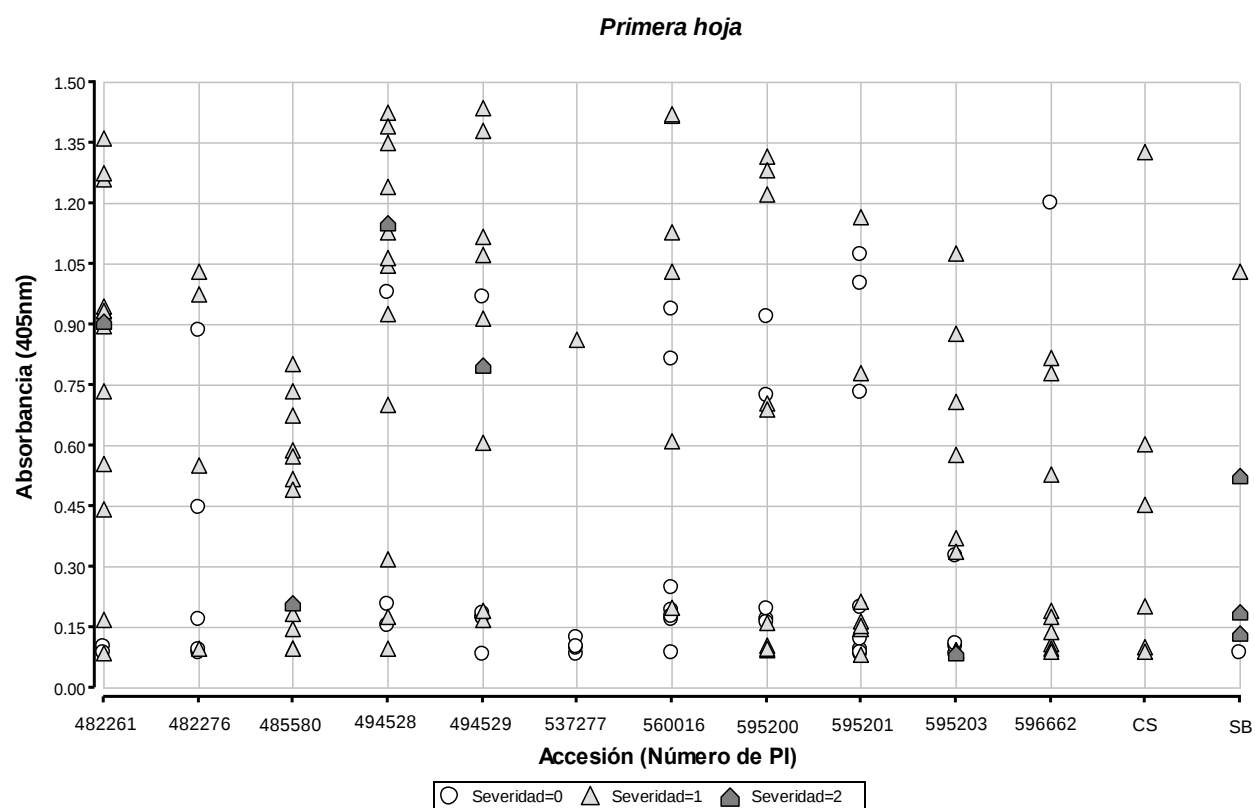


Figura 6. Valores de absorbancia (405 nm) de una prueba DAS-ELISA para *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) en 11 accesiones de sandía (*Citrullus lanatus*) y dos variedades comerciales ‘Crimson Sweet’ (CS) y ‘Sugar Baby’ (SB) inoculadas mecánicamente con ZYMV. Los símbolos diferentes representan cada una las categorías para severidad en la primera hoja donde 0=sin síntomas y 3=síntomas severos. Número de plantas utilizadas: 8 a 16.

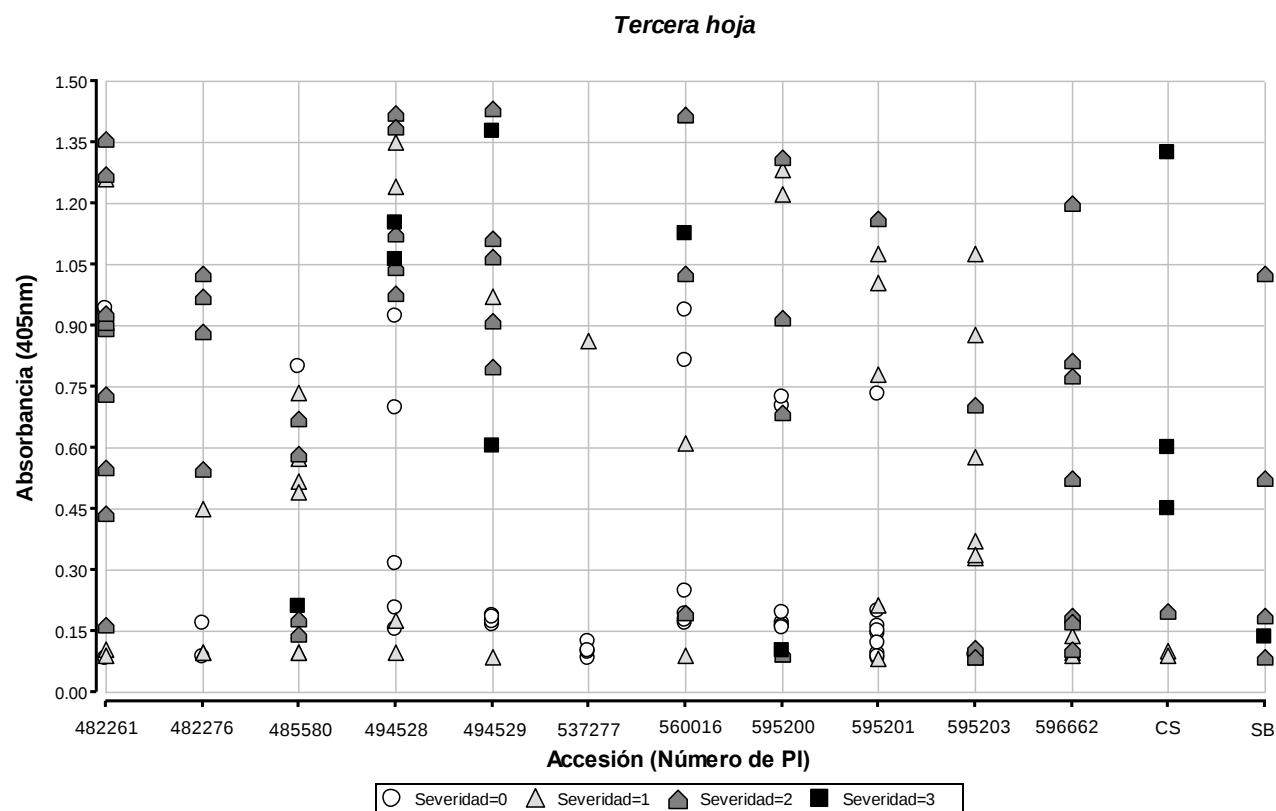


Figura 7. Valores de absorbancia (405 nm) de una prueba DAS-ELISA para *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) en 11 accesiones de sandía (*Citrullus lanatus*) y dos variedades comerciales ‘Crimson Sweet’ (CS) y ‘Sugar Baby’ (SB) inoculadas mecánicamente con ZYMV. Los símbolos diferentes representan cada una las categorías para severidad en la tercera hoja donde 0=sin síntomas y 3=síntomas severos. Número de plantas utilizadas: 8 a 16.

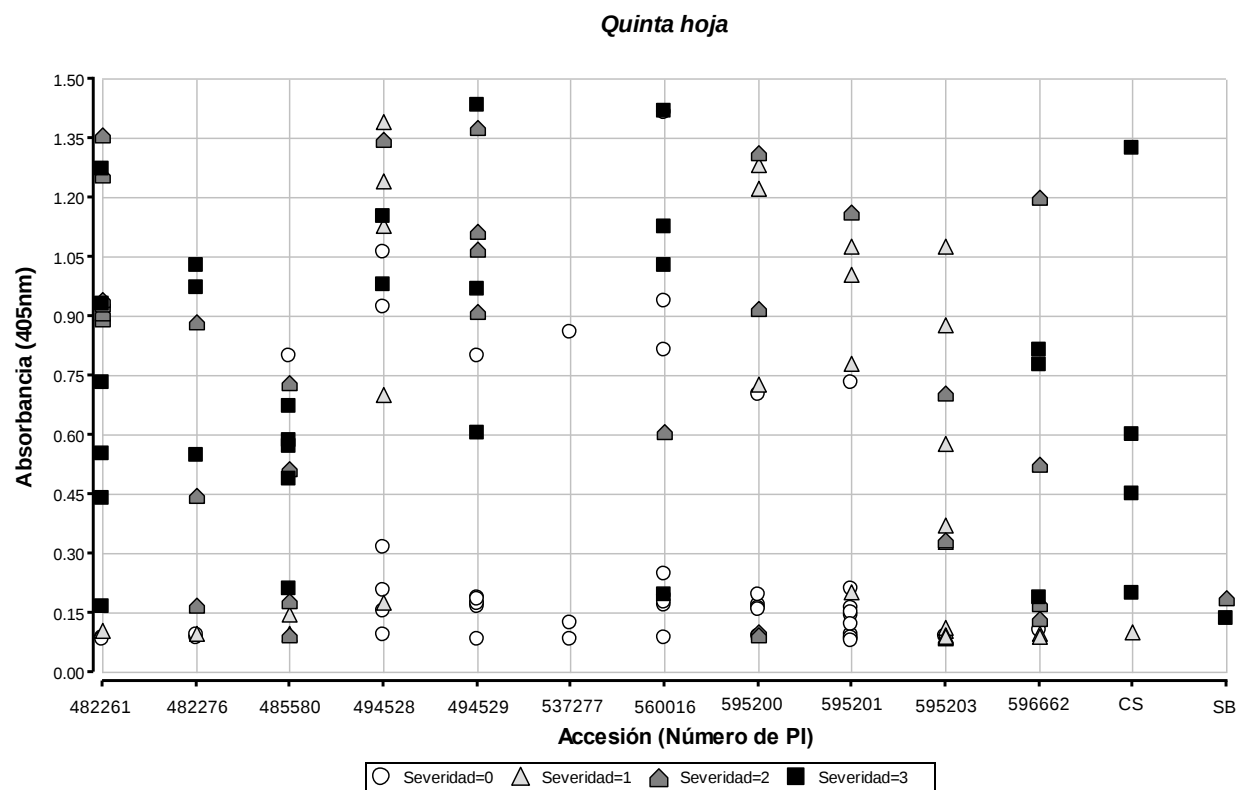


Figura 8. Valores de absorbancia (405 nm) de una prueba DAS-ELISA para *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) en 11 accesiones de sandía (*Citrullus lanatus*) y dos variedades comerciales ‘Crimson Sweet’ (CS) y ‘Sugar Baby’ (SB) inoculadas mecánicamente con ZYMV. Los símbolos diferentes representan cada una las categorías para severidad en la quinta hoja donde 0=sin síntomas y 3=síntomas severos. No todas las plantas estuvieron suficientemente desarrolladas para tener la quinta hoja al momento de la evaluación. Número de plantas utilizadas: 5 a 15.

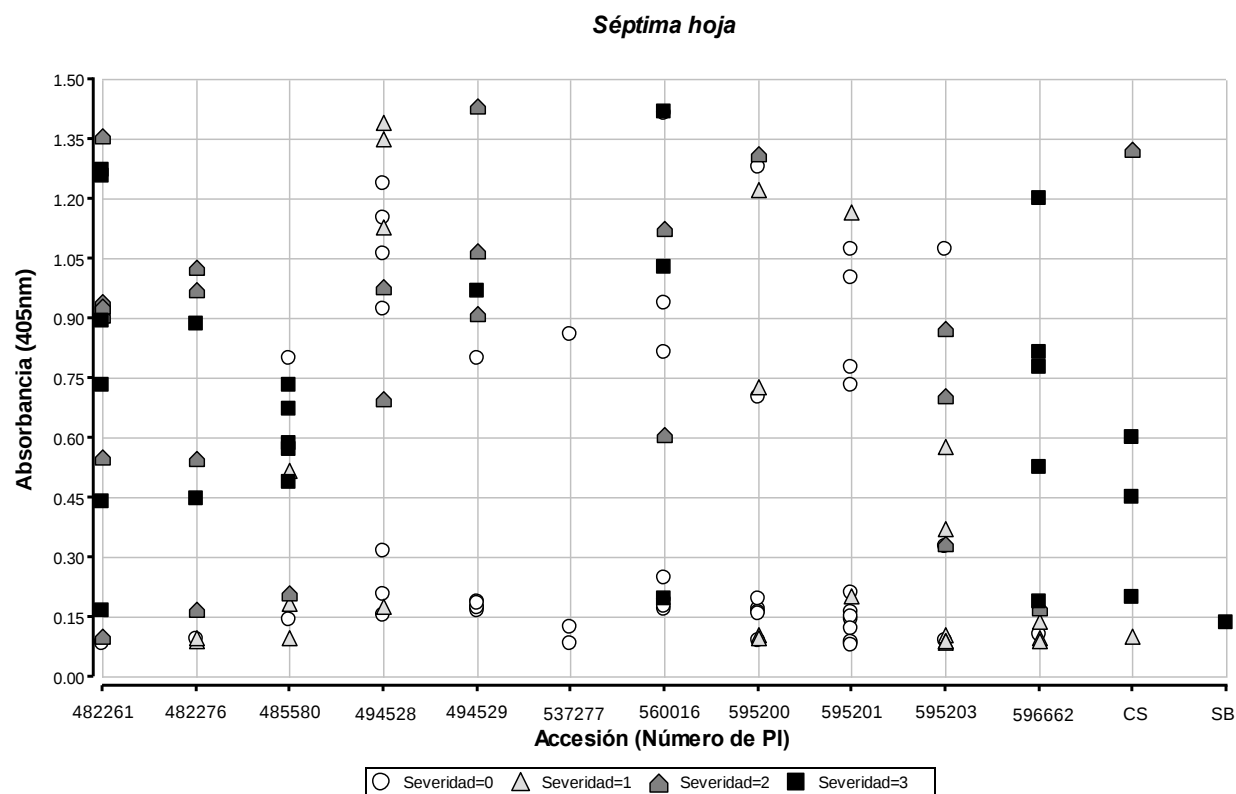


Figura 9. Valores de absorbancia (405 nm) de una prueba DAS-ELISA para *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) en 11 accesiones de sandía (*Citrullus lanatus*) y dos variedades comerciales ‘Crimson Sweet’ (CS) y ‘Sugar Baby’ (SB) inoculadas mecánicamente con ZYMV. Los símbolos diferentes representan cada una las categorías para severidad en la séptima hoja donde 0=sin síntomas y 3=síntomas severos. No todas las plantas estuvieron suficientemente desarrolladas para tener la séptima hoja al momento de la evaluación. Número de plantas utilizadas: 4 a 15.

Tabla 8. Valores promedios de severidad de síntomas en hojas 1, 3, 5 y 7 de sandía (*Citrullus lanatus*) inoculadas mecánicamente con *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) y resultados de absorbancia (405 nm) en la prueba DAS-ELISA para ZYMV.

Accesión	n ¹	Severidad ²				Absorbancia ³
		Hoja 1	Hoja 3	Hoja 5	Hoja 7	
482261	15	0.9 abcd	2.1 cde	2.1 cd	2.1 cd	0.710 ab
482276	9	0.4 abc	1.8 bcde	1.8 bcd	1.8 bcd	0.480 ab
485580	6	1.0 bcd	2.5 de	2.6 d	2.6 d	0.420 ab
494528	16	1.1 cd	1.4 abcd	0.9 abc	0.9 abc	0.790 b
494529	15	0.7 abc	1.4 bcd	1.2 abc	1.2 abc	0.780 b
537277	9	0.2 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.140 a
560016	8	0.9 abcd	1.8 bcde	1.9 cd	1.9 cd	0.840 b
595200	15	0.5 abc	0.8 abc	0.5 ab	0.5 ab	0.600 ab
595201	15	0.3 ab	0.4 ab	0.1 a	0.1 a	0.400 ab
595203	14	0.8 abcd	0.6 ab	0.4 a	0.4 a	0.260 ab
596662	15	0.9 abcd	1.7 bcde	1.8 bcd	1.8 bcd	0.450 ab
Crimson Sweet	8	1.5 de	2.7 de	2.6 d	2.6 d	0.460 ab
Sugar Baby	8	2.0 e	2.8 e	3.0 d	3.0 d	0.390 ab

Dentro de la misma columna medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) en la prueba de diferencias mínimas significativas de Tukey.

¹Algunas plantas no desarrollaron hoja 5 y/o 7 al momento de la evaluación de síntomas. En ocasiones la planta estaba muerta al momento de realizar prueba DAS- ELISA para ZYMV.

²Se observaron los síntomas de virus para ZYMV 20 días después de las inoculaciones mecánicas utilizando la escala 0=sin síntomas y 3=síntomas severos.

³Prueba realizada a los 28 días después de inoculadas.

Las plantas de Sugar Baby reflejaron la media más alta con un valor de severidad de 2.0, no siendo diferente a Crimson Sweet con una media de 1.5 (Tabla 8). También Sugar Baby presentó la media más alta en todas las hojas evaluadas. Pero a su vez Crimson Sweet no fue diferente a las accesiones 482261, 485580, 494528, 560016, 595203 y 596662. La accesión 537277 fue significativamente superior que 494528, Crimson Sweet y Sugar Baby. La severidad de síntomas en la tercera hoja 537277 no fue diferente de Crimson Sweet y Sugar Baby. Las accesiones 482261, 482276, 485580, 560016 y 596662 no fueron diferentes a Crimson Sweet y Sugar Baby en cuanto al valor de severidad. En la quinta hoja no hubo diferencias entre las severidades de accesiones 494528, 494529, 537277, 595200, 595201 y 595203. Tampoco Crimson Sweet y Sugar Baby fueron diferentes de 482261, 482276, 485580, 560016 y 596662. La severidad de síntomas de las plantas en la séptima hoja es similar a la severidad de síntomas observados en la quinta hoja.

En las lecturas de absorbancia para ZYMV la accesión 537277 con la media más baja (0.140) y siendo negativa no fue significativamente diferente de las accesiones 482261, 482276, 485580, 595200, 595201, 595203, 596662 y 560016. Estas obtuvieron medias con absorbancia más altas consideradas positivas en la mayoría de los casos excepto en 595203 que obtuvo un valor de 0.260.

Al correlacionar los datos de severidad de síntomas de virus y lecturas de absorbancia se observó que todos los coeficientes obtuvieron valores positivos (Tabla 8). Los coeficientes de lectura de absorbancia y severidad de síntomas en todas las hojas son valores menores de 0.50 por lo que no existe una buena correlación. La correlación entre hoja 3 y hoja 5 fue de 0.76. El coeficiente de correlación mayor fue entre hoja 5 y hoja 7 con un valor de 0.88. Todos los coeficientes de correlación fueron significativos con $p < 0.01$.

Tabla 9. Coeficientes de correlación entre lecturas de absorbancia (405 nm) en la prueba DAS-ELISA de *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) y severidad de síntomas en accesiones inoculadas mecánicamente con ZYMV.

	Severidad			
	Hoja 1	Hoja 3	Hoja 5	Hoja 7
Absorbancia	0.24	0.39	0.41	0.30
Severidad Hoja 1		0.58	0.47	0.39
Severidad Hoja 3			0.76	0.63
Severidad Hoja 5				0.88
Severidad Hoja 7				

Todos los coeficientes de correlación fueron significativos al nivel de $\alpha=0.01$.

5.4 DISCUSIÓN

Se encontró diferencias en la severidad y en las lecturas de absorbancia en la prueba ELISA para ZYMV entre las accesiones evaluadas. No todas las accesiones presentaron altos niveles de resistencia. Algunas demostraron no ser resistentes a la cepa local de ZYMV, como 482261, 494528, 494529, 560016 y 595200 que presentaban lecturas de absorbancia mayores de 0.600. Pero 494528, 494529 y 595200 mostraron lo que puede ser entendido como una reacción de alta tolerancia a ZYMV con bajos valores de severidad de síntomas promedio. Las accesiones 494528 y 494529 fueron altamente susceptibles con altas lecturas de absorbancia y severidad promedio desde moderada a severa. Las accesiones 560016 y 482261 fueron susceptibles con resultados positivos de ELISA y severidad promedio de moderada a severa.

Los niveles de resistencia fueron muy variados entre las accesiones en comparación con los controles susceptibles. Los controles mostraron fuertes síntomas pero baja lectura de absorbancia en la prueba ELISA para ZYMV. Los resultados demuestran que no existe una alta correlación entre severidad de síntomas y las lecturas de absorbancia. Como se observó con PRSV en el Experimento 2, una alta severidad de síntomas no necesariamente es indicativa de que la lectura de absorbancia es alta también. Se observaron plantas con altas lecturas de absorbancia y severidad de síntomas bajos a moderados como en el caso de accesión 560016. Mientras que el cultivar susceptible presentó una media de severidad de síntomas con el valor más alto pero la lectura de absorbancia fue baja.

La accesión 537277 (*Citrullus colocynthis*) con origen en Pakistán definitivamente resultó con mayor grado de resistencia, obteniendo muy bajos valores de severidad de síntomas y lecturas de absorbancia negativas. Sin embargo, dentro de la misma accesión hubo una planta que reportó lectura alta de absorbancia para ZYMV aunque esta no mostró síntomas visibles de

la enfermedad. Esto puede suceder por la diversidad genética que puede existir entre genotipos de una misma accesión causado por la polinización abierta que ocurre en la sandía. Las accesiones que forman parte de la colección del USDA en muchos casos fueron recolectadas en fincas o en plazas de mercados en países donde los mismos agricultores cosechan semillas para la próxima siembra. Son “variedades criollas” no mejoradas donde en cada generación hay polinización cruzada. Las variedades criollas se caracterizan por ser genéticamente heterogéneas y heterocigóticas (Zeven, 1998).

Identificamos como resistentes las accesiones que obtuvieron severidad de síntomas menor de 2.0 y con bajas lecturas de absorbancia para la prueba ELISA ZYMV. Las accesiones 482276, 537277, 595201, 595203 y 596662 mostraron mayor resistencia que los controles Sugar Baby y Crimson Sweet. Pero ninguna de las accesiones obtuvo absorbancia significativamente más baja que los controles. Guner y Wehner (2008) identificaron como altamente resistentes a las accesiones 482276, 485580, 494528, 560016, 595201, 595203 y 596662. También identificaron la accesión 482261 con resistencia moderada. En nuestro estudio la accesión 482261 no fue superior que los controles susceptibles. Xu et al. (2004) reportaron la resistencia en la accesión 595203 para la cepa de ZYMV oriunda de China donde no observaron ningún síntoma y obtuvieron lecturas ELISA negativas. En nuestro estudio esta accesión mostró un alto nivel de resistencia con muy bajos valores de severidad de síntomas y lectura de absorbancia.

6. CONCLUSIONES

En los experimentos precedentes se abarcaron los tres principales virus de la familia *Potyviridae* que afectan cucurbitáceas en Puerto Rico. En las accesiones evaluadas la marchitez súbita en la sandía causada por *Squash vein yellowin virus* (SqVYV) provocó síntomas muy severos afectando dramáticamente la sandía en Puerto Rico. La mayoría de las accesiones de sandía evaluadas de la colección de germoplasma del USDA fueron muy susceptibles a las infecciones causadas por este virus. No hubo resistencia completa en ninguna de las accesiones. Solamente algunas accesiones evaluadas para SqVYV mostraron potencial de resistencia moderada. Las accesiones que Kousik y colaboradores reportaron como resistentes en el 2009 en Florida no mostraron la misma resistencia. Las accesiones 277997 (Turquía) y 526237 (Zimbabwe) mostraron resistencia en nuestro estudio siendo consistentes durante semana 4, 8 y 12 y baja lectura de absorbancia en la prueba ELISA para potyvirus.

Las nuevas cepas de *Papaya ringspot virus* (PRSV) estudiadas demostraron diferencias en severidad de síntomas. Las cepas 809, 874, 903 y 231 resultaron ser más agresivas que las otras siendo diferentes en cuanto a las lecturas de absorbancia con valores positivos. Las cepas 874 y 903 fueron capaces de infectar *C. moschata* cv. Nigerian Local. Estas dos cepas infectaron sandía usando como inóculo tejido fresco proveniente de plantas de Nigerian Local positivas a PRSV.

La accesión 537277 es altamente resistente a la cepa estándar de ZYMV (239), mientras que accesiones 485580, 494528, 494529, 595200, 595201 y 595203 son más resistentes que los controles Sugar Baby y Crimson Sweet. No hubo relación entre severidad de síntomas y lectura de absorbancia en los experimentos realizados.

Se recomienda realizar ensayos con SqVYV detallados con las accesiones que Kousik et al. (2009) identificaron como resistentes y las que resultaron con alguna resistencia en esta investigación. Se deben evaluar las cepas de PRSV 874 y 903 para observar si estas cepas son capaces de infectar otras plantas identificadas como resistentes a PRSV y para determinar si el virus infecta o es capaz de producir síntomas para que estas no sean utilizadas en trabajos de fitomejoramiento ya que serían susceptibles a estas cepas más agresivas. Se recomienda utilizar la accesión 537277 para futuros trabajos de fitomejoramiento en sandía con resistencia a ZYMV.

7. LITERATURA CITADA

- Acevedo-Torres, V. 2012. Virus asociados al marchitamiento súbito de la sandía (*Citrullus lanatus*) en el suroeste de Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, PR, 101pp.
- Adkins, S., S.E. Webb, D. Anchor, P.D. Roberts, y C.A. Baker. 2007. Identification and characterization of a novel whitefly-transmitted member of the family *Potyviridae* isolated from cucurbits in Florida. *Phytopathology* 97:145-154.
- Adkins, S., S.E. Webb, C.A. Baker, y C.S. Kousik. 2008. Squash vein yellowing virus detection using nested polymerase chain reaction demonstrates that the cucurbit weed *Momordica charantia* is a reservoir host. *Plant Disease* 92:1119-1123.
- Agrios, G. 2005. *Plant Pathology*. 5 edition Elsevier Academic Press, Burlington, Maine. 725-756 pp.
- Astier, S., J. Albouy, Y. Maury, C. Robaglia y H. Lecoq. 2007. *Principles of Plant Virology*. Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Baker, C., S. Webb y S. Adkins. 2008. Squash Vein Yellowing Virus, Causal Agent of Watermelon Vine Decline in Florida. Plant Pathology Circular No. 407 Department of Agriculture & Consumer Services, Division of Plant Industry, FL, USA.
- Bioversity International. 2007. Developing crop descriptor lists: Guidelines for developers. Bioversity Technical Bulletin No.13. Bioversity International, Rome, Italy.
- Blancard, D., H. Lecoq, and M. Pitrat. 1991. *Maladies des cucurbitacees*. Observer, identifier, lutter. PHM and INRA-Editions, Paris, France.
- Brown, R.N., A. Bolaños-Herrera, J.R. Myers and M.M. Jahn. 2003. Inheritance of resistance to four cucurbit viruses in *Cucurbita moschata*. *Euphytica* 129:253-258.
- Brunt, A.A., K. Crabtree, M.J. Dallwitz, A.J. Gobbs y L. Watson. 1996. *Viruses of plants*. CAB International. Wallingford, Oxon, U.K.
- Byrne, D.N. y T.S. Jr. Bellows. 1991. Whitefly Biology. *Annual Review of Entomology*. 36:431-457.
- Clark, M.F. y M. Bar-Joseph. 1984. Enzyme immunosorbent assay in plant virology. *Methods in Virology* 7: 51-85.
- Clark, M.F. y A.N. Adams. 1997. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.

- De Oliveira, A.C., W. Maluf, J.E. Pinto y S. Azevedo. 2003. Resistencia to *Papaya ringspot virus* in summer squash *Cucurbita pepo* L. introgressed from an interspecific *C. pepo* x *C. moschata* cross. *Euphytica* 132: 211-215.
- Departamento de Agricultura de Puerto Rico. 2010. Tabla de Ingreso Bruto Agrícola: año fiscal 2008-2009. Recuperado de <http://www.gobierno.pr> en octubre, 2010.
- Egel, D.S. y S. Adkins. 2007. *Squash vein yellowing virus* identified in watermelon (*Citrullus lanatus*) in Indiana. *Plant Disease* 91:1056.
- Estévez de Jensen, C., G.E. Fornaris, R. Morales y W. Mercado. 2006. Enfermedades prevalentes en la sandía en el área sur de Puerto Rico. *Caribbean Food Crops Society*, 42 Annual Meeting, Carolina, Puerto Rico. Vol: XLII No 2:209-213.
- Food and Agriculture Organization 2009. Table 36- World watermelon production, 1980-2007. Recuperado de <http://www.fao.org> en noviembre, 2010.
- Guner N. y T.C. Wehner. 2008. Overview of Potyvirus resistance in watermelon. *Cucurbitaceae* 2008, Proceedings of the IX EUCARPIA meeting on genetics and breeding of *Cucurbitaceae* (Pitrat M, ed), INRA, Avingnon, France. pp 445-451.
- Hubber, M. 2006. Taking vital vines. *Citrus and Vegetable Magazine* 70:22-24.
- Hull, R. 2002. *Matthew's Plant Virology*. 4edición. Academic Press, Inc.
- Jensen, D.D. 1949. Papaya virus diseases with special reference to papaya ringspot. *Phytopathology* 39:191-211.
- Juárez, Benito. 2006. Programa de mejoramiento genético de sandía en seminis. Recuperado de www.uaaan.mx/academic/horticultura/memhort03/Ponencia_03.pdf en marzo, 2010.
- Kosaka, Y. and Fukunishi, T. 1997. Multiple inoculation with three attenuated viruses for the control of cucumber virus disease. *Plant Diseases*. 81: 733-738.
- Kousik, C.S., S. Adkins, W.W. Turechek y P.D. Roberts. 2009. Sources of resistance in U.S. plant introductions to watermelon vine decline caused by *Squash vein yellowing virus*. *Hort-Science* 44(2):256-262.
- Lecoq, H., G. Wisler y M. Pitrat. 1998. *Cucurbitaceae'98: Evaluation and enhancement of cucurbit germplasm*. James D. McCreight (ed.). ASHS Press. Alexandria, VA 377p.
- Li, W., M.E. Hilf, S.E. Webb, C.A. Baker, and S. Adkins. 2008. Presence of P1b and absence of HC-Pro in Squash vein yellowing virus suggests a general feature of the genus *Ipomovirus* in the family *Potyviridae*. *Virus Research*: 135(2):213-219. Maluf, W.R., W.M.

- Lovisol, O. 1980. Virus and viroid diseases of cucurbit. *Acta Hort.* 88:33-82.
- Maluf, W.R., J.J. Pereira and A.R. Figueira. 1997. Inheritance of resistance to the *papaya ringspot virus*-watermelon strain from two different accessions of winter squash. *Cucurbita maxima* Dush. *Euphytica* 94:163-168.
- Maluf, W.R., W.M. Moura, I.S. Silva and M. Castelo-Branco. 1986. Screening of *Cucurbita* spp. accessions for resistance to watermelon mosaic virus-1. *Revista Brasileira de Genética* 9(1):161-167.
- Marshall, D.R. 1990. Crop Genetic Resources: Current and Emerging Issues. En: *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. pp. 367-388. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Matthews, R.E.F. 1991. *Plant Virology*. 3 Edition, Academic Press Inc, New York. 835pp.
- Nault L.R. 1997. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Annual Entomological Society of America*. 90: 522-541.
- Ng, J.C.K and W.F. Bryce. 2006. Virus-Vector Interactions Mediating Nonpersistent and Semipersistent Transmission of Plant Viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 44:183-212.
- Odu, B.O., R. Asiedu, S.A. Shoyinka and J.A. Hughes. 2011. Analysis of resistance to *Yam mosaic virus*, genus Potyvirus in white guinea yam (*Dioscorea rotundata* poir.) genotypes. *Journal of Agricultural Science* 56(1):1-13
- Paz-Carrasco, L. y L. Wessel-Beaver. 2002. Survey of cucurbita viruses found in Puerto Rico. En: D.N. Maynard (ed.), *Cucurbitaceae* 2002: 256-264. American Society for Horticultural Science Press. Alexandria, VA.
- Polanco-Florián, L. 2009. El marchitamiento súbito de la sandía [*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum & Nakai]. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, PR, 97pp.
- Provvidenti, R. 1986. Viral disease of cucurbits and sources of resistance. *Food and Fert. Technol. Center., Taiwan, Tech. Bul.*
- Provvidenti, R. 1991. Inheritance of resistance to the Florida strain of *Zucchini yellow mosaic virus* in watermelon. *HortScience* 26(4):407-408.
- Provvidenti, R. 1993. Resistance to viral diseases of cucurbits, p.8-43. En: M.M. Kyle (ed.). *Resistance to viral diseases of vegetables: Genetics and breeding*. Timber Press, Portland, Ore.

- Provvidenti, R., 1996. Disease caused by viruses. En: T.A. Zitter, D.L. Hopkins, y C.E. Thomas (eds.). pp. 37-45 Compendium of cucurbit disease. APS Press, St. Paul, MI.
- Provvidenti, R., 1997. New American summer squash cultivars possessing a high level of resistance to a strain of *Zucchini yellow mosaic virus* from China. Cucurbit Genetics Cooperative Reporter 20:57-58.
- Purcifull, D., J. Edwardson, E. Hiebert y D. Gonsalves. 1984. *Papaya ringspot virus*. CMI/AAB. Descriptions of Plant Viruses No. 209 (No. 84 revised, July 1984), 8.
- Resende, L.V., W.R. Maluf, A.R. Figueira and J.T.V. Resende. 2000. Correlations between symptoms and DAS-ELISA values in two sources of resistance against *Tomato spotted wilt virus*. Brazilian Journal of Microbiology, 31(2), 135-139.
- Roberts, P., R. Muchovej, R. Urs, D. Achor. C. Baker, B. Bruton, y S. Adkins. 2005. Investigation into mature watermelon vine decline and fruit rot. Phytopathology 95:S89
- Robinson, R.W. y D.S. Decker-Walters. 1997. Cucurbits. Cab International, Oxon (GB) pp. 84-88.
- Rodrigues, J.C.V., L. Wessel-Beaver and C. Estevez-Jensen. 2007. Whitefly-transmitted potyvirus associated with watermelon vine decline in Puerto Rico. Entomological Society of America 55th Annual Meeting, Dec. 9-12, San Diego, CA.
- Strange, E.B., N. Guner, y T.C. Wehner. 2002. Screening the Watermelon Germplasm Collection for Resistance to Papaya Ringspot Virus Type-W. *Crop Sci.* 42: 1324-1330.
- Torrance, L. y R.A.C. Jones. 1981. Recent developments in serological methods suited for use in Soutine testing for plant viruses. Plant Pathology 30: 1-20.
- Tripathi, S., J. Suzuki, S. Ferreira y D. Gonsalves. 2008. *Papaya ringspot virus-P*: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. Molecular Plant Pathology 9(3):269-280.
- Tsuda, S., M. Kameya-Iwaki, K. Hanada, Y. Kouda, M. Hikata y K. Tomaru. 1992. A novel detection and identification technique for plant viruses: Rapid Immunofilter Paper Assay (RIPA). Plant Disease 76(5):466-469.
- Wai, T. y R. Grument. 1995. Inheritance of resistance to *Watermelon mosaic virus* in cucumber line TMG-1: Tissue-specific expression and relationship to *Zucchini yellow mosaic virus* resistance. Theor. Appl. Genet. 91:699-706.
- Wang, Y., R. Provvidenti, y R. Robinson. 1984. Inheritance of resistance to *Watermelon mosaic virus* 1 in cucumber. HortScience 19:587-588.

- Watson, M.A. y F.M. Roberts. 1939. A comparative study of the transmission of Hyoscyamusvirus 3, potato virus Y and cucumber virus 1 by the vectors *Myzus persicae*, *M. circumflexus* and *Macrosiphumgei*. Proc. R. Soc. Lond., ser. B, 127, 543-573.
- Webb, S.E., E. Hiebert y T.A. Kucharek. 2003. Identity and distribution of virus infecting cucurbits in Florida. Phytopathology 93(suppl.):S89.
- Webb, S.E., S. Adkins, y C.A. Baker. 2006. Whitefly transmission of a new virus infecting cucurbits in Florida. pp 309-316. Proceedings of Cucurbitaceae 2006. G.J. Holmes, (ed). Universal Press, Raleigh, North Carolina.
- Xu, Y., D. Kang, Z. Shi, H. Shen and T. Wehner. 2004. Inheritance of resistance to *Zucchini yellow mosaic virus* and *Watermelon mosaic virus* in Watermelon. Journal of Heredity 2004:95(6):498–502.
- Zeven, A. C. 1998. Landraces: A review of definitions and classifications. Euphytica 104 (2): 127–139.

8. APENDICE:

Apéndice Tabla 1. Listado de germoplasma de sandía (*Citrullus lanatus*) evaluado para SqVYV.

ID	ACP	ACNO	TAXON	ACIMPT	COUNTRY	STATE
1	PI	386015			Iran	
2	PI	295848	Citrullus lanatus		South Africa	
3	PI	320988	Citrullus lanatus			
4	Grif	15896	Citrullus lanatus var. citroides	UNCERTAIN		
5	PI	244018	Citrullus lanatus var. citroides			
6	PI	248774	Citrullus lanatus var. citroides		Namibia	
7	PI	255136	Citrullus lanatus var. citroides			
8	PI	270562	Citrullus lanatus var. citroides		South Africa	
9	PI	271769	Citrullus lanatus var. citroides			
10	PI	288316	Citrullus lanatus var. citroides		India	Gujarat
11	PI	295850	Citrullus lanatus var. citroides		South Africa	
12	PI	296334	Citrullus lanatus var. citroides		South Africa	Transvaal
13	PI	296335	Citrullus lanatus var. citroides		South Africa	Natal
14	PI	296337	Citrullus lanatus var. citroides		South Africa	Cape Province
15	PI	296341	Citrullus lanatus var. citroides		South Africa	Cape Province
16	PI	299379	Citrullus lanatus var. citroides		South Africa	Cape Province
17	PI	482246	Citrullus lanatus var. citroides	CULTIVATED	Zimbabwe	
18	PI	485580	Citrullus lanatus var. citroides	LANDRACE	Botswana	
19	PI	485583	Citrullus lanatus var. citroides	LANDRACE	Botswana	
20	PI	500308	Citrullus lanatus var. citroides	CULTIVATED	Zambia	
21	PI	500334	Citrullus lanatus var. citroides	CULTIVATED	Zambia	
22	PI	500354	Citrullus lanatus var. citroides	CULTIVATED	Zambia	
23	PI	512854	Citrullus lanatus var. citroides	LANDRACE	Spain	Valencia
24	PI	532668	Citrullus lanatus var. citroides	WILD	Swaziland	
25	PI	532670	Citrullus lanatus var. citroides	WILD	Botswana	
26	PI	596659	Citrullus lanatus var. citroides	WILD	South Africa	
27	PI	596662	Citrullus lanatus var. citroides	WILD	South Africa	Transvaal
28	PI	596696	Citrullus lanatus var. citroides	WILD	South Africa	Transvaal
29	PI	606135	Citrullus lanatus var. citroides	CULTIVATED		
30	Grif	1734	Citrullus lanatus var. lanatus			
31	PI	163202	Citrullus lanatus var. lanatus		India	Punjab
32	PI	164543	Citrullus lanatus var. lanatus		India	Rajasthan
33	PI	164992	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Ankara
34	PI	164998	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Ankara
35	PI	167222	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Icel
36	PI	169241	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Antalya
37	PI	169247	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Mugla
38	PI	169261	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Manisa
39	PI	169277	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Canakkale
40	PI	169291	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Bursa
41	PI	169292	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Bursa
42	PI	171585	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Tokat
43	PI	172801	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Urfa
44	PI	174108	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Malatya
45	PI	176499	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Eskisehir
46	PI	176913	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Konya
47	PI	177326	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Hakkari
48	PI	178873	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Cankiri

49	PI	179242	Citrullus lanatus var. lanatus		Iraq	
50	PI	179877	Citrullus lanatus var. lanatus		India	Rajasthan
51	PI	179878	Citrullus lanatus var. lanatus		India	Rajasthan
52	PI	180277	Citrullus lanatus var. lanatus		India	Gujarat
53	PI	182932	Citrullus lanatus var. lanatus		India	Maharashtra
54	PI	183218	Citrullus lanatus var. lanatus			
55	PI	186490	Citrullus lanatus var. lanatus		Nigeria	
56	PI	186975	Citrullus lanatus var. lanatus		Ghana	
57	PI	195562	Citrullus lanatus var. lanatus		Ethiopia	
58	PI	200733	Citrullus lanatus var. lanatus		Guatemala	Alta Verapaz
59	PI	211013	Citrullus lanatus var. lanatus		Afghanistan	Heart
60	PI	211851	Citrullus lanatus var. lanatus			
61	PI	212208	Citrullus lanatus var. lanatus			
62	PI	212288	Citrullus lanatus var. lanatus		Afghanistan	Heart
63	PI	217937	Citrullus lanatus var. lanatus		Pakistan	
64	PI	219907	Citrullus lanatus var. lanatus		Afghanistan	
65	PI	220779	Citrullus lanatus var. lanatus		Afghanistan	
66	PI	222711	Citrullus lanatus var. lanatus		Iran	West Azerbaijan
67	PI	222712	Citrullus lanatus var. lanatus		Iran	West Azerbaijan
68	PI	222775	Citrullus lanatus var. lanatus		Iran	
69	PI	222776	Citrullus lanatus var. lanatus		Iran	
70	PI	223764	Citrullus lanatus var. lanatus		Afghanistan	Badakhshan
71	PI	227204	Citrullus lanatus var. lanatus		Japan	Aichi
72	PI	228237	Citrullus lanatus var. lanatus			
73	PI	229604	Citrullus lanatus var. lanatus		Iran	Mazandaran
74	PI	229686	Citrullus lanatus var. lanatus		Iran	Mazandaran
75	PI	247399	Citrullus lanatus var. lanatus			
76	PI	248178	Citrullus lanatus var. lanatus		Zaire	
77	PI	249010	Citrullus lanatus var. lanatus			
78	PI	251796	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
79	PI	254624	Citrullus lanatus var. lanatus			
80	PI	254737	Citrullus lanatus var. lanatus			
81	PI	269680	Citrullus lanatus var. lanatus			
82	PI	270306	Citrullus lanatus var. lanatus			
83	PI	270309	Citrullus lanatus var. lanatus			
84	PI	270548	Citrullus lanatus var. lanatus			
85	PI	270550	Citrullus lanatus var. lanatus			
86	PI	271466	Citrullus lanatus var. lanatus		India	Rajasthan
87	PI	271750	Citrullus lanatus var. lanatus			
88	PI	271751	Citrullus lanatus var. lanatus			
89	PI	271752	Citrullus lanatus var. lanatus			
90	PI	271984	Citrullus lanatus var. lanatus			
91	PI	271986	Citrullus lanatus var. lanatus			
92	PI	271987	Citrullus lanatus var. lanatus			
93	PI	274035	Citrullus lanatus var. lanatus		South Africa	Cape Province
94	PI	274561	Citrullus lanatus var. lanatus			
95	PI	274795	Citrullus lanatus var. lanatus			
96	PI	275632	Citrullus lanatus var. lanatus		India	Rajasthan
97	PI	276658	Citrullus lanatus var. lanatus			
98	PI	277279	Citrullus lanatus var. lanatus			
99	PI	277971	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Adiyaman
100	PI	277977	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Afyon
101	PI	277983	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Antalya
102	PI	277994	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Bilecik

103	PI	277997	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Bingol
104	PI	278007	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Gaziantep
105	PI	278017	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Izmir
106	PI	278029	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Kirklareli
107	PI	278046	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Nigde
108	PI	278053	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Tunceli
109	PI	278058	Citrullus lanatus var. lanatus		Turkey	Usak
110	PI	293765	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Soviet Union	
111	PI	296332	Citrullus lanatus var. lanatus		South Africa	Transvaal
112	PI	299563	Citrullus lanatus var. lanatus		South Africa	
113	PI	306365	Citrullus lanatus var. lanatus		Gabon	
114	PI	306366	Citrullus lanatus var. lanatus		Gabon	
115	PI	307608	Citrullus lanatus var. lanatus		Nigeria	
116	PI	307609	Citrullus lanatus var. lanatus		Nigeria	
117	PI	314148	Citrullus lanatus var. lanatus		Uzbekistan	Samarqand
118	PI	326516	Citrullus lanatus var. lanatus		Ghana	
119	PI	345544	Citrullus lanatus var. lanatus		Ukraine	
120	PI	357661	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
121	PI	357664	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
122	PI	357668	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
123	PI	357710	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
124	PI	357753	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
125	PI	370426	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
126	PI	378615	Citrullus lanatus var. lanatus		Zaire	
127	PI	379226	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
128	PI	379227	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
129	PI	379230	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
130	PI	379233	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
131	PI	379237	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
132	PI	379246	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
133	PI	379249	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
134	PI	379252	Citrullus lanatus var. lanatus		Former Serbia and Montenegro	
135	PI	381696	Citrullus lanatus var. lanatus		India	
136	PI	381700	Citrullus lanatus var. lanatus		India	
137	PI	381708	Citrullus lanatus var. lanatus		India	
138	PI	381721	Citrullus lanatus var. lanatus		India	
139	PI	381725	Citrullus lanatus var. lanatus		India	
140	PI	381733	Citrullus lanatus var. lanatus		India	
141	PI	381734	Citrullus lanatus var. lanatus		India	
142	PI	385963	Citrullus lanatus var. lanatus			
143	PI	385964	Citrullus lanatus var. lanatus			
144	PI	392291	Citrullus lanatus var. lanatus		Kenya	Coast
145	PI	420320	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Italy	
146	PI	431579	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	India	
147	PI	435991	Citrullus lanatus var. lanatus		China	
148	PI	438671	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Mexico	Yucatan
149	PI	438675	Citrullus lanatus var. lanatus	WILD	Mexico	Chiapas
150	PI	457916	Citrullus lanatus var. lanatus		Liberia	
151	PI	458738	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Paraguay	Chaco
152	PI	459074	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Botswana	
153	PI	459075	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Botswana	
154	PI	481871	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Sudan	Darfur
155	PI	482247	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
156	PI	482248	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	

157	PI	482250	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
158	PI	482253	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
159	PI	482254	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
160	PI	482262	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
161	PI	482263	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
162	PI	482266	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
163	PI	482267	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
164	PI	482274	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
165	PI	482275	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
166	PI	482288	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
167	PI	482289	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
168	PI	482314	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
169	PI	482337	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
170	PI	482348	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
171	PI	482351	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zimbabwe	
172	PI	487458	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Venezuela	Amazonas
173	PI	490379	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Mali	
174	PI	494529	Citrullus lanatus var. lanatus		Nigeria	Oyo
175	PI	500310	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zambia	
176	PI	500336	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zambia	
177	PI	500346	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zambia	
178	PI	500347	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zambia	
179	PI	500353	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Zambia	
180	PI	502317	Citrullus lanatus var. lanatus	WILD	Uzbekistan	Samarqand
181	PI	505594	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Zambia	
182	PI	505595	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Zambia	
183	PI	505935	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	China	Henan
184	PI	506439	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Moldova	
185	PI	507859	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Hungary	
186	PI	508442	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVAR		
187	PI	512344	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Spain	Zaragoza
188	PI	512361	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Spain	Caceres
189	PI	512366	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Spain	Caceres
190	PI	512371	Citrullus lanatus var. lanatus	WILD	Spain	Alicante
191	PI	512381	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVAR	Spain	Castellon de Plana
192	PI	512382	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Spain	Castellon de Plana
193	PI	512386	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Spain	Valencia
194	PI	518606	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVAR	Russian Federation	
195	PI	525086	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Egypt	Sawhaj
196	PI	525088	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Egypt	Sawhaj
197	PI	525096	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Egypt	
198	PI	525100	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Egypt	Cairo
199	PI	526231	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Zimbabwe	
200	PI	526232	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Zimbabwe	
201	PI	526234	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Zimbabwe	
202	PI	526237	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Zimbabwe	
203	PI	526238	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Zimbabwe	
204	PI	526239	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Zimbabwe	
205	PI	532811	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVAR	China	
206	PI	534587	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Syria	
207	PI	534588	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Syria	
208	PI	535947	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Cameroon	
209	PI	535948	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Cameroon	

210	PI	536449	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Maldives	
211	PI	537270	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Pakistan	Punjab
212	PI	537274	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE	Pakistan	Punjab
213	PI	537461	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Spain	
214	PI	542116	Citrullus lanatus var. lanatus	WILD	Botswana	
215	PI	543210	Citrullus lanatus var. lanatus	CULTIVATED	Bolivia	Beni
216	PI	549162	Citrullus lanatus var. lanatus	WILD	Chad	
217	PI	559999	Citrullus lanatus var. lanatus	WILD	Nigeria	Oyo
218	PI	560011	Citrullus lanatus var. lanatus	WILD	Nigeria	Ogun
219	PI	560018	Citrullus lanatus var. lanatus	WILD	Nigeria	Oyo
220	PI	593350	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE		
221	PI	593383	Citrullus lanatus var. lanatus	LANDRACE		
222	PI	381749				