

**HERENCIA DE LA RESISTENCIA A *PAPAYA RINGSPOT VIRUS-W* EN
CULTIVARES TROPICALES DE CALABAZA (*CUCURBITA MOSCHATA*)**

por

Robert Alan McPhail Medina

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado

MAESTRO EN CIENCIAS

en

AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGUEZ
2010

Aprobado por:

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

Fecha

Silvia Cianzio, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

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

Fecha

Carmen Santana, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Hipólito O’Farrill, Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

RESUMEN

El *Papaya ringspot virus*, cepa de sandía (PRSV-W), es una de las enfermedades más limitantes en la producción de calabaza (*Cucurbita moschata* Duchesne). Se ha reportado que el cultivar ‘Nigerian Local’ (NL), proveniente de África, posee una resistencia monogénica recesiva a PRSV-W. Esfuerzos previos conducidos a la incorporación de resistencia a PRSV-W en genotipos locales susceptibles mediante un programa de retrocruzamiento sugieren que la herencia es más compleja. Las poblaciones utilizadas en el presente estudio provienen del cruce entre el cultivar resistente NL, con cada uno de los cultivares susceptibles, ‘Soler’, ‘Taina Dorada’, ‘Verde Luz’ y ‘Waltham’. Las plantas se inocularon mecánicamente con PRSV-W en etapa de cotiledones y se observaron por 20 días bajo condiciones de invernadero. Los síntomas que predominaron fueron: mosaicos, deformación, pústulas, puntos cloróticos y amarillamiento de venas, principalmente en hojas en una amplia gama de severidad. El cultivar NL lució consistentemente libre de síntomas. Al agrupar las cuatro clases de severidad (de 0-3, donde 0= plantas libre de síntomas y 3= plantas con síntomas severos) entre resistentes y susceptibles, cada población F_2 ajustó a un radio de segregación 1:3 (resistentes: susceptibles). Las plantas F_2 clasificadas como resistentes se trasladaron al campo donde la mayoría se mantuvo sin síntomas evidentes por el resto de su ciclo de vida y a partir de estas se generaron familias F_3 . La respuesta de las familias F_3 al ser inoculadas con PRSV-W fue variada: pocas presentaron resistencia uniforme (libre de síntomas) o susceptibilidad uniforme, y la mayoría presentaron una atenuación de síntomas (mayormente severidad=1), en comparación a sus respectivos parentales. Este estudio sugiere que la herencia de la resistencia a PRSV-W es más compleja que una monogénica recesiva y demostró la importancia de realizar un estudio de progenie de individuos resistentes cuando se selecciona para resistencia al PRSV-W en el cultivo de calabaza.

ABSTRACT

Papaya ringspot virus, watermelon strain (PRSV-W), is one of the most limiting diseases in pumpkin and squash (*Cucurbita moschata* Duchesne) worldwide. A monogenic recessive resistance to PRSV-W has been reported in the Africa landrace *C. moschata* cv. 'Nigerian Local' (NL). The experience during a backcrossing program to incorporate resistance found in NL into local tropical genotypes suggests that inheritance of PRSV-W is more complex than a single recessive gene. F₁, F₂, backcross and F₃ populations were derived from crosses between NL and each one of the susceptible cultivars, 'Taina Dorada', 'Verde Luz', 'Soler' and 'Waltham'. The populations were mechanically inoculated with PRSV at cotyledon stage and were observed for about 20 days under greenhouse conditions. The range of symptoms was very similar between each population throughout all the evaluations under greenhouse conditions: mosaics or mottling, distortions, blisters, chlorotic spots and discoloration of veins were present in a wide range of severity. Inoculated plants of NL remained completely free of symptoms. When the four classes of disease severity (0-3, where 0= symptom-free plants and 3= severe symptoms plants) were combined for each F₂ population, a 1:3 (resistant: susceptible) ratio was observed as would be expected with a single recessive gene for resistance. Many of the resistant F₂ individuals showed some degree of very mild symptoms, rather than being symptom-free. When these F₂ individuals classified as resistant were planted in the field, most of these plants remained with very mild PRSV-W symptoms or symptom-free. The response of F₃ families derived from resistant F₂ plants was diverse: very few showed uniform resistance or uniformly severe symptoms and most showed weak PRSV-W symptoms. This study suggests that inheritance of resistance to PRSV-W is more complex than a single recessive gene, and demonstrates the importance of progeny testing of resistant individuals when selecting for PRSV-W resistance in pumpkins or squash.

AGRADECIMIENTOS

Durante el transcurso de mis estudios graduados hubo personas que sin su colaboración y ayuda hubiera sido imposible desarrollar la investigación y completar el grado; a ellos le dedico esta sección de reconocimiento.

Quiero comenzar agradeciendo a mi mentora, Dra. Linda Wessel Beaver por darme la oportunidad de realizar la investigación bajo su supervisión. Durante todo el transcurso ella me ofreció motivación, apoyo, y consejos que me ayudaron a mantenerme firme y con ganas de continuar. Bajo su tutela, pude aprender a escribir documentos técnicos, a realizar pósters, desarrollar conferencias y hasta me dio la oportunidad de salir fuera de la isla a presentar la investigación. También quiero agradecer a los profesores, Dra. Lydia Rivera, Dr. Feiko Ferwenda y Dr. Jose Carlos Rodrigues por brindarme su ayuda cada vez que la necesité y por permitirme utilizar sus facilidades de laboratorio cada vez que fuera necesario. Agradezco a mis compañeros de trabajo, Obed Román y Luis Genaro Sierra por brindarme su amistad y colaboración incondicionalmente; a todos mis amigos por estar ahí cuando los necesité; y por último, y no menos importante, agradezco profundamente a mi familia, por su apoyo y amor incondicional, siempre los llevo en mi corazón, este logro se lo dedico a ustedes, GRACIAS.

La investigación fue apoyada económicamente por: “USDA-CRREES – Hispanic Serving Institutions Education Grants Program Award No. 2006-38422-17106, USDA-CSREES-TSTAR Program Award No. 2006-34135-17545 (PR00TSTAR117) y PR00TSTAR123 Program Award No. 2008-34135-19505, USDA-CSREES-HATCH, PR 00421”, y la Estación Experimental de Puerto Rico.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDO	v
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Los Virus de Plantas	4
2.2 Virus en Cucurbitáceas	7
2.3 <i>Papaya Ringspot Virus (PRSV)</i>	8
2.3.1 <i>Características Biológicas</i>	8
2.3.2 <i>Partícula Viral y Propiedades Genómicas</i>	9
2.3.3 <i>Transmisión: Relación Virus- Vector</i>	10
2.4 Calabaza Tropical (<i>Cucurbita moschata</i> Duch.)	12
2.4.1 <i>Características Biológicas</i>	12
2.4.2 <i>Origen, Domesticación y Distribución Mundial</i>	13
2.4.3 <i>Mantenimiento de Germoplasma</i>	13
2.4.4 <i>Usos y Valor Nutricional</i>	14
2.5 Diagnostico de Enfermedades Virales	15
2.5.1 <i>Técnicas Serológicas</i>	16
2.5.2 <i>Reacción en cadena de polimerasa (PCR) y transcripción en reversa (RT)</i>	17
2.6 Manejo y Control de Enfermedades Virales	18
2.6.1 <i>Prácticas Culturales</i>	18
2.6.2 <i>Resistencia Genética</i>	19
3 MATERIALES Y METODOS	23
3.1 Mantenimiento del Inoculo e Inoculación Mecánica	23
3.2 Ensayo Serológico – ELSA-DAS	24
3.3 Ensayo de Herencia	25
3.3.1 <i>Experimento Preliminar</i>	26
3.3.2 <i>Experimento Principal</i>	29
3.4 Evaluación en el campo de plantas F₂ Resistentes a PRSV-W	30
3.5 Evaluación de Familias F₃ Derivadas de Plantas F₂ Resistentes	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Ensayo de Herencia	31

4.2	Evaluación en el Campo de Plantas F ₂ Resistentes	38
4.3	Evaluación de Familias F ₃ Derivadas de Plantas F ₂ Resistentes	39
5	DISCUSIÓN	42
6	CONCLUSIÓN	45
	LITERATURA CITADA	47

LISTA DE TABLAS

Tablas	Página
Tabla 1. Síntomas y escala de severidad de la enfermedad causada por PRSV en cultivares tropicales (Soler, Taína Dorada y Verde Luz) de <i>Cucurbita moschata</i>	27
Tabla 2. Valores promedios de absorbancia (A405 nm) para cada clase de severidad de enfermedad observada al combinar todas las plantas de cada población evaluada en el ensayo de herencia de resistencia a <i>Papaya ringspot virus- W</i> en <i>Cucurbita moschata</i>	32
Tabla 3. Valores de absorbancia (A405 nm) promedio para cada clase de severidad de enfermedad observada en la población (Soler x Nigerian Local) F ₂ evaluada en el ensayo de herencia de resistencia a <i>Papaya ringspot virus- W</i> en <i>Cucurbita moschata</i>	32
Tabla 4. Valores de absorbancia (A405 nm) promedio para cada clase de severidad de enfermedad observada en la población (Taína Dorada x Nigerian Local) F ₂ evaluada en el ensayo de herencia de resistencia a <i>Papaya ringspot virus- W</i> en <i>Cucurbita moschata</i>	33
Tabla 5. Valores de absorbancia (A405 nm) promedio para cada clase de severidad de enfermedad observada en la población (Verde Luz x Nigerian Local) F ₂ evaluada en el ensayo de herencia de resistencia a <i>Papaya ringspot virus- W</i> en <i>Cucurbita moschata</i>	33
Tabla 6. Número de plantas en cada clase de severidad en poblaciones de <i>Cucurbita moschata</i> inoculadas mecánicamente con <i>Papaya ringspot virus- W</i>	34
Tabla 7. Segregación para resistencia (R) y susceptibilidad (S), y probabilidades (p) de pruebas de chi-cuadrado asumiendo resistencia monogénica recesiva, en poblaciones de <i>Cucurbita moschata</i> inoculadas mecánicamente con <i>Papaya ringspot virus cepa W</i>	37
Tabla 8. Comportamiento bajo condiciones de campo de plantas de <i>Cucurbita moschata</i> que previamente habían mostrado severidad de enfermedad (sev) entre 0 y 1 en las poblaciones evaluadas en el ensayo de herencia de la resistencia a <i>Papaya ringspot virus</i> bajo condiciones de invernadero. Los valores en la tabla son los números de plantas evaluadas (las que lograron sobrevivir al trasplante) en cada clase de severidad.	38
Tabla 9. Reacción de familias F ₃ de <i>Cucurbita moschata</i> derivadas de plantas F ₂ resistentes al ser inoculadas con <i>Papaya ringspot virus- W</i>	40
Tabla 10. Severidad y absorbancia promedio de cada Familia F ₃ de <i>Cucurbita moschata</i> inoculadas con <i>Papaya ringspot virus- W</i>	40

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
Figura 1. Síntomas virales más comunes observados en cultivos de cucurbitáceas en la región sur de Puerto Rico; a) y b) mosaico y deformación en hojas de calabaza, c) deformidad de frutos de zucchini, d) manchas anilladas en fruto de calabaza.....	8
Figura 2. Organización genómica del PRSV (Tripathi et al., 2008).....	10
Figura 3. Síntomas típicos en cada clase de severidad de la enfermedad en plantas de <i>Cucurbita moschata</i> inoculadas con <i>Papaya ringspot virus-W</i> (PRSV-W).....	28
Figura 4. Variabilidad en tipo y severidad de síntomas dentro y entre los parentales inoculados mecánicamente con <i>Papaya ringspot virus-W</i> durante el ensayo de herencia de resistencia en <i>Cucurbita moschata</i> . Tipo de síntomas: VCV= veteado clorótico de venas, Mot = moteado, Def = deformación, CV = clorosis de venas, Pust = pustulas, Mos = mosaico; E. Abs (405) = ELISA absorbancia a 405 nm.....	35
Figura 5. Valores de absorbancia de plantas en 16 familias F ₃ de <i>Cucurbita moschata</i> inoculadas mecánicamente con <i>Papaya ringspot virus-W</i> . Colores representan cada clase de severidad (sev). Familias: 1=(S x NL)F ₃ -E0904A-13, 2=(TD x NL)F ₃ -E0904A-5, 3=(S x NL)F ₃ -E0904A-17, 4=(S x NL)F ₃ -E0904A-16, 5=(S x NL)F ₃ -E0904A-28, 6=(TD x NL)F ₃ -E0904A-26, 7=(S x NL)F ₃ -E0904A-7, 8=(S x NL)F ₃ -E0904A-15, 9=(S x NL)F ₃ -E0904A-10, 10=(S x NL)F ₃ -E0812-11, 11=(S x NL)F ₃ -E0812-12, 12=(S x NL)F ₃ -E0812-1, 13=(S x NL)F ₃ -E0812-10, 14=(S x NL)F ₃ -E0812-7, 15= Soler (parental), 16=Taina Dorada (parental).....	41

1 INTRODUCCIÓN

La calabaza tropical (*Cucurbita moschata* Duchesne) es un cultivo de importancia en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Robinson & Decker-Walters, 1997). En Puerto Rico (PR), es la cucurbitácea de mayor producción, ocupando el segundo lugar en términos de importancia económica entre la producción de hortalizas en la isla (Estado Libre Asociado de Puerto Rico, 2007). Esta forma parte de la dieta puertorriqueña al igual que de muchas culturas alrededor del mundo. Algunas de las opciones de consumo que tiene la calabaza son en postres, bebidas, consumo de su semilla y de la pulpa cocida (National Research Council, 1989; Saade, 1995; Robinson & Decker-Walters, 1997). Actualmente en Estados Unidos (E.U.) su producción se concentra en PR y en las regiones subtropicales de Florida (Wessel-Beaver et al., 2006). En muchas áreas de E.U. donde la población de emigrantes (principalmente latinoamericanos) provenientes de países tropicales y subtropicales es alta, la demanda de calabaza tropical está en acenso. Esto podría ser una gran oportunidad de explotar el mercado de exportación de calabaza tropical a E.U. e introducir el producto en otros países donde la calabaza tropical no se consume.

La Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez (UPRM) ha desarrollado un programa de fitomejoramiento de calabaza tropical dirigido por la Dra. Linda Wessel-Beaver. Este programa tiene como objetivo mejorar ciertas características de importancia agronómica para así aumentar la capacidad de producción de dicho cultivo. Entre las características que se han estado trabajando en años recientes se encuentran: resistencia a algunos insectos, principalmente mosca blanca (Wessel-Beaver, 2000a) y oruga del melón (Linares, 2008), calidad de pulpa, hábito de crecimiento, tamaño de fruto, rendimiento del

cultivo (Carle et al., 2000; Wessel-Beaver et al., 2006) y más reciente aún, resistencia a enfermedades virales.

Las enfermedades virales son uno de los problemas de mayor impacto que enfrenta la producción de cucurbitáceas alrededor del mundo (Provvidenti, 1996; Lecoq et al., 1998). Entre la gran diversidad de virus que afectan los cultivos de cucurbitáceas, *Papaya ringspot virus* cepa de sandía (PRSV-W) es uno que está causando severas enfermedades a muchos cultivos en la mayoría de las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Wang et al., 1987; Yeh et al., 1988; Gonsalves & Garnsey, 1989; Lecoq et al., 1998; Purcifull et al., 1984). Esta enfermedad causa una reducción significativa en el rendimiento y calidad de la mayoría de cucurbitáceas, incluyendo la calabaza tropical. En PR, se ha realizado un número limitado de investigaciones en relación a enfermedades virales en cucurbitáceas. Un estudio de incidencia viral realizado en PR y Florida durante el periodo de un año (febrero 2001-febrero 2002), reveló que PRSV-W junto a *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) son los dos principales virus que afectan las cucurbitáceas (Paz-Carrasco & Wessel-Beaver, 2002). Este estudio también reveló que entre los distintos géneros y especies evaluados (*Citrillus lanatus*, *Cucumis melo*, *C. sativus*, *Cucurbita pepo* y *C. moschata*) dentro de las cucurbitáceas, la calabaza tropical (*C. moschata*) resultó con la más alta incidencia viral.

El control de las enfermedades virales es complicado ya que no existe un control químico (viricidas) que impacte directamente al virus; se lleva a cabo indirectamente mediante el control del agente vector a través de distintas prácticas culturales (aspersión de insecticidas, establecimiento de trampas, uso de feromonas, prácticas sanitarias, etc.) o mediante el uso de plantas resistentes al virus (resistencia genética) (Zitter & Simons, 1980; Hull, 2002; Agrios, 2005). El primero ha resultado poco efectivo particularmente para el PRSV, debido a su amplia

gama de hospederos, y en la forma en que es transmitido, de manera no persistente por áfidos, hacen de este virus uno difícil de controlar. En cambio, la incorporación de resistencia genética mediante técnicas tradicionales de fitomejoramiento ha resultado efectiva y conveniente para el control de muchas enfermedades, incluyendo virus (Webb & Tyson, 1997). La incorporación de resistencia viral en cucurbitáceas a través de ingeniería genética no es todavía una alternativa a considerar en el presente, debido principalmente a aspectos socioeconómicos.

En trabajos previos han identificado resistencia a PRSV-W en *C. moschata* cv. ‘Nigerian Local’ (NL), cultivar criollo de Nigeria (Provvidenti et al., 1978 citado por Provvidenti, 1993). La resistencia en el cultivar NL ha sido descrita como monogénica recesiva en estudios donde el parental susceptible fue el cultivar templado Waltham. El gen fue designado como *prv* (Brown et al., 2003). Hasta la fecha no se ha reportado ningún estudio de herencia de la resistencia a PRSV-W utilizando como parentales susceptibles cultivares tropicales de *C. moschata*.

Debido al impacto negativo que tienen las enfermedades virales sobre el rendimiento en la calabaza y a la importancia que tiene dicho cultivo en distintas regiones del mundo sería beneficioso desarrollar cultivares con resistencia genética utilizando técnicas tradicionales de fitomejoramiento. Hasta el momento no existe ningún cultivar de *C. moschata* para producción comercial que posea resistencia genética al PRSV-W. Para esto es necesario conocer el comportamiento de la herencia genética que brinda la característica de resistencia al virus. El objetivo principal de esta investigación fue confirmar la herencia de la resistencia al PRSV-W en varios cultivares tropicales e identificar dentro de familias F₃ genotipos con alto grado de resistencia para ser utilizado en futuros trabajos de resistencia a PRSV-W.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Los Virus de Plantas

Los virus son partículas compuestas principalmente por nucleoproteínas que tienen la habilidad de causar enfermedades en sus huéspedes (Hull, 2002; Agrios, 2005). Se multiplican solo en células vivas y no son visibles individualmente bajo microscopio óptico. Los virus son capaces de causar enfermedades en todo tipo de organismos vivos, desde microorganismos unicelulares hasta plantas, animales y humanos. Los virus de plantas se han descrito como los patógenos de mayor impacto negativo, después de los hongos, en el desarrollo de cultivos agrícolas alrededor del mundo. Se han descrito aproximadamente setecientos virus que atacan plantas, cuyo ácido nucleico puede ser RNA [ácido ribonucleico (monocatenario o bicatenario)] o DNA [ácido dextrorribonucleico (monocatenario o bicatenario)]. El ácido nucleico en la mayoría de los virus está rodeado de una capa proteínica, generalmente compuesta de un solo tipo de proteína. Los virus pueden arreglarse de varias formas, aunque las estructuras más comunes son en forma de bastón, polihedral, o variantes de estas dos estructuras. Los genomas virales pueden codificar para varias moléculas de proteínas, que pueden tener funciones estructurales (para la capa proteínica) o no estructurales (enzimas, proteínas envueltas en la replicación o proteínas de movimiento) (Gorbalenya et al., 1989; Hull, 2002; Agrios, 2005). Se han logrado describir al menos cinco mecanismos o estrategias de replicación que los virus de plantas han desarrollado para la síntesis de proteínas a partir de un genoma RNA que contenga más de un gen, donde cada grupo adopta una o más de estas estrategias (Matthews, 1991):

- a) RNAs subgenómicos – síntesis de RNAs subgenómicos permitiendo la traducción de la fase de lectura abierta (ORF) situada en su extremo 5' (cucumovirus y closterovirus).
- b) Genomas divididos en varios segmentos – se traduce el gen situado en el extremo 5' de cada RNA (cucumovirus y nepovirus).
- c) Poliproteínas – una sola fase de ORF se traduce para dar una (en el caso de potivirus) o dos (en el caso de comovirus) poliproteínas que mediante la acción de proteasas codificadas por el propio virus pasan a ser proteínas funcionales.
- d) Codones de terminación interior – ORF que contienen codones de terminación interior, que según se lean, dan formaciones a dos proteínas distintas (tobamovirus y tospovirus).
- e) Genes solapados en fase de lecturas distintas que por cambio en la fase de lectura cerca del codón de terminación dan lugar a una segunda proteína más larga (luteovirus).

Las dos principales limitaciones de los virus son: no pueden moverse por sí mismos y tampoco tienen mecanismos para entrar a las células (Hull, 2002; Agrios, 2005). En el caso de virus de plantas, estos tienen que penetrar la cutícula y paredes de celulosa para tener acceso a las células, necesitando la ayuda de algún agente externo, al cual se le conoce como vector. La transmisión viral es un evento específico en el ciclo de vida de cada virus (Ng & Falk, 2006). Diversos organismos (Ej. hongos, nematodos, artrópodos) han sido reconocidos como vectores de varios virus de plantas, pero en la mayoría de los casos, virus de cada taxón tiene un tipo de vector específico. Los vectores de virus de plantas más comunes son los artrópodos (94%), siendo la gran mayoría del orden Hemíptero (Murant et al., 1988 citado por Ng & Falk, 2006). Muchos de estos insectos vectores son reconocidos como plagas de cultivos agrícolas, lo cual los convierte en agentes ideales para propagar los virus eficientemente. Se ha descrito que 55% de los artrópodos que transmiten virus son áfidos y que de las 288 especies que han sido

probadas como vectores potenciales, 277 mostraron capacidad de transmitir al menos un virus de planta. Algunos virus también pueden ser transmitidos a través del polen, semillas, equipo agrícola, y propagación vegetativa (Hull, 2002; Agrios, 2005).

Las plantas reaccionan de distintas maneras cuando se ven bajo la amenaza de una infección viral (Hull, 2002; Agrios, 2005), dependiendo de las características genéticas de ambos, la planta y el virus. Inmunidad o resistencia completa de la planta resulta cuando el virus no logra replicarse, infecciones subliminales resultan cuando los virus se replican solamente en las células inicialmente infectadas. En las reacciones de hipersensibilidad, el virus queda restringido solamente a unas pocas células que rodean el punto de entrada del virus, produciendo pequeñas lesiones localizadas. Por último, en los casos de susceptibilidad, la planta no logra reconocer al virus por lo que no produce ninguna respuesta de resistencia y el virus logra replicarse y moverse exitosamente de forma sistemática a través de toda la planta.

Los virus tienen un impacto económico negativo en la agricultura solo cuando producen reducciones significativas en el rendimiento o en la calidad del producto vegetal (Matthews, 1991; Hull, 2002; Agrios, 2005). Entre los síntomas virales más comunes se encuentran: reducción en el crecimiento, cambios en el color (mosaicos, clorosis, anillos concéntricos) de hojas, tallos y frutos, muerte de tejido (necrosis) y alteraciones (enanismo, crecimiento amorfo, filimorfismo o enrollamiento de hojas) en el crecimiento de los distintos órganos de la planta. La mayoría de los nombres de los virus de plantas incluyen los síntomas característicos que induce en el huésped donde se describió por primera vez la enfermedad.

2.2 Virus en Cucurbitáceas

Los cultivos pertenecientes al grupo de las cucurbitáceas son afectados por un gran número de enfermedades virales (Lecoq et al., 1998). Se han reportado más de 35 virus que infectan de forma natural a cultivos de cucurbitáceas (Provvidenti, 1986; Provvidenti, 1996). La diversidad de virus afectando dichos cultivos resulta principalmente por la diversidad genética y ecológica que existe dentro de la familia Cucurbitaceae (Lecoq et al., 1998). Los cultivos de cucurbitáceas se producen alrededor del mundo donde los agro-sistemas varían significativamente. Esta diversidad de ambientes puede proveer condiciones más o menos favorables para ciertos virus en específico o para sus respectivos vectores.

Varios estudios de incidencia viral realizados en PR han reportado que los principales virus afectando los cultivos de cucurbitáceas son: en mayor incidencia, *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus-2* (WMV-2) y *Papaya ringspot virus* cepa w (PRSV-W); y en menor incidencia, *Squash mosaic virus* (SqMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) y geminivirus (Pérez, 1963; Escudero, 1992; Paz-Carrasco & Wessel-Beaver, 2002).

Los síntomas típicos que causan los virus en cucurbitáceas generalmente los dividen en tres grandes grupos (Blancard et al., 1991): a) Mosaicos en hojas que generalmente están asociados con diferentes tipos de deformación (reducción del tamaño de hoja, rugosidad, crecimiento amorfo de la hoja, enanismo). Los frutos también pueden desarrollar un rango de decoloración y deformación incapacitando su mercadeo; b) Clorosis y adelgazamiento en hojas, donde generalmente la producción de frutos se ve afectada pero la calidad no; c) Necrosis, en forma de manchas de distintos tamaños alrededor de la hoja o como una necrosis general que eventualmente causa la muerte de la planta. Debido a que en el campo las plantas muchas veces

son afectadas por más de un virus a la vez, se puede observar combinaciones de estos tres tipos de síntomas. En la figura 1 se pueden apreciar varios de los síntomas virales más comunes en algunos cultivos de cucurbitáceas en la región sur de PR.



Figura 1. Síntomas virales más comunes observados en cultivos de cucurbitáceas en la región sur de Puerto Rico; a) y b) mosaico y deformación en hojas de calabaza, c) deformidad de frutos de zucchini, d) manchas anilladas en fruto de calabaza.

2.3 *Papaya Ringspot Virus (PRSV)*

2.3.1 *Características Biológicas*

El *Papaya ringspot virus* (PRSV), perteneciente al genero *Potivirus*, ha sido reconocido por muchos años como el causante de una de las enfermedades más destructivas y limitantes en los cultivos de cucurbitáceas (Wang et al., 1987; Yeh et al., 1988; Gonsalves & Garnsey, 1989) y papaya (*Carica papaya*) alrededor del mundo (Purcifull et al., 1984). Este fue descrito por primera vez en el año 1949 como el causante de una enfermedad en árboles de papaya en los que

causaba principalmente manchas anilladas (“ringspots”) en las hojas y frutos afectando significativamente el rendimiento del cultivo (Jensen, 1949). El PRSV ha sido dividido en dos grupos: el tipo-P que infecta papaya y el tipo-W (antes conocido como *Watermelon mosaic virus* cepa 1, WMV-1) que no infecta papaya (Purcifull et al., 1984). El tipo W fue descrito por primera vez en cultivos de cucurbitáceas por Webb & Scott (1965). Aislados del tipo-P (PRSV-P) son capaces de infectar plantas pertenecientes a las familias Caricaceae, Cucurbitaceae y Chenopodiaceae, mientras que aislados del tipo-W (PRSV-W) infectan solo plantas de las familias Cucurbitaceae y Chenopodiaceae (Tripathi et al., 2008). Ambos tipos son serológicamente indistinguibles y al igual que todos los miembros del grupo de potivirus, son transmitidos de manera no persistente por un sin número de especies de áfidos, principalmente por *Myzus persicae* (Sultz) y *Aphis gossypii* (Glover) (Purcifull et al., 1984). Ambos vectores han sido reportados en Puerto Rico (Smith et al., 1971).

La presencia de PRSV se ha reportado mayormente en áreas tropicales y subtropicales donde plantas de papaya o cucurbitáceas, tanto silvestres o/y en producción y su vector, áfidos, están presentes todo el año (Lecoq et al. 1998). 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).

2.3.2 *Partícula Viral y Propiedades Genómicas*

Las partículas de PRSV son filamentosas, sin envoltura y flexibles, con un tamaño aproximado de 760-800 x 12 nm. Su composición es de 94.5 % proteína y 5.5 % ácido nucleico.

El componente proteínico consiste de la proteína del cápsido (envoltura que cubre el ácido nucleico) la cual tiene un peso molecular aproximado de 36 kDa (peso estimado mediante el análisis “Western blot”) (Purcifull & Hiebert 1979). Su genoma consiste de una hebra sencilla en sentido positivo de RNA, unipartita y linear (Yeh & Gonsalves, 1985). Las dos cepas que han sido completamente secuenciadas, una de Hawai (Yeh et al. 1992) y otra de Taiwán (Wang & Yeh, 1997), constan de aproximadamente 10,326 nucleótidos con una proteína enlazada en el terminal 5’, VPg. Este virus se caracteriza por inducir inclusiones cilíndricas (CI) y amorfas (AI) en el citoplasma de la célula hospedera (Purcifull et al., 1984). La figura 2 muestra la composición y organización genómica de este virus.

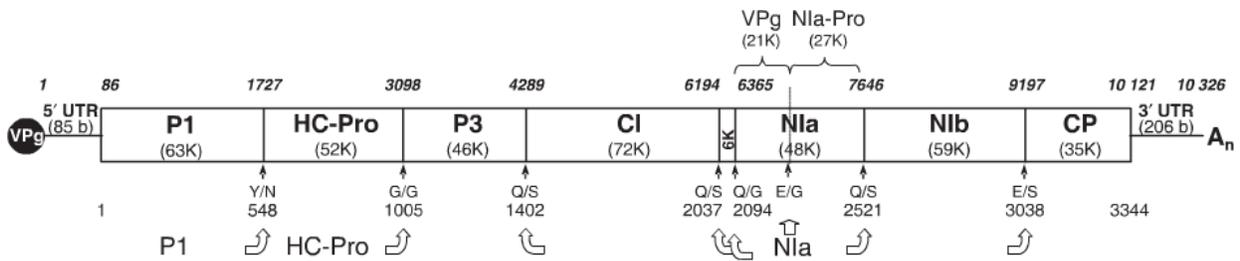


Figura 2. Organización genómica del PRSV (Tripathi et al., 2008).

2.3.3. Transmisión: Relación Virus- Vector

La transmisión viral se clasifica de acuerdo a la eficiencia de transmisión; o sea, cuan efectiva es la trasmisión a medida que pasa el tiempo desde que el patógeno (en este caso el virus) fue adquirido por el vector (Swenson, 1968; Watson & Plumb, 1972). La eficiencia de transmisión puede aumentar o disminuir a medida que pasa el tiempo desde que el vector adquirió el virus por primera vez. La trasmisión viral se ha dividido en tres grandes grupo: no persistente, donde el tiempo de trasmisión viable es corto, usualmente menos de 30 minutos

luego de la adquisición que usualmente dura < 5 minutos; semipersistente, donde la viabilidad de transmisión dura varios días después de la adquisición que usualmente es de varias horas a pocos días; y persistente, donde se ha descrito que la viabilidad de transmisión puede durar bastantes días hasta semanas y meses.

El PRSV, al igual que la mayoría de los miembros del grupo al que pertenece, potivirus, es transmitido por áfidos de manera no persistente y requiere de al menos una proteína no estructural codificada por el virus para que la transmisión tenga éxito (Lecoq, et al., 1985). Esta participación de un componente viral no relacionado a proteínas estructurales fue determinada en trabajos con el potivirus Y de la papa (*Potato virus Y*, PVY), donde se comprobó que era necesario algún componente auxiliar no estructural (“helper component”, HC-Pro) de este virus para que subsiguientemente otros virus relacionados y no transmisibles por áfidos pasaran a ser transmisibles por áfidos (Kassanis & Govier, 1971). El mecanismo de como el virus se separa de la proteína HC durante la transmisión todavía no es claramente entendido (Pirone & Blanc, 1996). La naturaleza de transmisión no persistente del PVY encaja muy bien con el comportamiento de vuelo de su áfido vector, promoviendo el éxito de dispersión del virus en los cultivos. Los áfidos alados mientras vuelan, no pueden distinguir e identificar hospederos de preferencia; no es hasta cuando aterrizan en el tejido de la plantas que estos utilizan su estilete para iniciar una serie de pruebas de tejido, las cuales son de corto periodo (< 1 min.) y superficiales (Watson & Plumb, 1972). Esta prueba de tejido solo se limita a las células epidermales y determina si la planta va a ser su hospedero o no (Ng & Falk, 2006). Muchas veces durante estas cortas pruebas de tejidos, el áfido rompe levemente la membrana plasmática, proveyendo acceso al contenido de la célula mediante su estilete, y si es una célula infectada por virus, también quedarán accesibles los viriones (partículas virales). Los viriones adquiridos por

el estilete, subsiguientemente pueden ser inoculados/transmitidos en plantas sanas durante las pruebas de tejido que realiza el áfido, sin tener que pasar por un periodo de latencia dentro del vector. Debido a que en este tipo de transmisión los áfidos pierden rápidamente la capacidad de infectar, ellos no dispersan la enfermedad viral a través de largas distancias, pero si rápidamente el virus es transmitido de planta a planta dentro del mismo predio de cultivo. Esto hace que el control químico del áfido para evitar la dispersión de la enfermedad viral sea inefectivo, por lo que la implementación de un buen programa de sanidad y control cultural es clave en el manejo de enfermedades virales transmitidas de manera no persistente.

2.4 Calabaza Tropical (*Cucurbita moschata* Duch.)

2.4.1 Características Biológicas

La calabaza tropical (*Cucurbita moschata* Duchesne) pertenece a la familia Cucurbitaceae (Nee, 1990) y es altamente cultivada en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Robinson & Decker-Walters, 1997). Es una planta dicotiledónea anual, con hábito de crecimiento trepador y monoica (posee flores masculinas y femeninas en la misma planta). Se caracteriza por producir flores grandes de color amarillo-naranja que son polinizadas temprano en la mañana por polen acarreado por insectos, principalmente abejas. Esta produce frutos con una alta variabilidad morfológica; se han descrito frutos globosos, achatados, en forma de pera y hasta alongados (Nee, 1990). La superficie de estos puede ser lisa o verrugosa y algunas pueden presentar lóbulos. En color, los frutos exhiben una amplia gama de tonalidades del verde y amarillo con color uniforme o líneas o puntos de color generalmente crema-blanco.

2.4.2. *Origen, Domesticación y Distribución Mundial*

La mayoría de los estudios sugieren que el centro de domesticación de la calabaza tropical fue en el área norte de América del Sur, ya que es donde se han observado las características más primitivas y la máxima diversidad de tipos (Nee, 1990; Wessel-Beaver, 2000b; Sanjur et al., 2002). Por otra parte, los más antiguos restos arqueológicos indicativos de alguna domesticación de esta especie fueron descubiertos en el sur de México (aprox. 7000 años antes del presente, AP) y en las áreas costeras de Perú (aprox. 5000 años AP) (Decker-Walters & Walters, 2000). Desde entonces, este cultivo se diseminó rápidamente hacia el noreste de México (~3400 AP) y suroeste de Estados Unidos (~900 AP). Se cree que en Europa se comenzó a cultivar a finales del siglo 17, un siglo más tarde luego que los exploradores españoles regresaran de su viaje a las Américas (Paris, 2000). Se cree que este retraso fue a causa de la pobre adaptación de esta especie (*C. moschata*) a los climas templados de regiones ubicadas en las latitudes altas y medianas de Europa. En África esta especie se estableció como un cultivo para alimento en el siglo 19 (Decker-Walters & Walters, 2000). Desde entonces, se ha reportado una gran diversificación morfológica y genética de esta especie alrededor del mundo, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, aunque actualmente todavía quedan razas silvestres sin haber sido descritas (Paris, 2000).

2.4.3. *Mantenimiento de Germoplasma*

La calabaza tropical es uno de los cultivos de mayor importancia dentro de la producción de vegetales en áreas tropicales y subtropicales (Robinson & Decker-Walters, 1997; Ferriol et al., 2004). La gran mayoría de la producción a nivel mundial está basada en variedades criollas que han sido mantenidas por los agricultores a través de los años. Varias instituciones alrededor

del mundo se han dado a la tarea de desarrollar colecciones o bancos de germoplasma de distintas especies de cucurbitáceas, incluyendo *C. moschata*. La mayoría de ellos están localizados en varias regiones de América, donde se hallan depositadas más de 2,000 accesiones (Saade & Montes, n.d.). Estas proceden principalmente de México y América Central, y en menor grado de América del Sur y otras regiones del mundo. Las colecciones con mayor importancia son las de Estados Unidos y Costa Rica, aunque la colección del CIFAP en México es posiblemente la más representativa de la variabilidad de la especie en ese país. En la región de Europa, el centro de conservación y mejoramiento de la diversidad agrícola (“Center for Conservation and Breeding of Agricultural Diversity – COMAV”) de la Universidad Politécnica en Valencia, España, también mantiene una colección de alrededor de 250 variedades criollas de *C. moschata* (Ferriol et al., 2004). La mayoría de sus accesiones son provenientes de provincias españolas, principalmente de las Islas Canarias, aunque también poseen algunas provenientes de América Central, América del Sur y África (Decker-Walters and Walters, 2000; Ferriol et al., 2004).

2.4.4. Usos y Valor Nutricional

Actualmente *C. moschata* es una especie altamente consumida de distintas formas en regiones del Caribe y América Latina. Su consumo es bien variado; algunas de las partes más apreciadas para consumo son: fruto maduro o inmaduro, semilla, flores masculinas y plántulas (National Research Council, 1989; Robinson & Decker-Walters, 1997). Su fruto posee alto contenido nutricional, principalmente como fuente de carbohidratos y vitaminas [vit. A (β -caroteno), vit. B₆ y vit. C] (Anónimo, 2008). Uno de los principales platos puertorriqueños es el arroz con habichuelas, donde generalmente la calabaza es añadida a la salsa de las habichuelas

para brindar más sabor, color y consistencia. También se ha descrito que tanto el aceite como el extracto de las semillas de calabaza tienen altas propiedades nutricionales y medicinales, especialmente para enfermedades relacionadas con la próstata, lo que ha provocado un aumento considerable en su demanda (Blumenthal et al., 1998; Kreuter, 2000; Schmidlin & Kreuter, 2003).

2.5 Diagnóstico de Enfermedades Virales

Tradicionalmente el diagnóstico de enfermedades virales se ha llevado a cabo mediante la caracterización de síntomas en determinadas plantas huésped utilizando técnicas o métodos como lo son: la inoculación mecánica, injertos, microscopía óptica o utilizando vectores del virus (Hamilton et al., 1981; Matthews, 1991). Aunque no son métodos muy precisos, hoy día se siguen utilizando para realizar diagnósticos preliminares y generar buena información que nos ayude a conocer el patógeno antes de realizar pruebas más específicas y costosas. Es importante tener en cuenta que muchos síntomas virales son similares a síntomas producidos por otras enfermedades bióticas y abióticas que afectan las plantas. Para realizar un diagnóstico más certero es necesario realizar pruebas de detección específica para virus. Actualmente, la detección viral comúnmente se lleva a cabo mediante dos métodos: detección de proteínas virales (técnicas serológicas) y detección de ácidos nucleicos (análisis de RNAs bicatenarios, hibridación con sondas de cDNA o cRNA y la técnica de reacción en cadena de polimerasa, PCR). Las dos técnicas que se utilizaron en la presente investigación fueron: detección de la proteína mediante el ensayo serológico conocido por sus siglas en inglés como ELISA-DAS (“enzyme-linked immunosorbent assay-double antibody sandwich”) y detección de ácidos nucleicos mediante RT-PCR (transcripción en reversa seguida por PCR).

2.5.1 Técnicas Serológicas

Las primeras pruebas serológicas se basaron en la observación del precipitado formado cuando los anticuerpos (desarrollados en animales, principalmente caballos, conejos y ratas, a los que se le inyectaba el virus purificado) se unían en condiciones favorables (medios líquidos o geles de agar) a los antígenos virales formando agregados que se precipitaban. El método más utilizado en la actualidad es el ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”), el cual es un método específico, sensible, confiable, rápido, fácil de realizar y aplicable a un gran número de muestras (Clark & Bar-Joseph, 1984; Torrance & Jones, 1981). Se han desarrollado varios tipos de ELISA, pero los tres más utilizados son: ELISA-DAS (“double antibody sándwich”) (Clark & Adams, 1977), ELISA indirecto (Rybicki & von Wechmar, 1981; Koenig, 1981) y ELISA indirecto TAS (“triple antibody sandwich”) (Barbara & Clark, 1982).

El ELISA-DAS es una prueba bastante sensible y es necesario el uso de un conjugado enzimático para cada virus a probar. En cambio, el ELISA indirecto no utiliza conjugados específicos para el virus, sino anticuerpos obtenidos contra las inmunoglobulinas del animal (generalmente mamíferos; caballos, conejos, ratas) utilizado para la obtención de los anticuerpos específicos del virus a probar. Por otro lado, el ELISA-TAS requiere dos anticuerpos antivirales obtenidos de dos animales diferentes, complicando un poco más el proceso de obtención de anticuerpos, en comparación con las pruebas anteriores, y también requiere de un paso adicional durante la realización de la prueba.

A la hora de interpretar los resultados es de gran importancia determinar qué se va a considerar como respuesta positiva y cual como negativa (Tijssen, 1985). Generalmente, se considera un resultado positivo cuando se obtiene una absorbancia dos o tres veces mayor que la media de las absorbancias obtenidas con controles negativos [generalmente obtenidos por el

suministrador de materiales (anticuerpos y conjugados) para realizar la prueba]. Otras veces, se considera positivo cuando se obtiene la media más dos o tres veces la desviación estándar, esto si hay disponibles un número de referencia elevado; o también se utilizan valores arbitrarios de un valor de absorbancia determinado. La determinación de este criterio correctamente es de vital importancia para minimizar respuestas falsas o erróneas.

2.5.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR) y transcripción en reversa (RT)

La reacción en cadena de polimerasa (PCR), actualmente una herramienta clave en la biología molecular, provee un método rápido y eficaz de síntesis de ácidos nucleicos *in vitro*, mediante el cual se puede replicar un segmento determinado de DNA (Erlich, 1989; Innis et al., 1990; McPherson et al., 1991). En general, para que ocurra la reacción se utiliza una DNA polimerasa termoestable la cual sintetiza DNA a partir de un DNA base, dos oligonucleotidos cebadores, que flanquean el fragmento a replicar, y ciclos de desnaturalización térmica del DNA anillado de los cebadores (dNTPs) y extensión de los cebadores anillados mediante la misma enzima DNA polimerasa. El DNA base debe ser genómico, primera hebra de cDNA o secuencias clonadas. Los cebadores son diseñados para anillarse (unirse) a hebras complementarias del DNA base, de tal manera que la región a replicarse será la que quede entre ambos cebadores. Esta replicación ocurre de forma exponencial, ya que cada producto de extensión es complementario a los cebadores, lo que causa una duplicación de la cantidad de DNA sintetizada en el ciclo anterior.

En el 1985 se reportó el primer gen amplificado utilizando la técnica de PCR, el segmento que codifica para β -globina humana (Saiki et al., 1985). Desde entonces esta técnica se ha ido mejorando y a la vez expandiendo sus aplicaciones a otras áreas de estudio fuera del

genoma humano. Esta tecnología ha sido aplicada con mucho éxito en el estudio de virus de plantas (Rybicki & Hughes, 1990; Pasamontes et al., 1991; Soler et al., 1991). Dado que el genoma de la mayoría de los virus de plantas, incluyendo el PRSV-W, y de algunos animales y humanos (Ej. hepatitis A) está compuesto por ácido ribonucleico (RNA) (Matthews, 1991), y que la técnica de PCR trabaja estrictamente con DNA, fue necesario desarrollar otra técnica que convirtiera el RNA viral en DNA. Esta técnica, llamada RT-PCR (transcripción en reversa seguida por la reacción en cadena de polimerasa) consiste en transformar el RNA viral en cDNA mediante la enzima transcriptasa en reversa (Sambrook et al., 1989) y cebadores aleatorios previamente diseñados.

2.6 Manejo y Control de Enfermedades Virales

2.6.1 Prácticas Culturales

El control de las enfermedades virales es complejo ya que no existe un control directo; se lleva a cabo indirectamente mediante el control del agente vector, la identificación y eliminación de posibles reservorios naturales y mediante el uso de plantas genéticamente resistentes al virus (Matthews, 1991; Hull, 2002; Agrios, 2005). Para que el manejo sea efectivo, es de gran importancia combinar simultáneamente diferentes prácticas culturales. Comúnmente los mayores esfuerzos van dirigidos al control del agente vector, generalmente insectos, mediante el uso de productos químicos. Estos juegan un rol importante en el manejo de las poblaciones de vectores reduciendo el número de individuos que pueden adquirir y transmitir el virus, y promoviendo una baja incidencia de la enfermedad. El impacto de los insecticidas va a depender de las características de transmisión del vector del virus.

La implementación de buenas practicas sanitarias es hasta ahora, el método más costo-efectivo para prevenir la adquisición viral por parte de su vector. Algunas de estas prácticas culturales y sanitarias que ayudan a minimizar la incidencia viral son (Zitter & Simons, 1980; Matthews, 1991):

- a) remoción de plantas enfermas
- b) identificar y eliminar posibles plantas reservorios
- c) utilización de material propagativo certificado libre de enfermedades
- d) aislamiento geográfico del cultivo de otros cultivos relacionados
- e) evitar siembras en periodos de altos niveles de actividad del vector
- f) utilizar equipo limpio y estéril
- g) rotación de cultivos
- h) establecer programas de cuarentenas
- i) exponer plantas a tratamientos de altas temperaturas (efectivo solo para ciertos virus)

2.6.2 *Resistencia Genética*

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). Aunque este método es comúnmente utilizado, todavía no se conoce con certeza la base molecular de la resistencia. Se han descrito varios métodos que han tenido éxito en la incorporación de genes de resistencia en ciertos cultivos específicos. El más tradicional es mediante 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 que estén altamente relacionadas. El éxito de

esta técnica va depender de la complejidad de la herencia que confiere la resistencia. La resistencia monogénica (controlada por un solo gen) va a ser más fácil de incorporar que una resistencia controlada poligénicamente (por más de un gen).

Otra de las técnicas, aunque menos común, es la protección por RNAs satélites donde la ausencia o reducción de síntomas virales (“resistencia”) se asocia con la presencia de un pequeño RNA extragenómico (RNA satélite) en el inóculo viral; esto se ha reportado en el virus *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Baulcombe, 1989; Mossop & Francki, 1979).

La protección cruzada es otro método exitoso en la incorporación de resistencia genética en ciertos cultivos. La técnica se basa en el fenómeno donde plantas que han sido infectadas sistemáticamente por un virus atenuado previene la expresión de un segundo virus donde su hebra de ácido nucleico está altamente relacionada a la del primer virus (Mckinney 1929; Dodds, 1982). Este método ha sido utilizado exitosamente para el control de un sin número de enfermedades virales, entre las que se encuentran: *Citrus triteza virus* en uvas (Lin et al., 2002), *Cucumber mosaic virus* en los cultivos de tomate (Kobori et al., 2005), pimiento y melón (Montasser, 1998), *Potato virus A* en tabaco (Valkonen et al., 2002), *Beet necrotic yellow vein virus* en remolacha (Mahmood & Rush, 1999), y *Zucchini yellow mosaic virus* y *Papaya ringspot virus* en pepinillo (Kosaka & Fukunishi, 1997). Una desventaja de la utilización de esta técnica en el campo es que usualmente las plantas son infectadas por más de un virus a la vez, o sea, una co-infección. Plantas que presentan co-infección viral exhiben síntomas muchos más severos en la mayoría de los casos (Kosaka & Fukunishi, 1997). Por esta razón, la técnica de protección cruzada utilizando solo un virus atenuado no sería efectiva para prevenir daños por otros virus prevalecientes del cultivo. Inoculación múltiple protectora de plántulas con dos o más

virus atenuados (inoculación múltiple) para el control de co-infección viral podría ser un método de protección mucho más efectivo a nivel de campo.

En el caso de PRSV-P en el cultivo de papaya, dos variantes (cepas) atenuadas fueron obtenidas por medio de mutagénesis utilizando tratamientos con ácido nitroso (Yeh & Gonsalves, 1984). Estas cepas atenuadas probaron ser bastante efectivas tanto en ensayos de laboratorio como en ensayos de campo en Hawái. Solo un porcentaje bajo de plantas desarrollaron síntomas severos a los dos años y medio después de la siembra (Gonsalves, 1998). Sin embargo, el mismo experimento se realizó en Tailandia en donde no se observó ningún tipo de protección cruzada utilizando las mismas cepas atenuadas derivadas de las cepas de Hawái (Yeh et al., 1988).

El desarrollo de plantas transgénicas mediante ingeniería genética, ha tenido éxito solo en ciertos cultivos con algunos virus en específico. El concepto de “resistencia derivada del patógeno” (Sanford & Johnston, 1985) propone la transformación genética de plantas utilizando genes del patógeno que podrían generar resistencia a la infección del mismo patógeno al que corresponden los genes. Mediante este concepto, Powell-Abel et al. (1986) demostraron que plantas transgénicas de tabaco que expresaban el gen que codifica para la capa proteínica (CP) del virus *Tobacco mosaic virus* (TMV) mostraron resistencia a infecciones por TMV. Utilizando este método, se logró incorporar resistencia viral en el cultivo de calabacín (*C. pepo*) (Quemada & Groff, 1995), el cual pasó a ser el primer cultivo transgénico aprobado para uso comestible en los Estados Unidos (Agbios, 2005). Desde entonces la incorporación del gen CP mediante ingeniería genética ha sido probada con éxito en varios cultivos, entre ellos se encuentra el tabaco, tomate y la papa (Beachy 1990; Lomonossoff, 1995; Goldbach et al. 2003). De todos los

métodos de incorporación de resistencia genética, este ha sido el mas efectivo en prevenir infecciones virales.

Durante la década de los 90, se dedicaron esfuerzos exitosos para el desarrollo de resistencia genética, mediante ingeniería genética, al PRSV-P en el cultivo de papaya, de tal manera que en 1998 se liberaron dos cultivares ('SunUp' y 'Rainbow') transgénicos para uso comercial (Gonsalves, 2002). Este ha sido el primer caso mundial de un árbol frutal transgénico usado comercialmente. En el grupo de las cucurbitáceas, el cultivo de melón (*Cucumis melo* L. var. *Cantalupensis* cv. Sun Lady) ha sido hasta el momento, el único en el que se ha incorporado resistencia a PRSV-W mediante ingeniería genética (Krubphachaya et al., 2007).

2.6.2.1 Resistencia genética en cucurbitáceas

Trabajos previos han reportado que varios géneros dentro de cucurbitáceas han demostrado tener algún tipo de resistencia genética o tolerancia al PRSV-W, entre ellos: pepinillo (*Cucumis sativus*) (Wang et al., 1984; Wai and Grumet, 1995), sandía (*Citrullus lanatus*) (Strange et al., 2002) y algunas especies de *Cucurbita spp.* (Provvidenti, 1993; Maluf et al., 1986; Maluf et al., 1997).

Dentro de la especie *C. moschata*, los cultivares 'Nigerian Local' y 'Duda' han sido utilizados como fuente de resistencia al PRSV (Provvidenti et al., 1978 citado por Provvidenti, 1993; De Oliveira et al., 2003). Aunque se ha tratado de describir la herencia de la resistencia en estos dos cultivares, ésta no está totalmente entendida. Una posible explicación a estas dificultades, puede deberse a que en la mayoría de los pocos trabajos realizados, se han requerido hibridaciones inter-específicas, complicando así los aspectos genéticos de los cruces. En un estudio previo donde se realizaron cruces ínter-específicos entre *C. pepo* cv. Asmara x *C.*

moschata cv. Duda, se reportó que las poblaciones F₂ mostraron una respuesta intermedia en dirección hacia la susceptibilidad al compararlos con los parentales (De Oliveira et al., 2003). En otro estudio realizado por Brown et al. (2003) se comprobó lo que trabajos previos habían propuesto (Provvidenti et al., 1978 citado por Provvidenti, 1993): una resistencia monogénica recesiva portada por el cultivar NL y se propuso la designación del gen como *prv*. Este trabajo utilizó como parental susceptible el cultivar templado Waltham. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la herencia de la resistencia a PRSV-W, caracterizar la enfermedad y realizar pruebas de progenie en invernadero y en el campo utilizando cultivares tropicales locales como parentales susceptibles y NL como parental donante de la resistencia a PRSV-W.

3 MATERIALES Y METODOS

Para llevar a cabo esta investigación se utilizaron las facilidades de laboratorios, invernaderos y equipos del Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico en Mayagüez (UPRM). Las facilidades de campo (terrenos agrícolas) fueron las provistas por la Finca Laboratorio Alzamora en UPRM.

3.1 Mantenimiento del Inoculo e Inoculación Mecánica

El aislado de PRSV-W que se utilizó en todos los experimentos de esta investigación fue provisto por el Dr. Jose Carlos Rodrigues, quien lo obtuvo mediante muestreos realizados en distintos lugares de la Isla donde hubiera alta producción de cucurbitáceas (principalmente en el área Sur de PR). Durante los muestreos se recolectaron hojas que presentaran síntomas típicos del PRSV descritos en trabajos previos (Lecoq et al., 1998; Pucifull et al., 1984). Luego, por

medio de ensayos serológicos (pruebas ELISA-Agdia, Elkhart, Indiana) y moleculares (transcripción en reversa-reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR)), se aislaron y caracterizaron varias cepas de PRSV-W.

El aislado viral se mantuvo en *C. moschata* cv. Waltham, cultivar de clima templado que ha mostrado susceptibilidad al PRSV-W y fue utilizado en el estudio de herencia de resistencia a varios virus, incluyendo PRSV-W, realizado por Brown et al. (2003). Para realizar la transmisión viral, plántulas de Waltham se inocularon mecánicamente en etapa de cotiledón siguiendo el protocolo utilizado previamente (Mahgoub et al., 1997; Guner et al., 2002; Langham, 2003). Esta técnica consistió en machacar tejido infectado con el PRSV-W en 0.1 M buffer fosfatado, pH 7.0, mantenido a 4°C, a una razón de 1g de tejido por 10 ml de buffer. Para realizar la maceración se utilizó un mortero y pilón que se mantuvo entre -10 a -20 °C hasta el momento de usarlo. El abrasivo carborundum (800 mech) fue añadido al macerado y roseado sobre las hojas en pequeñas cantidades. Este abrasivo, el cual es un polvo bien fino, es capaz de generar micro heridas que facilitan la entrada del virus al interior de la célula vegetal. Posteriormente, utilizando una gasa pequeña se frotó el macerado sobre los cotiledones y/o las hojas con el abrasivo. Las plantas inoculadas se mantuvieron bajo condiciones controladas de invernadero en iluminación natural y/o en el laboratorio con iluminación artificial.

3.2 Ensayo Serológico – ELISA-DAS

Se confirmó la presencia de PRSV-W en los materiales experimentales utilizando anticuerpos y conjugados para PRSV (detectan ambas cepas, W y P) desarrollados por Agdia® (Elkhart, Indiana), siguiéndose estrictamente las diluciones sugeridas. Las soluciones amortiguadoras para la extracción, y preparación de anticuerpos y conjugados también fueron

provista por Agdia[®] (Elkhart, Indiana). Las muestras de hojas se colocaron en bolsas plásticas pequeñas, donde se maceraban utilizando 1 ml de la solución amortiguadora de extracción y un rolo con bolines para macerar el tejido aun mas. Luego de la misma bolsita se extraía 100 µl del macerado y se colocaban en huecos de una placa de poliestireno. Se realizaban una serie de incubaciones (1 de 4 horas con el anticuerpo, 2 de 2 horas cada uno con la savia y con el conjugado respectivamente y 1 de 1 hora con la solución del sustrato PNP, (*p*-nitrophenol') y lavados entre cada incubación con cada placa. Se realizaron lecturas espectrofotométricas (DYNATECH, MR5000, Dynex Technologies, Chantilly, VA) para cada prueba realizada a una absorbancia de 405 nanómetros (A405 nm).

3.3 Ensayo de Herencia

Los cultivares evaluados en el ensayo de herencia fueron: Nigerian Local (NL), como parental resistente; Waltham, Soler, Taína Dorada (TD) y Verde Luz (VL), como parentales susceptibles. A partir del cruce entre NL con cada uno de los parentales susceptibles se generaron las poblaciones F₁, F₂ y retrocruces (BC). La semilla de NL originalmente fue provista por el Dr. R.R. Provvidenti, Cornell University. Actualmente se mantiene por autopolinización y/o polinización entre hermanos completos ("full sib-mating"). El cultivar Waltham, desarrollado en EU, es de clima templado, genéticamente homogéneo y ha mostrado alta susceptibilidad a PRSV-W. Este cultivar fue el que se utilizó para mantener el inoculo viral durante el periodo completo de la investigación. Los cultivares Soler (Wessel-Beaver, 2005), TD y VL son cultivares tropicales de polinización abierta que han mostrado susceptibilidad al PRSV-W y que han sido desarrollados por el programa de fitomejoramiento de UPRM. Para el propósito de este

estudio se asumió que estos cultivares poseen homocigocidad en los loci controlando resistencia a PRSV-W.

3.3.1 Experimento Preliminar

En este experimento preliminar se incluyeron los genotipos parentales y las poblaciones F_1 . Se sembraron de 5 a 7 semillas de cada línea parental con sus respectivas poblaciones F_1 . Las semillas fueron sembradas en tiestos de 8 x 8 x 9 cm utilizando el substrato Premier Pro-Mix, BX[®] (Premier Hort. Inc., Quakertown, PA). Cada una de las plantas se inoculó mecánicamente en sus cotiledones, en el momento fisiológico que la primera hoja verdadera comenzaba a abrirse. Como controles, también se incluyeron plantas inoculadas solo con solución buffer. Los tiestos se acomodaron en el invernadero en un arreglo completamente aleatorio. Cada tres días, las plantas se evaluaron para tipo y severidad de síntomas por dos a tres semanas (hasta que la sexta o séptima hoja estuviera completamente expandida). Durante la realización del experimento se logró: practicar y perfeccionar la técnica de inoculación mecánica de PRSV-W y categorizar los tipos de reacción de los parentales y poblaciones F_1 infectadas con PRSV-W. Se estableció también la descripción de síntomas causados por la enfermedad con su respectiva escala empírica de severidad (tabla 1) y se desarrolló una guía de clasificación de síntomas por medio de fotos digitales (figura 3). Esta información fue fundamental en la evaluación del experimento siguiente, donde se evaluó la herencia de resistencia a PRSV-W utilizando todas las poblaciones (parentales, F_1 , F_2 y retrocruces).

Tabla 1. Síntomas y escala de severidad de la enfermedad causada por PRSV en cultivares tropicales (Soler, Taína Dorada y Verde Luz) de *Cucurbita moschata*.

Descripción de síntomas	Clase de severidad
Ausencia de síntomas en cada una de las hojas de la planta durante el periodo de evaluación.	0
Pequeños veteados cloróticos en venas y/o pequeñas manchas cloróticas. Se observaban en menos del 10 % del área foliar de las hojas e iban disminuyendo en hojas jóvenes.	1
Veteados cloróticos en venas (algunos se extendían por toda la vena y/o causaban leves distorsiones en la hoja) y/o manchas cloróticas intervenales formando moteados. Se observaban entre 10 a 25% del área foliar de las hojas y se mantenían constantes o aumentaban su severidad en hojas jóvenes, pero nunca llegaban a alcanzar la severidad de la próxima categoría (3).	2
Mosaicos severos, veteados cloróticos en venas, ampollas, distorsiones y reducción del área foliar. Se observaban en más del 25 % del área foliar de las hojas y se mantenían constantes o aumentaban su severidad en hojas jóvenes.	3

Hojas de plantas (<i>Cucurbita moschata</i>) inoculadas con PRSV-W	Clase de severidad
	0
	1
	2
	3

Figura 3. Síntomas típicos en cada clase de severidad de la enfermedad en plantas de *Cucurbita moschata* inoculadas con *Papaya ringspot virus-W* (PRSV-W).

3.3.2 *Experimento Principal*

El experimento principal consistió en evaluar la herencia de la resistencia a PRSV-W en las poblaciones parentales, la F_1 , F_2 y los retrocruces. Esta evaluación se dividió en cuatro corridas (bloques) debido a limitaciones de espacio en el invernadero. En cada corrida se sembraron de 5 a 7 semillas de cada línea parental con sus respectivas poblaciones F_1 y retrocruces. Para cada población F_2 se sembraron 36 semillas por bloque. Las semillas, al igual que el experimento preliminar, fueron sembradas en tiestos de 8 x 8 x 9 cm utilizando el substrato Premier Pro-Mix, BX[®] (Premier Hort. Inc., Quakertown, PA). Cada una de las plantas fueron inoculadas mecánicamente dos veces: en sus cotiledones, justo cuando la primera hoja verdadera comenzaba a brotar, y en la primera hoja verdadera, tres días después de la primera inoculación. Para ambas inoculaciones se utilizó la técnica descrita en el experimento preliminar. También se incluyeron plantas inoculadas solo con solución buffer como controles. Para cada corrida los tiestos se acomodaron en el invernadero en un arreglo completamente aleatorio. Se comenzó a tomar datos a partir de los siete días después de la inoculación, cada tres días durante dos a tres semanas (hasta que la sexta o séptima hoja estuviera completamente expandida). Se clasificaron los síntomas de cada planta utilizando la escala de severidad (tabla 1 y figura 3) generada previamente (sección 3.3.1). Para confirmar que los síntomas que expresaron las plantas fueron producidos por el PRSV-W se realizaron pruebas ELISA-DAS utilizando la técnica descrita anteriormente (sección 3.2). Se compararon las medias de los valores ELISA de las cuatro clases de severidad (0-3) con la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher. Se clasificaron plantas de las poblaciones F_2 y retrocruces en clases de severidad y se probó el ajuste de estos datos a varios modelos genéticos utilizando el método chi-cuadrado a nivel alpha 0.05.

3.4 Evaluación en el campo de plantas F₂ Resistentes a PRSV-W

Se trasplantaron al campo de la Finca Alzamora, una muestra de 57 plantas F₂, que fueron clasificadas con severidad de enfermedad de 0 ó 1 (clasificadas como resistentes) durante el ensayo de herencia bajo condiciones de invernadero (sección 3.3.2). La Finca Alzamora, está ubicada en la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Al momento del trasplante, las plantas tenían aproximadamente 35 a 40 días de edad desde la fecha de siembra (15 días después de la segunda inoculación). La distancia de siembra entre plantas fue aproximadamente 3 metros, y 2.5 metros entre hileras. Las plantas se abonaban 2 veces, una semana después del trasplante y aproximadamente tres semanas después de la primera abonada con una fórmula de 10-10-10 (N-P-K) aplicado en una banda alrededor de la planta. El sistema de riego por goteo solo se utilizaba cuando era necesario. Se evaluó el desarrollo de síntomas virales y vigor en el campo hasta el momento de la cosecha. Se realizaron autopolinizaciones en las plantas F₂ más vigorosas y resistentes para el desarrollo de familias F₃.

3.5 Evaluación de Familias F₃ Derivadas de Plantas F₂ Resistentes

Se evaluó la resistencia a PRSV-W en familias F₃ generadas por medio de autopolinización de plantas F₂ (como descrito en la sección 3.4). Se evaluaron una muestra de 16 a 36 plántulas de cada familia F₃ estudiada. Las plántulas fueron mecánicamente inoculadas utilizando el mismo método descrito anteriormente. Para cada familia evaluada se incluyeron dos plántulas del parental susceptible correspondiente al cruce como control. Aproximadamente 20 días después de inocular, se evaluó cada plántula para severidad de síntomas utilizando la escala descrita anteriormente y se realizaron pruebas ELISA-DAS para PRSV.

4 RESULTADOS

4.1 Ensayo de Herencia

Los primeros síntomas comenzaron a ser visibles entre la 2^{da} y 4^{ta} hoja verdadera. En general, hubo gran variabilidad en el tipo y severidad de síntomas entre y dentro de cada población, especialmente en las generaciones F₂. Los síntomas comunes observados en plantas con baja severidad de enfermedad (clases 0 y 1) fueron puntos y líneas cloróticas especialmente en venas principales, mientras que en plantas con alta severidad de enfermedad (clases 2 y 3) los síntomas predominantes fueron mosaicos, ampollas y deformaciones. Al utilizar los valores de absorbancia resultantes de la prueba ELISA como parte de la evaluación de síntomas, se observó que a mayor severidad del síntoma del tejido (hoja) muestreado para la prueba ELISA, mayor fue el valor de absorbancia resultante. Al considerar todas las plantas de cada población evaluada (parentales, F₁, F₂ y retrocruces) los valores promedio de absorbancia (A405) resultantes de las pruebas ELISA fueron significativamente diferentes entre cada una de las clases de severidad de enfermedad (tabla 2). Cuando se consideraron las poblaciones F₂ se obtuvieron los mismos resultados (tablas 3, 4 y 5).

El cultivar NL siempre se mantuvo libre de síntomas y con valores de absorbancia menor a 0.200. La reacción de los parentales susceptibles no fue completamente uniforme, aunque siempre mostraron síntomas, hubo cierta variabilidad de tipo y severidad de síntomas dentro y entre cada parental (tabla 6 y figura 4). El cultivar Soler fue el genotipo susceptible que mostró los síntomas más leves.

En general, la cantidad de plantas que lucieron libre de síntomas (como NL) en cada población fue mucho menor que la esperada en una herencia monogénica recesiva. Las poblaciones F₁ se comportaron como se esperaba, uniformemente susceptibles, aunque las F₁ de

Tabla 2. Valores promedios de absorbancia (A405 nm) para cada clase de severidad de enfermedad observada al combinar todas las plantas de cada población evaluada en el ensayo de herencia de resistencia a *Papaya ringspot virus- W* en *Cucurbita moschata*.

Clases de severidad ^a	n ^b	Absorbancia promedio ^c
0	46	0.200 A
1	35	0.370 B
2	77	0.520 C
3	164	0.610 D

^a Se utilizó una escala de severidad de cuatro clases donde 0 = plantas sin síntomas, 1 = plantas con síntomas bien leves, 2 = plantas con síntomas intermedios y 3 = plantas con síntomas severos.

^b Se realizaron pruebas ELISA en dos de las cuatro corridas del ensayo de herencia donde se muestreó la 5ta o 6ta hoja en todas las plantas de cada población evaluada (parentales, F₁, F₂ y retrocruces); n = num. de plantas clasificadas en cada clase de severidad.

^c Medias con letras distintas indican diferencia significativa (p < 0.05), acorde con la prueba LSD Fisher.

Tabla 3. Valores promedio de absorbancia (A405 nm) para cada clase de severidad de enfermedad observada en la población (Soler x Nigerian Local) F₂ evaluada en el ensayo de herencia de resistencia a *Papaya ringspot virus- W* en *Cucurbita moschata*.

Clases de severidad ^a	n ^b	Absorción promedio ^c
0	13	0.250 A
1	19	0.370 B
2	18	0.530 C
3	23	0.620 D

^a Se utilizó una escala de severidad de cuatro clases donde 0 = plantas sin síntomas, 1 = plantas con síntomas bien leves, 2 = plantas con síntomas intermedios y 3 = plantas con síntomas severos.

^b Se realizaron pruebas ELISA en dos de las cuatro corridas del ensayo de herencia donde se muestreó la 5ta o 6ta hoja en todas las plantas de cada población evaluada ; n = num. de plantas clasificadas en cada clase de severidad.

^c Medias con letras distintas indican diferencia significativa (p < 0.05), acorde con la prueba LSD Fisher.

Tabla 4. Valores promedio de absorbancia (A405 nm) para cada clase de severidad de enfermedad observada en la población (Taína Dorada x Nigerian Local) F₂ evaluada en el ensayo de herencia de resistencia a *Papaya ringspot virus- W* en *Cucurbita moschata*.

Clases de severidad ^a	n ^b	Absorción promedio ^c
0	11	0.160 A
1	3	0.350 B
2	17	0.590 C
3	35	0.670 D

^a Se utilizó una escala de severidad de cuatro clases donde 0 = plantas sin síntomas, 1 = plantas con síntomas bien leves, 2 = plantas con síntomas intermedios y 3 = plantas con síntomas severos.

^b Se realizaron pruebas ELISA en dos de las cuatro corridas del ensayo de herencia donde se muestreó la 5ta o 6ta hoja en todas las plantas de cada población evaluada ; n = num. de plantas clasificadas en cada clase de severidad.

^c Medias con letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0.05$), acorde con la prueba LSD Fisher.

Tabla 5. Valores promedio de absorbancia (A405 nm) para cada clase de severidad de enfermedad observada en la población (Verde Luz x Nigerian Local) F₂ evaluada en el ensayo de herencia de resistencia a *Papaya ringspot virus- W* en *Cucurbita moschata*.

Clases de severidad ^a	n ^b	Absorción promedio ^c
0	9	0.150 A
1	4	0.260 B
2	26	0.460 C
3	29	0.530 D

^a Se utilizó una escala de severidad de cuatro clases donde 0 = plantas sin síntomas, 1 = plantas con síntomas bien leves, 2 = plantas con síntomas intermedios y 3 = plantas con síntomas severos.

^b Se realizaron pruebas ELISA en dos de las cuatro corridas del ensayo de herencia donde se muestreó la 5ta o 6ta hoja en todas las plantas de cada población evaluada ; n = num. de plantas clasificadas en cada clase de severidad.

^c Medias con letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0.05$), acorde con la prueba LSD Fisher.

Tabla 6. Número de plantas en cada clase de severidad en poblaciones de *Cucurbita moschata* inoculadas mecánicamente con *Papaya ringspot virus*- W.

Población	No. total de plantas	Clase de severidad ^a			
		0	1	2	3
Nigerian Local (NL)	16	16	0	0	0
Waltham (W)	18	0	0	0	18
(W x NL)F1	6	0	0	0	6
(W x NL)F2	53	8	4	9	32
(W x NL) x W	19	0	0	0	19
(W x NL) x NL	SND	SND	SND	SND	SND
Soler (S)	20	0	2	11	7
(S x NL)F1	20	0	0	12	8
(S x NL)F2	130	28	21	37	44
(S x NL) x S	16	0	0	5	11
(S x NL) x NL	18	0	3	5	10
Taína Dorada (TD)	19	0	0	2	17
(TD x NL)F1	14	3	6	3	2
(TD x NL)F2	124	16	14	25	69
(TD x NL) x TD	18	0	0	0	18
(TD x NL) x NL	5	3	0	2	0
Verde Luz (VL)	19	0	0	1	18
(VL x NL)F1	16	0	7	7	2
(VL x NL)F2	124	18	15	31	60
(VL x NL) x VL	19	0	0	4	15
(VL x NL) x NL	9	6	3	0	0

^a Se utilizó un escala con cuatro clases (0-3) donde 0 = plantas sin síntomas, 1 = plantas con síntomas bien leves, 2 = plantas con síntomas intermedios y 3 = plantas con síntomas severos.

SND = semilla no disponible

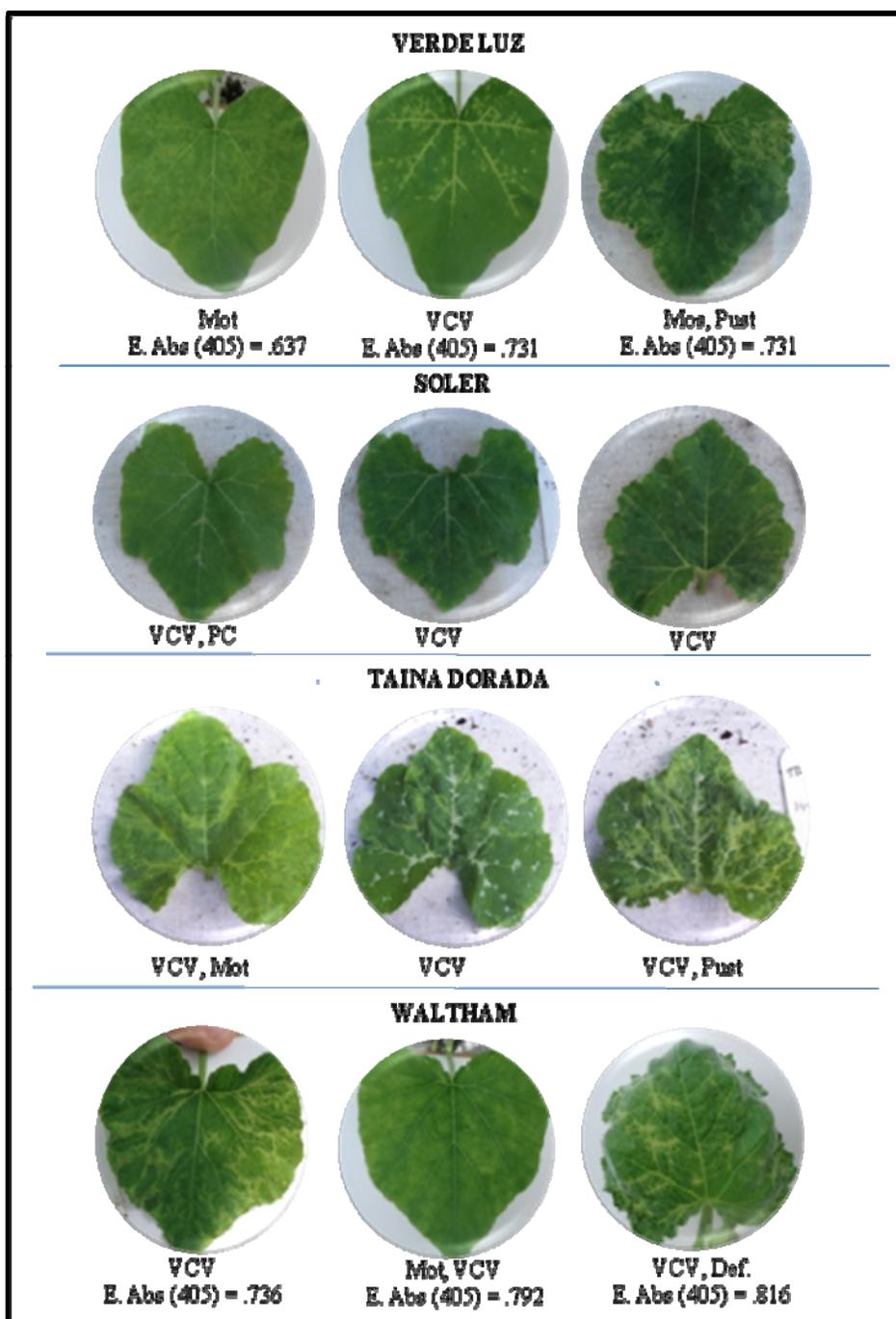


Figura 4. Variabilidad en tipo y severidad de síntomas dentro y entre los parentales inoculados mecánicamente con *Papaya ringspot virus- W* durante el ensayo de herencia de resistencia en *Cucurbita moschata*. Tipo de síntomas: VCV= veteado clorótico de venas, Mot = moteado, Def = deformación, CV = clorosis de venas, Pust = pustulas, Mos = mosaico; E. Abs (405) = ELISA absorbancia a 405 nm.

TD x NL y VL x NL muchas de sus plantas lucieron síntomas leves clasificados con severidad de 1 (tabla 6). En poblaciones F₂ las plántulas exhibieron síntomas de severidad de 0 a 3 (tabla 6). Las poblaciones F₂ derivadas de los cultivares Waltham, TD y VL ajustaron a un radio de segregación de 1: 3 (resistentes: susceptibles) ($p = 0.678$ a 0.836) cuando se incluyeron dentro del grupo de resistentes la combinación de plantas que mostraron severidad de enfermedad de 0 y 1, y dentro del grupo de susceptibles la combinación de plantas con severidad de enfermedad de 2 y 3 (tabla 7). La población F₂ derivada del cultivar Soler no ajustó ($p = 0.001$) al radio de segregación 1: 3 utilizando la combinación mencionadas arriba, pero si ajustó ($p = 0.362$) cuando se incluyeron en el grupo de resistentes solo plantas con severidad de enfermedad de 0 y en el grupo de susceptibles plantas con severidad de enfermedad 1, 2 y 3.

El retrocruce (Soler x NL) x NL no ajustó a la segregación esperada de 1: 1 (resistente: susceptible) en una herencia de resistencia monogénica recesiva en ninguna de las combinaciones de las clases de severidad (tabla 7). Todas las plantas de este retrocruce mostraron síntomas, donde plantas con síntomas severos (clasificadas con severidad de 2 y 3) fueron mucho más comunes que plantas con severidad de 1. En la población de retrocruce (VL x NL) x NL se observaron resultados opuestos: no hubo plantas con severidad de 2 y 3 y seis de las nueve plantas evaluadas no mostraron síntomas. El retrocruce (TD x NL) x NL exhibió la segregación 1: 1 esperada. Por otro lado, las poblaciones de retrocruce en dirección hacia el respectivo parental susceptible segregaron como se espera en una resistencia monogénica recesiva, donde todas las plantas de cada población desarrollaron síntomas severos (clasificadas con severidad de enfermedad de 2 y 3).

Tabla 7. Segregación para resistencia (R) y susceptibilidad (S), y probabilidades (p) de pruebas de chi-cuadrado asumiendo resistencia monogénica recesiva, en poblaciones de *Cucurbita moschata* inoculadas mecánicamente con *Papaya ringspot virus* cepa W.

Población	Radio esperado (R: S)	Segregación observada ^a			Segregación observada ^a		
		R (0)	S (1 + 2 + 3)	valor p (prueba χ^2)	R (0 + 1)	S (2 + 3)	valor p (prueba χ^2)
Nigerian Local (NL)		16	0		16	0	
Waltham (W)		0	18		0	18	
(W x NL)F1	0: 1	0	6		0	6	
(W x NL)F2	1: 3	8	45	0.096	12	41	0.692
(W x NL) x W	0: 1	0	19		0	19	
(W x NL) x NL	1: 1	SND	SND		SND	SND	
Soler (S)		0	20		2	18	
(S x NL)F1	0: 1	0	20		0	20	
(S x NL)F2	1: 3	28	102	0.362	49	81	0.001
(S x NL) x S	0: 1	0	16		0	16	
(S x NL) x NL	1: 1	0	18	0.000	3	15	0.005
Taína Dorada (TD)		0	19		0	19	
(TD x NL)F1	0: 1	3	11		9	5	
(TD x NL)F2	1: 3	16	108	0.002	30	94	0.836
(TD x NL) x TD	0: 1	0	18		0	18	
(TD x NL) x NL	1: 1	3	2	0.655	3	2	0.655
Verde Luz (VL)		0	19		0	19	
(VL x NL)F1	0: 1	0	16		7	9	
(VL x NL)F2	1: 3	18	106	0.002	33	91	0.678
(VL x NL) x VL	0: 1	0	19		0	19	
(VL x NL) x NL	1: 1	6	3	0.317	9	0	0.003

^a Segregación observada cuando se combinan las clases de severidad (clases de severidad de 0-3, donde 0 = sin síntomas y 3 = síntomas bien severos).

SND = semilla no disponible.

4.2 Evaluación en el Campo de Plantas F₂ Resistentes

La gran mayoría (78 %) de las plantas F₂ que se clasificaron con severidad de enfermedad de 0 en el estudio de herencia en el invernadero continuaron libre de síntomas en el campo (tabla 5). Sin embargo, 12 % de estas desarrollaron síntomas severos (severidad de 2 o 3). El 10 % restante desarrollaron síntomas leves (severidad de 1). Aproximadamente la mitad (4 de 7) de las plantas F₂ con severidad de 1 en el invernadero continuaron resistentes (severidad de 0 o 1) en el campo.

Tabla 8. Comportamiento bajo condiciones de campo de plantas de *Cucurbita moschata* que previamente habían mostrado severidad de enfermedad (sev) entre 0 y 1 en las poblaciones evaluadas en el ensayo de herencia de la resistencia a *Papaya ringspot virus* bajo condiciones de invernadero. Los valores en la tabla son los números de plantas evaluadas (las que lograron sobrevivir al trasplante) en cada clase de severidad.

Población	sev = 0 en invernadero				sev = 1 en invernadero			
	Severidad a nivel de campo ^a				Severidad a nivel de campo			
	0	1	2	3	0	1	2	3
(TD x NL) F ₂	14 ^b	0	0	0	2 ^b	1	1	0
(S x NL) F ₂	10 ^c	4	2	0	1	0	2	0
(VL x NL) F ₂	5 ^d	1	1	2 ^b	---	---	---	---
(W x NL) F ₂	3	0	0	0	---	---	---	---
(TD x NL) F ₁	3	0	0	0	---	---	---	---
(VL x NL) F ₁	2	0	0	0	---	---	---	---
(TD x NL) x NL	1	0	0	0	---	---	---	---
(S x NL) x NL	0	0	0	1 ^b	---	---	---	---
(VL x NL) x NL	1	0	0	0	---	---	---	---

^a Escala de severidad con cuatro clases (0-3) donde 0 = plantas sin síntomas, 1 = plantas con síntomas bien leves, 2 = plantas con síntomas intermedios y 3 = plantas con síntomas severos.

^b Una planta del total no tuvo buen desarrollo (raquitismo y poca producción de flores).

^c Dos plantas del total no tuvieron buen desarrollo.

^d Tres plantas del total no tuvieron buen desarrollo.

TD = Taíña Dorada, NL = Nigerina Local, S = Soler, VL = Verde Luz, W = Waltham.

4.3 Evaluación de Familias F₃ Derivadas de Plantas F₂ Resistentes

Se evaluó la susceptibilidad a PRSV-W en 14 familias F₃ que fueron derivadas de plantas F₂ clasificadas con una severidad de 0 o 1 en el invernadero y campo. De las 14, 12 fueron derivadas del cruce Soler x NL y dos derivadas del cruce TD x NL. Solo una familia ((TD x NL)F₃- E0904A-26) mostró resistencia uniforme, no segregando para susceptibilidad (tabla 6). Todas las plantas de esta familia mostraron un nivel de resistencia igual al parental resistente NL. Los controles susceptibles Soler y TD exhibieron una severidad promedio de 1.7 y 3.0, respectivamente (tabla 7). De las 13 familias que mostraron variabilidad en la severidad de síntomas causada por PRSV-W, 11 exhibieron una severidad promedio menor (de 0.0 a 1.6) a la de sus parentales susceptibles promedios (tabla 7). Las excepciones fueron las familias (Soler x NL)F₃-E0904A-13 y (Soler x NL)F₃- E0812-12 que presentaron una severidad promedio de 1.9 y 2.4, respectivamente. Esta última familia tuvo una alta incidencia de plantas con síntomas severos de PRSV-W.

En las pruebas ELISA, la absorbancia promedio de todas las familias F₃ y de los parentales susceptibles fluctuó entre 0.300 a 0.600 (tabla 7). En general no hubo una correlación significativa entre la absorbancia promedio con la severidad promedio dentro de cada familia (data no presentada). En la figura 5 se observa la dispersión de los valores de absorbancia para cada una de las familias F₃. Aún, en la familia (TD x NL)F₃- E0904A-26 (familia no.6 en la figura 5) que mostró resistencia uniforme (severidad promedio de 0), tuvo una absorbancia promedio de 0.359, sugiriendo la presencia de partículas virales sin mostrar ningún tipo de síntomas. Las familias F₃ (Soler x NL)F₃-E0904A-7 y (Soler x NL)F₃-E0904A-15 (7 y 8 respectivamente en la figura 5) resultaron con los valores de absorbancia por debajo de 0.200 y con severidad de 0 y 1 en la mayoría de sus plantas evaluadas.

Tabla 9. Reacción de familias F₃ de *Cucurbita moschata* derivadas de plantas F₂ resistentes al ser inoculadas con *Papaya ringspot virus- W*.

Familia F ₃	Código experimental	Severidad previa de planta madre F ₂ (invernadero/campo)	Num. de plantas en cada clase de severidad				Total de plantas
			0	1	2	3	
(S x NL) F ₃	E0812-11	0 / 0	7	7	2	0	16
(S x NL) F ₃	E0812-12	0 / 0	0	1	7	8	16
(S x NL) F ₃	E0812-1	0 / 0	1	11	4	0	16
(S x NL) F ₃	E0812-10	0 / 0	4	7	5	0	16
(S x NL) F ₃	E0812-7	0 / 0	0	3	3	0	6
(S x NL) F ₃	E0904-16	0 / 0	1	7	7	0	15
(S x NL) F ₃	E0904A-28	1 / 1	0	8	7	1	16
(S x NL) F ₃	E0904A-17	0 / 0	6	5	3	2	16
(S x NL) F ₃	E0904-7	0 / 1	9	3	1	0	13
(S x NL) F ₃	E0904-15	0 / 0	2	4	4	0	10
(S x NL) F ₃	E0904A-10	0 / 0	3	11	1	1	16
(S x NL) F ₃	E0904A-13	0 / 0	0	4	9	2	15
(TD x NL) F ₃	E0904A-26	0 / 0	11	0	0	0	11
(TD x NL) F ₃	E0904A-5	0 / 0	7	2	4	3	16

TD = Taína Dorada, NL = Nigerian Local, S = Soler.

Tabla 10. Severidad y absorbancia promedio de cada Familia F₃ de *Cucurbita moschata* inoculadas con *Papaya ringspot virus- W*.

Familias	Código experimental	Total de plantas	Severidad promedio	Absorbancia (405) promedio
(S x NL) F ₃	E0812-11	16	0.7	0.317
(S x NL) F ₃	E0812-12	16	2.4	0.480
(S x NL) F ₃	E0812-1	16	1.2	0.495
(S x NL) F ₃	E0812-10	16	1.1	0.483
(S x NL) F ₃	E0812-7	6	1.5	0.441
(S x NL) F ₃	E0904-16	15	1.4	0.577
(S x NL) F ₃	E0904A-28	16	1.6	0.399
(S x NL) F ₃	E0904A-17	16	1.1	0.517
(S x NL) F ₃	E0904-7	13	0.4	0.133
(S x NL) F ₃	E0904-15	10	1.2	0.187
(S x NL) F ₃	E0904A-10	16	1.0	0.301
(S x NL) F ₃	E0904A-13	15	1.9	0.545
<i>Soler</i>	<i>Parental</i>	20	1.7	0.440
(TD x NL) F ₃	E0904A-26	11	0.0	0.359
(TD x NL) F ₃	E0904A-5	16	1.2	0.506
<i>Taína Dorada</i>	<i>Parental</i>	4	3.0	0.540

TD = Taína Dorada, NL = Nigerian Local, S = Soler.

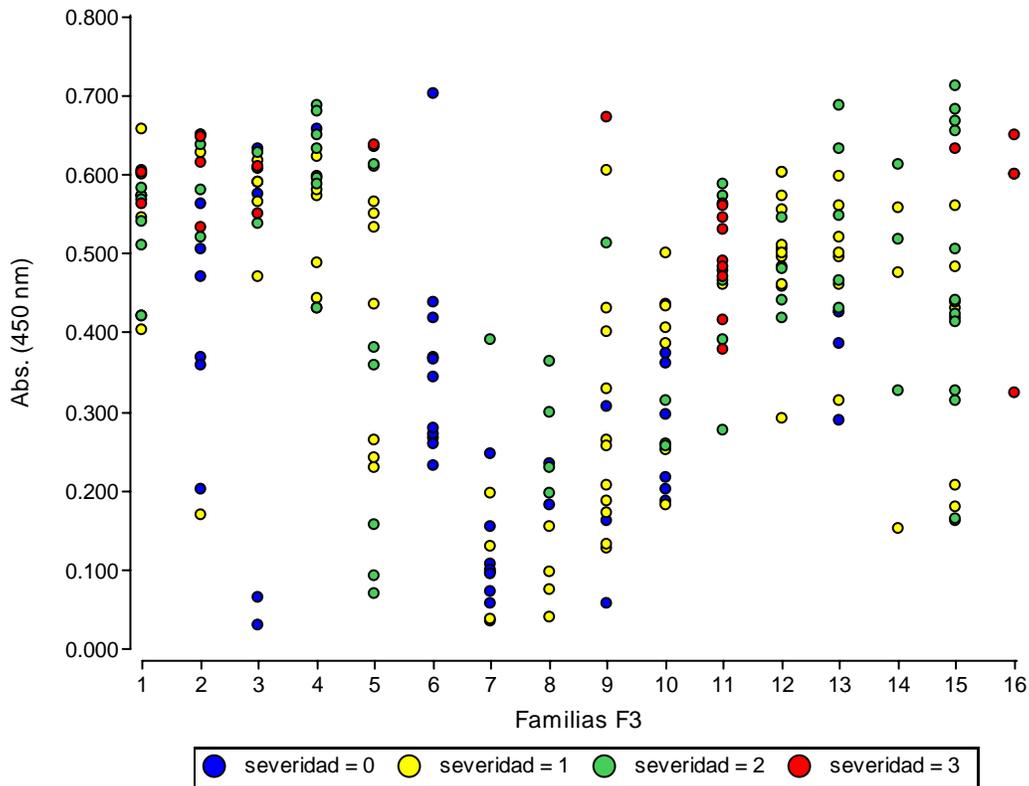


Figura 5. Valores de absorbancia de plantas en 16 familias F₃ de *Cucurbita moschata* inoculadas mecánicamente con *Papaya ringspot virus-W*. Colores representan cada clase de severidad (sev). Familias: 1=(S x NL)F₃-E0904A-13, 2=(TD x NL)F₃-E0904A-5, 3=(S x NL)F₃-E0904A-17, 4=(S x NL)F₃-E0904A-16, 5=(S x NL)F₃-E0904A-28, 6=(TD x NL)F₃-E0904A-26, 7=(S x NL)F₃-E0904A-7, 8=(S x NL)F₃-E0904A-15, 9=(S x NL)F₃-E0904A-10, 10=(S x NL)F₃-E0812-11, 11=(S x NL)F₃-E0812-12, 12=(S x NL)F₃-E0812-1, 13=(S x NL)F₃-E0812-10, 14=(S x NL)F₃-E0812-7, 15= Soler (parental), 16=Taína Dorada (parental).

5 DISCUSIÓN

Aunque hubo cierta variación en cuanto al tipo y severidad de los síntomas causados por PRSV-W en cada una de las poblaciones evaluadas, estos fueron similares a los que han sido descritos en trabajos previos (Provvidenti, 1996; Lecoq et al., 1998) y que son comúnmente observados en PR en cultivos de cucurbitáceas afectados por esta enfermedad: mosaicos, deformaciones y manchas cloróticas, principalmente en hojas. Esta pequeña variación en la sintomatología pudo deberse a que genéticamente cada población es distinta entre sí, y que también existe variación dentro de cada una, ya que con excepción de Waltham (cultivar genéticamente homogéneo), Soler, TD y VL son poblaciones de polinización abierta. En el cultivar Soler y en sus poblaciones derivadas, los síntomas se expresaron consistentemente de forma más leve en comparación a los demás. Esto sugiere que este cultivar posiblemente posee genes adicionales para resistencia al PRSV-W. El cultivar NL consistentemente lució libre de síntomas.

En este estudio la herencia de la resistencia a PRSV-W, no resultó clara. No todas las poblaciones evaluadas ajustaron a los ratios de segregación esperados en una herencia monogénica recesiva, el tipo de herencia reportado anteriormente (Brown et al., 2003). Inesperadamente las poblaciones F_1 de TD x NL y VL x NL exhibieron bastantes plantas (9 y 7 respectivamente) con síntomas leves (clasificadas con severidad de 1) y algunas lucieron libre de síntomas. Esto podría deberse a una resistencia de escape, debido a una inoculación inefectiva o a alguna interacción génica más compleja que una herencia monogénica recesiva. En las poblaciones F_2 , la cantidad de plantas completamente libre de síntomas resultó mucho menor que la esperada en una herencia monogénica recesiva y tomando en consideración que el parental resistente NL lució consistentemente libre de síntomas. Hubo plantas que exhibieron síntomas

leves, clasificadas con severidad de 1. Cuando se clasificaron como resistentes la combinación de plantas libre de síntomas (severidad de 0) y plantas con severidad de 1, las poblaciones F₂ derivadas de Waltham x NL, TD x NL y VL x NL ajustaron al radio de segregación 1: 3 (resistentes; susceptibles) comprobando lo que Brown et al., (2003) reportaron, una herencia de resistencia al PRSV-W monogénica recesiva. La población F₂ derivada de Soler x NL mostró la cantidad esperada de plantas libre de síntomas, la cual ajustó al radio de segregación 1: 3 incluyendo solo como resistentes las plantas que mostraron severidad de 0 (libre de síntomas) y como susceptibles plantas con severidad de 1, 2 y 3, aunque en general hubo muy pocas con severidad de 3 (síntomas severos), continuando con el patrón de síntomas no tan severos presentado por su parental susceptible Soler. Como mencioné anteriormente esto podría deberse a que el cultivar Soler posiblemente posea genes secundarios envueltos en la resistencia a PRSV-W.

Las poblaciones de retrocruces en dirección hacia el parental recurrente susceptible resultaron con alto grado de susceptibilidad para cada cultivar. Por otro lado, los retrocruces en dirección hacia el parental resistente (NL) resultaron con cierto grado de resistencia en el cultivar VL, con una razón de segregación 1: 1 en el cultivar TD, y con un alto grado de susceptibilidad en el cultivar Soler; esta población no pudo ser evaluada con el cultivar Waltham por falta de semilla. Estos resultados no son claros ni consistentes, lo que indica que la herencia monogénica recesiva de la resistencia al PRSV-W se ve alterada por la interacción génica entre los cultivares tropicales de polinización abierta y NL. También la cantidad de plantas evaluadas para las mencionadas poblaciones no fue suficientemente grande para poder observar claramente una tendencia en la segregación.

En la evaluación de las familias F_3 derivadas de plantas F_2 resistentes también se observaron resultados un poco inesperados, ya que la mayoría de las familias evaluadas no mostraron una resistencia uniforme y desarrollaron síntomas (tablas 6 y 7), aunque en general más leves que sus respectivos parentales susceptibles. Si la herencia de resistencia a PRSV-W es controlada por un solo gen recesivo se espera que al autofecundar plantas F_2 resistentes, las familias F_3 resulten uniformemente resistentes. No se observó este nivel de uniformidad en plantas F_3 en esta investigación. Hubo variación fenotípica entre plantas de la misma familia F_3 , incluso se observaron plantas con una severidad de 2 y 3. Este estudio es el primero que se ha reportado sobre estudios al nivel de campo y en familias F_3 derivadas de plantas resistentes en la F_2 . Como tal, los resultados afirman que la herencia de resistencia a PRSV-W posee cierto grado de complejidad cuando se intenta incorporar en cultivares de polinización abierta y que es necesario realizar pruebas de progenie para asegurar que plantas seleccionadas para resistencia a PRSV-W producen progenies resistentes. No se puede confiar que todas las plantas seleccionadas en la F_2 como resistentes (por medio de una inoculación mecánica) son homocigotos para los genes controlando la resistencia.

Con el fin de desarrollar un sistema más efectivo de clasificación de severidad de enfermedad de PRSV-W, se realizaron pruebas ELISA-DAS y se obtuvieron los valores de absorbancia de cada planta evaluada en esta investigación. En el experimento de ensayo de herencia hubo una correlación entre los síntomas y el valor de absorbancia: a mayor severidad de síntomas, mayor fue el valor de absorbancia. Hubo una diferencia significativa en los valores de absorbancia entre las clases de severidad de la enfermedad (sección 4.1, tabla 2). En la evaluación de familias F_3 , aunque los síntomas observados fueron menos severos (mayormente severidad de 2 y 1) (sección 4.3, tabla 6), no se logró observar la relación entre severidad de

síntomas y valores de absorbancia. Hubo muchas plantas clasificadas con severidad de 1 que obtuvieron una absorbancia mayor de 0.400, igual que plantas con severidad de 3 (data no presentada). En la tabla 7 (sección 4.3) se observa que familias con severidad promedio menor de 2, obtuvieron una absorbancia promedio bien cercana o hasta mayor que familias con severidad promedio mayor de 2. Incluso, la familia (TD x NL) F_3 -E0904A-26 que tuvo una severidad promedio de 0, registró una absorbancia promedio mayor de 0.300. En general, el valor de absorbancia ayuda a identificar y seleccionar de una manera cuantitativa plantas con síntomas bien severos y plantas con síntomas bien leves. Sería más difícil utilizar este valor para distinguir entre plantas con severidad de síntomas intermedios, ya que el rango de variación es bien amplio. Utilizando la combinación de ambas medidas de severidad, absorbancia de ELISADAS y severidad fenotípica, las familias F_3 (S x NL) F_3 -E0904A-7 y (S x NL) F_3 -E0904A-15 resultaron ser las más resistentes a PRSV-W ya que obtuvieron valores promedios de absorbancia por debajo de 0.200 y severidad menor de 1.5. Estas, junto a la familia (TD x NL) F_3 -E0904A-26 (severidad promedio de 0) podrían ser utilizadas como fuente de resistencia a PRSV-W en futuros estudios.

6 CONCLUSIÓN

Los resultados del ensayo de herencia sugieren que la herencia de la resistencia a PRSV-W que posee el cultivar NL es controlada por un gen (monogénico) principal, ya que la mayoría de las poblaciones evaluadas ajustaron a los radios esperados bajo el modelo de un gen en dominancia completa. Por otro lado, la evaluación de poblaciones F_3 derivadas de plantas F_2 resistentes no sustentó lo antes sugerido, ya que no se observó una resistencia uniforme (como NL) en la mayoría de las poblaciones F_3 , como se espera si la herencia de la resistencia fuera

controlada por un solo gen. Esto podría deberse a que la interacción génica entre el cultivar NL y los cultivares locales de polinización abierta (genéticamente heterogéneos) utilizados, hacen de esta herencia una más compleja, sugiriendo la intervención de genes secundarios. Los valores de absorbancia utilizando pruebas ELISA-DAS podría servir de herramienta para seleccionar de manera cuantitativa, particularmente entre plantas con síntomas bien severos y plantas con síntomas bien leves. Este estudio demuestra la importancia de realizar una prueba de progenie de plantas resistentes cuando se está seleccionando para resistencia a PRSV-W. Gracias a la prueba de progenie se han logrado identificar varias plantas dentro de las familias F₃ evaluadas en este estudio con alto grado de resistencia a PRSV-W y con características agronómicas aceptables que podrían ser utilizadas como fuente de resistencia en futuros estudios.

LITERATURA CITADA

- Agbios. 2005. GM database. (<http://www.agbios.com/dbase.php?action=Synopsis>)
- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5th Edition Elsevier Academic Press, Burlington, Maine. 725-756 pp.
- Anónimo, 2008. Nutrient Values for Butternut Squash, winter, raw. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21 (2008). Obtenido el 5 de septiembre del 2009 de http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl.
- Barbara, D.J. & M.F. Clark. 1982. A simple indirect ELISA using F(ab') fragments of immunoglobulin. *Journal of General Virology* 58: 315.
- Baulcombe, D. 1989. Strategies for virus resistance in plants. *Trends in Genetics* 5: 56-60
- Beachy, R. 1990. Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annu Rev Phytopathol* 28: 451-474.
- Blancard, D., H. Lecoq, & M. Pitrat. 1991. *Maladies des cucurbitacées. Observer, identifier, lutter.* PHM and INRA-Editions, Paris, France.
- Blumenthal M, W.R. Busse, A. Goldberg, J. Gruenwald, T. Hall, C.W. Riggins, R.S. Rister (eds), S. Klein & R.S. Rister (trans).1998. *The complete German Commission E Monographs.* S. 193. Austin: American Botanical Council; Boston; Integrative Medicine Communications.
- Brown R.N. & J. Myers. 1998. A simple Protocol for Isolating DNA from Fresh *Cucurbita* Leaves. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 21: 46-47.
- Brown R.N. & J. Myers. 2002. A genetic map of squash (*Cucurbita* spp.) with randomly amplified polymorphic DNA markers and morphological markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127(4): 568-575.
- Brown R., A. Bolanos-Herrera, J. Myers & M. Miller Jahn. 2003. Inheritance of resistance to four cucurbita viruses in *Cucurbita moschata*. *Euphytica* 129: 253-258.
- Carle, R., D. Maynard & L. Wessel-Beaver. 2000. Tropical pumpkin hybrid development: landraces to hybrid cultivars. *Proc. Cucurbitaceae, Acta Horticulturae*, number 510: 95-100.
- Clark, M.F. & M. Bar-Joseph. 1984. Enzyme immunosorbent assays in plant virology. *Methods in Virology* 7: 51-85.

- Clark, M.F. & A.N. Adams. 1977. 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 & S. Azevedo. 2003. Resistance to *papaya ringspot virus* in summer squash *Cucurbita Pepo* L. introgressed from an interspecific *C. pepo* x *C. mochata* cross. *Euphytica* 132: 211-215.
- Decker-Walters, D.S., & T.W. Walters. 2000. Squash. p. 335-351. En K.F. Kiple and K.C. Ornelas (ed.) *The Cambridge world history of food*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Dodds, J.A. 1982. Cross-protection and interference between electrophoretically distinct strains of cucumber mosaic virus in tomato. *Virology* 118: 235-240.
- Erlich, H.A. (ed.). 1989. *PCR technology, principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press, New York.
- Escudero, J. 1992. Situación de los virus que afectan a las cucurbitáceas en la costa sur de Puerto Rico, p. 44-51. En: *El cultivo de Cucurbitáceas: Memorias del Foro Técnico 26 de junio de 1992*, Lajas, Puerto Rico. Univ. P.R., Recinto Univ. Mayagüez, Estación Expt. Agr.
- Estado Libre Asociado de Puerto Rico, Departamento de Agricultura, Oficina de Estadísticas Agrícolas. 2007. *Ingreso Bruto Agrícola: Año Fiscal 2006-2007*. p. 14. Puerto Rico.
- Ferriol, M., B. Picó, P. Fernández de Cordova, & F. Nuez. 2004. Molecular Diversity of a Germplasm Collection of Squash (*Cucurbita moschata*) Determined by SRAP and AFLP Markers. *Crop Sci.* 44: 653-664.
- Goldbach, R., E. Bucher & M. Prins. 2003. Resistance mechanisms to plant viruses: An overview. *Virus Res* 92:207-212.
- Gonsalves, D. 1998. Control of Papaya Ringspot Virus in Papaya: A Case Study. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:415-37.
- Gonsalves, D. 2002. Coat protein transgenic papaya "acquired" immunity for controlling *Papaya ringspot virus*. *Curr Top Microbiol Immunol* 266:73-83.
- Gonsalves, D & S.M. Garnsey. 1989. Cross-protection techniques for control of plant virus diseases in the tropics. *Plant Dis* 73:592-597.
- Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, A. P. Donchenko, & V. M. Blinov. 1989. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Research* 17: 4713-4730.

- Guner, N, E. Brunton, T. Wehner, & Z. Pesic-VanEsbroeck. 2002. Methods for screening watermelon for resistance to papaya ringspot virus type-W. *Scientia Horticulturae* 94: 297-307.
- Hamilton, R.I., J.R. Edwardson, R.I.B. Francki, H.T. Hsu, R. Hull, R. Koenig & R.G. Milne. 1981. Guidelines for the identification and characterization of plant viruses. *Journal of General Virology* 54: 223-241.
- Hull, R. 2002. *Matthew's Plant Virology*. 4th edition. Academic Press, Inc.
- Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (eds.). 1990. *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press Inc.
- Jensen, D.D. 1949. Papaya virus diseases with special reference to papaya ringspot. *Phytopathology* 39:191-211.
- Kassanis B. & D.A. Govier, 1971. New evidence on the mechanism of aphid transmission of potato C and potato aucuba mosaic viruses. *Journal of General Virology* 10, 99-101.
- Kobori, T., B. S. Ryang, T. Natsuaki, & Y. Kosaka. 2005. A new technique to select mild strain of Cucumber mosaic virus. *Plant Dis.* 89: 879-872.
- Koenig, R. 1981. Indirect ELISA for the broad specificity detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 55:53.
- Kosaka, Y. & T. Fukunishi. 1997. Multiple inoculation with three attenuated viruses for the control of cucumber virus disease. *Plant Dis.* 81: 733-738.
- Kreuter M.H. 2000. Hormone disbalance and urinary bladder disease. *Phyto Novum*, Emil Flachsmann AG, Zürich, Switzerland, pp 2–24.
- Krubphachaya, P., M. Jurícek, & S. Kertbundit. 2007. Induction of RNA-mediated Resistance to Papaya Ringspot Virus Type W. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 40, No. 3, pp. 404-411.
- Langham M. 2003. Mechanical Inoculation of Plant Viruses. *Plant Pathology: Concepts & Laboratory Exercises*, Cap 5: 33-40. Por CRC Press LLC.
- Lecoq, H., G. Wisler & M. Pitrat. 1998. Cucurbit viruses: the classics and the emerging. En: J.D. McCreight (ed.), *Cucurbitaceae '98: Evaluation and enhancement of cucurbit germplasm*. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Lecoq, H. & M. Pitrat. 1985. Specificity of the helper-component-mediated aphid transmission of three potyvirus infecting muckmelon. *Phytopathology* 75: 890-893.

- Lin, Y., P. A. Rundell, , & C. A. Powell. 2002. In situ immunoassay (ISIA) of field grapefruit trees inoculated with mild isolates of *Citrus tristeza virus* indicates mixed infections with severe isolates. *Plant Dis.* 86:458-461.
- Linarez, A. 2008. Response to Phenotypic Recurrent Selection for Resistance to *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) in Tropical Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne). Tesis para el grado de Maestría, Universidad de Puerto Rico, Recinto Mayaguez.
- Lomonosoff, G.P. 1995. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 33:323-343.
- Mahgoub H. A., C. Desbiez, C. Wipf-Scheibel, G. Dafalla & H. Lecoq. 1997. Characterization and occurrence of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Sudan. *Plant Pathology* 46: 800-05.
- Mahmood T. & C.M. 1999. Evidence of Cross Protection Between Beet Soilborne Mosaic Virus and Beet Necrotic Yellow Vein Virus in Sugar Beet. *Plant Dis.* 83: 521-526.
- Maluf, W.R., J.J. Pereira & 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 & M. Castelo-Branco. 1986. Screening of *Cucurbita* spp. accessions for resistance to watermelon mosaic virus-1. *Revista Brasileira de Genética* 9(1): 161-167.
- Matthews, R.E.F. 1991. *Plant Virology*. 3th Edition, Academic Press Inc, New York. 835 pp.
- Mckinney, H. H. 1929. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa, and Gibraltar. *J. Agric. Res.* 39: 557-578.
- McPherson, M.J., P. Quirke, & G.R. Taylor (ed.). 1991. *PCR: a practical approach*. IRL, Oxford.
- Montasser, M. S., M. E. Tousignant, & J.M. Kaper. 1998. Viral satellite RNAs for the prevention of cucumber mosaic virus (CMV) disease in field-grown pepper and melon plants. *Plant Dis.* 82:1298-1303.
- Mossop, D.W. & R.I.B. Francki. 1979. Comparative studios on two satellite RNA's of cucumber mosaic virus. *Virology* 95: 395-404.
- Murant AF, B. Raccah, T.P. Pirone. 1988. Transmission by vectors. En: *The Filamentous Plant Viruses*, ed. RG Milne, pp. 237-73. New York: Plenum.
- National Research Council. 1989. *Lost crops of the Incas: Little known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation*. National Academy Press. Washington, DC.

- Nee, M. 1990. The Domestication of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Economic Botany* 44(3 supplement): 56-68.
- Ng C.K.J. & B.W. Falk. 2006. Virus –Vector interaction mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*44:183–212.
- Paris, H.S. 2000. First two publications by Duchesne of *Cucurbita moschata* (Cucurbitaceae). *Taxon* 49: 305-319.
- Pasamontes, L., J. Gubser, R. Wittek & G.J. Viljoen. 1991. Direct identification of recombinant vaccinia virus plaques by PCR. *Journal of Virological Methods* 35: 137-141.
- Paz-Carrasco, L. & 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.
- Perez, J.E. 1963. A strain of squash mosaic virus and other viruses found in Puerto rico, during 1958-1962. *J. Agr. Univ. P.R.* 47(3): 141-153.
- Pirone T., & S. Blanc. 1996. Helper-dependent vector transmisión of plant virases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 227-47.
- Powell-Abel, P, R.S. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S.G. Rogers, R.T. Fraley & R.N. Beachy. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the Tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743.
- Provvidenti, R. 1996. Diseases caused by viruses. En: T.A. Zitter, D.L. Hopkins, & C.E. Thomas (eds.). *Compendium of cucurbit diseases*. APS Press, St. Paul, Minn. p. 37-45
- Provvidenti, R. 1993. Resistance to viral diseases of vegetables. En: Kyle, M.M. (ed.) *Timber Press Inc. Portland, OR*.
- Provvidenti, R. 1986. Viral diseases of cucurbits and sources of resistance. *Food & Fert. Technol. Cntr., Taiwan, Tech. Bul.*
- Provvidenti, R., R.W. Robinson & H.M. Munger, 1978. Resistance in feral species to six viruses infecting *Cucurbita*. *Plant Dis Rptr* 62: 326-329.
- Purcifull, D.E. & E. Hiebert. 1979. Serological distinction of *Watermelon mosaic virus* isolates. *Phytopathology* 69:112-116.
- Purcifull, D., J. Edwardson, E. Hiebert, & D. Gonsalves. 1984. Papaya ringspot virus. CMI/AAB. *Descriptions of Plant Viruses* No. 209 (No. 84 revised, July 1984), 8.

- Quemada, H.D. & D.W. Groff. 1995. Genetic engineering approaches in the breeding of virus resistance squash. In: G. Lester and J. Dunlap (eds.), Proceedings Cucurbitacea '94, pp. 93-94. Gateway Publishers, Edinburg, Texas.
- Robinson R.W. & D.S. Decker-Walters. 1997. Cucurbits. CAB International, Oxon (GB).
- Rybicki, E.P. & M.B. von Wechmar. 1981. The serology of the Bromoviruses, 1. Serological interrelationships of the Bromoviruses. *Virology* 109: 309.
- Rybicki, E.P. & F.L. Hughes. 1990. Detection and typing of maize streak virus and other distantly related geminivirus of grasses by polymerase chain reaction amplification of a conserved viral sequence. *Journal of General Virology* 71: 2519-2526.
- Saade, R.L. 1995. Estudios Taxonómicos y Ecogeográficos de las Cucurbitaceae Latinoamericanas de Importancia Económica. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools. 9. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy: pp. 15- 17
- Saade, R.L. & S. Montes. (n.d.) La agricultura en Mesoamerica: Cucúrbitas (*Cucurbita* spp.) Obtenida el 2 de diciembre del 2008.
http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap2_3.htm#Top.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, & N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 487-491.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. Molecular cloning; a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. p.1659
- Sanford, J.C. & S.A. Johnston. 1985. The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance gene from the parasite's own genome. *J Thero Biol* 113:395-405.
- Sanjur, O.I., D.R. Piperno, T.C. Andres, & L. Wessel-Beaver. 2002. Phylogenetic relationships among domestication and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas of origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 99:535-540.
- Schmidlin CB & M.H. Kreuter. 2003. Cucurbita pepo, mögliche Einfluss auf hormonelle Ungleichgewicht bei Inkontinenz. *Phytotherapie* 3:2-4.
- Smith, C.F., S.M. Gaud, L.F. Martorell, & M.E. Perez-Escolar. 1971. Additions and corrections to the Aphididae of P.R. *Journal of Agriculture of University of P.R.* 55:192-258.
- Soler, C., P. Allibert, Y. Chadonnet, P. Cros, B. Mandrand, & J. Thivolet. 1991. Detection of human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18 in mucosal and cutaneous lesions by the multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 35: 143-157.

- Strange, E.B., N. Guner, & T.C. Wehner. 2002. Screening the Watermelon Germplasm Collection for Resistance to Papaya Ringspot Virus Type-W. *Crop Sci.* 42: 1324-1330.
- Swenson, K.G. 1968. Role of aphids in the ecology of plant viruses. *Annu. Rev. of Phytopathology* 6: 351-374.
- Thomas, P. 1983. Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. *Methods in Enzymology* 100: 255-266.
- Tijssen, P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. (Burdon, R.H. & P.H. van Knippenberg, eds.). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam: 549 pp.
- Tripathi, S., J. Suzuki, S. Ferreira & D. Gonsalves. 2008. *Papaya ringspot virus-P*: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Molecular Plant Pathology* 9 (3): 269-280.
- Torrance, L. & R.A.C. Jones. 1981. Recent developments in serological methods suited for use in Soutine testing for plant viruses. *Plant Pathology* 30: 1-20.
- Valkonen, J., M.L.Rajamaki, & T. Kekarainen. 2002. Mapping of viral genomic regions important in cross protection between strains of *Potyvirus*. *MPMI*. 15, No. 7: 683-692.
- Wai, T., & R. Grumet. 1995. Inheritance of resistance to the watermelon mosaic strain of *papaya ringspot virus* in the cucumber line TMGG1. *HortScience* 30: 338-340.
- Wang, C.H. & S.D. Yeh. 1997. Divergence and conservation of the genomic RNA's of Taiwan and Hawaii strains of Papaya ringspot potyvirus. *Arch. Virol.* 142: 271-285.
- Wang, H.L., S.D. Yeh, R.J. Chiu & D. Gonsalves. 1987. Effectiveness of cross protection by mild mutants of papaya ringspot virus for control of ringspot disease of papaya in Taiwan. *Plant Dis* 71:491-497.
- Wang, Y., R. Provvidenti, & R. Robinson. 1984. Inheritance of resistance to watermelon mosaic virus 1 in cucumber. *HortScience* 19: 587-588.
- Watson, M.A., R.T. Plumb. 1972. Transmission of plant-pathogenic viruses by aphids. *Annu. Rev. of Entomology* 17: 425-452.
- Webb, S.E. & R.V. Tyson. 1997. Evaluation of virus-resistant squash varieties. *Proc Florida State Hort Soc* 110: 299-302.
- Webb, R.E & H.A. Scott. 1965. Isolation and identification of watermelon mosaic viruses 1 and 2. *Phytopathology*. 55: 895-900.

- Weeden, N.F., R.W. Robinson & F. Ignart, 1984. Linkage between an isozyme locus and one of the genes controlling resistance to watermelon mosaic virus 2 in *Cucurbita ecuadorensis*. *Cucurbit Genetics Coop Rept* 7: 84-85.
- Wessel-Beaver, L. 2000a. Inheritance of silverleaf resistance in *Cucurbita moschata*. *Proc. Cucurbitaceae, Acta Horticulturae*, 510: 289-295.
- Wessel-Beaver, L. 2000b. Evidence for the center of diversity of *Cucurbita moschata* in Colombia. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 23:54-55.
- Wessel-Beaver, L. 2005. Release of 'Soler' tropical pumpkin. *J. Agric. Uni. PR.* 80(3-4): 263-266.
- Wessel-Beaver, L., O. Roman & L. Flores. 2006. Performance of new tropical pumpkin genotypes under varying cultural practices. *J. Agric. Uni. PR.* 90(3-4): 193-206.
- Yeh, S.D. & D. Gonsalves. 1985. Translation of Papaya ringspot virus RNA in vitro: detection of a possible polyprotein that is processed for capsid protein, cylindrical-inclusion protein, and amorphous-inclusion protein. *Virology* 143: 260-271.
- Yeh, S.D. & D. Gonsalves. 1984. Evaluation of induced mutants of Papaya ringspot virus for control by cross protection. *Phytopathology* 74:1086-1091.
- Yeh, S.D., D. Gonsalves, H.L. Wang, R. Namba & R.J. Chiu. 1988. Control of *Papaya ringspot virus* by cross protection. *Plant Dis* 72: 375-380.
- Yeh, S.D., F.J. Jan, C.H. Chiang, P.J. Doong, M.C. Chen, P.H. Chang & H.J. Bau. 1992. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Papaya ringspot virus RNA. *J. Gen. Virol.* 73: 2531-2541.
- Zitter, T., & J.N. Simons. 1980. Management of viruses by alteration of vector efficiency and by cultural practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 289-310.