

**MEJORAMIENTO PARA RESISTENCIA A ZUCCHINI
YELLOW MOSAIC VIRUS EN CALABAZA (*CUCURBITA
MOSCHATA*) EN PUERTO RICO**

Por

Luis Genaro Sierra Rivera

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
EN AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2012

Aprobado por:

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

Fecha

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

Fecha

Silvia R. Cianzio, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Anand D. Sharma, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

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

Fecha

RESUMEN

Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) es una enfermedad viral altamente destructiva que afecta las cucurbitáceas causando grandes pérdidas económicas en la producción agrícola. En *Cucurbita moschata* Duchesne, ‘Nigerian Local’ (NL) ha sido identificado resistente a ZYMV y estudios previos indican que esta resistencia es completamente dominante. El propósito principal de esta investigación fue confirmar la herencia de resistencia en cultivares locales y evaluar líneas F₃ seleccionadas por retrocruce para resistencia y características hortícolas. El parental resistente NL, los cuatro parentales susceptibles y el F₁ entre NL y cada parental susceptible, fueron inoculados con ZYMV. Las plantas inoculadas con NL estuvieron completamente libres de síntomas. Todos los parentales susceptibles mostraron síntomas severos, mientras que las plantas F₁ mostraron síntomas leves. Los valores de lecturas ELISA en plantas F₁ fueron ligeramente elevados en comparación con NL. Este estudio sugiere que la resistencia de NL a ZYMV es de dominancia parcial. En Isabela, Puerto Rico, se evaluaron las mejores líneas F₃ (de retrocruce). Las plántulas fueron inoculadas mecánicamente con ZYMV, evaluadas para severidad de los síntomas, lecturas ELISA y características hortícolas. NL permaneció completamente libre de síntomas y tuvo resultados bajos en las lecturas ELISA. La severidad y las lecturas ELISA de las líneas F₃ fueron menores que los parentales susceptibles, y por lo general mayores o iguales que las de NL, el parental resistente. Esto sugiere que la resistencia completa vista en NL no fue totalmente incorporada en estas líneas. Se identificaron algunas líneas que combinaron las buenas características de sus padres recurrentes junto a un mejor nivel de resistencia a ZYMV.

ABSTRACT

Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) is a destructive viral disease that affects cucurbits. In *Cucurbita moschata* Duchesne, ‘Nigerian Local’ (NL) has been identified as resistant to ZYMV. The purpose of this research was to confirm the inheritance of ZYMV resistance in local cultivars and to test the performance and resistance of backcross F₃ lines in the field. NL, the four susceptible parents and the F₁ between NL and each susceptible parent were inoculated with ZYMV. Inoculated NL plants were completely free of symptoms. All susceptible parents showed severe symptoms, while the F₁ plants showed mild symptoms. Viral readings from ELISA in F₁ plants were slightly elevated compared to NL. This study indicates that ZYMV resistance from NL is incompletely dominant. In the field experiment, NL resistance was incorporated into three susceptible local cultivars by means of one or two backcross (BC) generations. Selected BC-F₃ lines of each local cultivar were tested along with NL and susceptible controls in Isabela, Puerto Rico. All seedlings were inoculated with ZYMV, evaluated for symptom severity, ELISA readings and horticultural characteristics. NL remained completely free of symptoms and had low ELISA readings. The severity scores and ELISA readings of F₃ lines were less than those of the corresponding susceptible parent, and usually greater or equal than that of NL. This suggests that the complete resistance seen in NL was not fully incorporated into the F₃ lines. Nevertheless, some lines that combined good horticultural traits along with increased ZYMV resistance were identified.

MOTIVACIÓN

Evolucionar como científico en la agricultura fue una de mis motivaciones al realizar estudios graduados. Esta profesión es una de mucho valor e importancia y faltan personas que estén dispuestos a realizarla, a pesar que dependemos tanto de ella. He aprendido la necesidad que existe de gente preparada y dispuestas a trabajar por el sector agrícola de Puerto Rico con nuevas técnicas que incentiven el interés profesional de la agricultura.

Durante los veranos de 2000-2004 participé como empleado en una finca en el pueblo de Comerío, que perteneció a los agrónomos Sixto y José Ortiz Colón donde tuve la oportunidad de trabajar con cultivos que son susceptibles a enfermedades. En esta experiencia trabajé con cultivos como papaya, calabaza, ají dulce, piña y apio. En la experiencia con estos cultivos aprendí a identificar diversidad de organismos como insectos vectores de virus. Factores ambientales como el calor y la humedad que ayudaban al crecimiento de hongos que afectaron los frutos y por ende disminuyeron la producción. Otra experiencia en el campo agrícola fue durante el verano del año 2006 donde realicé la práctica de agronomía en la compañía Monsanto Caribe. Trabajé con el mejoramiento de la semilla del cultivo del girasol para la producción de aceite.

Por estas razones nació el interés en realizar estudios graduados en el área de fitomejoramiento de cultivos tropicales. Encontrar alternativas viables e innovadoras para mejorar los cultivos haciéndolos resistentes a enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos, insectos, nematodos o condiciones ambientales, como sequías entre otras. Con la eficacia que pueden tener estos cultivos mejorados se revolucionará la agricultura moderna. Esto será de gran ayuda para los agricultores y para la agricultura auto sustentable del país. Una de

mis metas con el estudio del fitomejoramiento es que se pueda lograr disminuir la importación de productos agrícolas a Puerto Rico, incentivando esta práctica.

Mis planes profesionales futuros, ya terminado mis estudios graduados y aprendido nuevas técnicas científicas, es poder aplicar todos estos conocimientos en otros cultivos de importancia en Puerto Rico. Transmitir todo lo aprendido con el objetivo de facilitar el trabajo en conjunto con los agricultores.

AGRADECIMIENTOS

Desde el momento en que terminé mis estudios de bachillerato hubo personas que me apoyaron a que realizara estudios graduados y mientras cursaba estos hubo mucho más personas que sin su apoyo y colaboración hubiese sido imposible desarrollar la investigación y completar el grado; a cada uno de ellos le dedico este proyecto tesis.

Quiero comenzar agradeciendo a la 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 y presentar fuera de la isla en la convención anual de la Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas (ASHS) y participar en conferencias como SOPCA donde pude presentar parte de la investigación. También quiero agradecer a los profesores, Dra. Lydia Rivera, Dr. Feiko Ferwerda y Dr. Jose Carlos Verle 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, Robert A. Mcphail Medina y Obed Román por brindarme su amistad y ayuda siempre que la necesité; a todos mis amigos 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-NIFA-TSTAR Program Award No. 2006-34135-17545 y Award No. 2008-34135-19505, USDA-NIFA-HATCH, PR00421, y la Estación Experimental Agrícola de Puerto Rico.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	II
ABSTRACT	III
MOTIVACIÓN	IV
AGRADECIMIENTOS	VI
TABLA DE CONTENIDO	VII
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 VIRUS EN PLANTAS	4
2.2 ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS EN CUCURBITÁCEAS EN PUERTO RICO	5
2.3 ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS (ZYMV).....	6
2.3.1 Aparición y Distribución	6
2.3.2 Características.....	6
2.3.3 Transmisión	7
2.4 DETECCIÓN DE ENFERMEDADES VIRALES	8
2.5 MANEJO Y CONTROL DE ENFERMEDADES VIRALES.....	10
2.5.1 Prácticas Utilizadas para el Control de Virus.....	10
2.5.2 Cultivares Resistentes a Virus	11
2.6 CALABAZA TROPICAL (<i>CUCURBITA MOSCHATA</i> DUCH.).....	12
2.6.1 Origen, Domesticación y Distribución Mundial.....	12
2.6.2 Descripción y Características de la Planta.....	13
2.6.3 Descripción del Fruto	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 CONSERVACIÓN DEL INOCULO Y TÉCNICA DE INOCULACIÓN DE PLÁNTULAS	15
3.2 EVALUACIÓN DE LOS SÍNTOMAS Y PRESENCIA DEL VIRUS.....	16
3.2.1 Desarrollo de Escala de Severidad	16
3.3 ENSAYO DE HERENCIA	19
3.3.1 Comparación de Parentales y F ₁ (Experimentos 1 y 2).....	19
3.4 PROCEDIMIENTO DE RETROCRUZAMIENTO PARA RESISTENCIA A ZYMV Y DESARROLLO DE FAMILIAS BC:F ₃	20

3.5 NIVEL DE RESISTENCIA A ZYMV Y COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DE FAMILIAS F ₃ . (EXPERIMENTO 3).....	24
4. RESULTADOS	26
4.1 COMPARACIÓN DE PARENTALES Y F ₁ (EXPERIMENTOS 1 Y 2)	26
4.2 NIVEL DE RESISTENCIA A ZYMV Y COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DE FAMILIAS F ₃ PRODUCIDOS DEL PROGRAMA DE RETROCRUZAMIENTO (EXPERIMENTO 3).....	28
5. DISCUSIÓN	43
6. CONCLUSIÓN	47
7. LITERATURA CITADA	48

LISTA DE TABLAS

Tablas	Páginas
Tabla 1. Escala de severidad de síntomas por ZYMV en cultivares tropicales (‘Soler’, ‘Taína Dorada’ y ‘Verde Luz’) de <i>Cucurbita moschata</i>	17
Tabla 2. Medias de absorbancia y severidad en pruebas ELISA para ZYMV en parentales y generaciones F ₁	27
Tabla 3. Medias de severidad y lecturas ELISA (absorbancia a 405nm) de familias F ₃ y sus parentales inoculados con <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> y evaluados en el campo en Isabela, Puerto Rico en 2009.	30
Tabla 4. Contrastes para medias de severidad de líneas F ₃ de retrocruzamiento versus Nigerian Local o su parental recurrente inoculados con <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> y evaluados en el campo en Isabela, Puerto Rico en 2009.	35
Tabla 5. Contrastes para medias de lecturas ELISA (absorbancia a 405nm) de líneas de retrocruzamiento versus Nigerian Local o su parental recurrente inoculados con <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> y evaluados en el campo en Isabela, Puerto Rico en 2009.	35
Tabla 6. Medias de rendimiento (peso) por hectárea, número de frutos por hectárea y peso promedio de frutos de familias F ₃ y sus parentales inoculados con <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> y evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009.	38
Tabla 7. Contrastes para medias en rendimiento de líneas F ₃ versus Nigerian Local o su parental recurrente. Los genotipos fueron evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009.	39
Tabla 8. Contrastes para medias de número de frutos por hectáreas de líneas de retrocruzamiento versus Nigerian Local o su parental recurrente. Los genotipos fueron evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009.	39
Tabla 9. Contrastes para medias de peso de fruto de líneas de retrocruzamiento versus Nigerian Local o su parental recurrente. Los genotipos fueron evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009.	39
Tabla 10. Medias de diámetro y grosor de pulpa del promedio de frutas de familias F ₃ y parentales inoculados con <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> , evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009.	41
Tabla 11. Contrastes para medias de diámetro de frutas en líneas de retrocruzamiento versus Nigerian Local o su parental recurrente. Los genotipos fueron evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009.	42

Tabla 12. Contrastes para medias de grosor de pulpa en frutos de líneas de retrocruzamiento versus Nigerian Local o su parental recurrente. Los genotipos fueron evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009. 42

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Páginas
Figura 1. Síntomas típicos en cada clase de severidad de la enfermedad en plantas de <i>Cucurbita moschata</i> inoculadas con <i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	18
Figura 2. Diagrama de procedimiento de retrocruzamiento para incorporar resistencia a <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV) en tres cultivares de calabaza. Este diagrama muestra solamente una generación de retrocruce (BC ₁), el procedimiento realizado para cultivares Soler (SOL) y Verde Luz (VL). El cultivar Taína Dorada (TD) sufrió dos generaciones de retrocruce (BC ₂). Se evaluó la generación BC ₁ :F ₂ (para SOL y VL) y BC ₂ :F ₂ (para TD) en la Finca Alzamora. Se evaluaron la líneas BC ₁ :F ₃ (SOL y VL) y BC ₂ :F ₃ (TD) en la subestación de Isabela.	23
Figura 3. Asociación entre severidad y lecturas de absorbancia (405nm) de pruebas ELISA en los parentales Nigerian Local (NL) y Soler (SOL) y ocho familias F ₃ (Núm. 14 a 159) derivadas del cruce Soler x Nigerian Local seguido por una generación de retrocruce, todas inoculadas mecánicamente con <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> . Colores representan cada clase de severidad. Lecturas de ELISA menor de 0.20 (línea inferior) se consideran negativos para ZYMV y lecturas mayor de 0.50 (línea superior) se consideran positivos para ZYMV.....	32
Figura 4. Asociación entre severidad y lecturas de absorbancia (405nm) de pruebas ELISA en los parentales Nigerian Local (NL) y Taína Dorada (TD) y ocho familias F ₃ (Núm. 56 a 165, y 97) derivadas del cruce Taína Dorada x Nigerian Local seguido por dos generaciones de retrocruce con Taína Dorada, todas inoculadas mecánicamente con <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> . Colores representan cada clase de severidad. Lecturas de ELISA menor de 0.20 (línea inferior) se consideran negativos para ZYMV y lecturas mayor de 0.50 (línea superior) se consideran positivos para ZYMV.....	33
Figura 5. Asociación entre severidad y lecturas de absorbancia (405nm) de pruebas ELISA en los parentales Nigerian Local (NL) y Verde Luz (VL) y ocho familias F ₃ (Núm. 2 a 155) derivadas del cruce Verde Luz x Nigerian Local seguido por una generación de retrocruce, todas inoculadas mecánicamente con <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> . Colores representan cada clase de severidad. Lecturas de ELISA menor de 0.20 (línea inferior) se consideran negativos para ZYMV y lecturas mayor de 0.50 (línea superior) se consideran positivos para ZYMV.	34

1. INTRODUCCIÓN

La calabaza (*Cucurbita moschata* Duchesne) en Puerto Rico se encuentra entre las hortalizas de mayor importancia económica aportando al ingreso agrícola del país. Para el año fiscal 2006/2007, se produjeron alrededor de 317,829 quintales con un ingreso bruto de 9.2 millones de dólares alcanzando el segundo lugar en la producción de hortalizas, siendo el tomate el primero (Anónimo, 2007).

En el Caribe, Latino América, África y Asia la calabaza es un importante ingrediente en los platos tradicionales (Larsen, 2004). Como vegetal se consumen las frutas, sus tallos tiernos, las hojas y las flores (Gwanama y Nichterlein, 1996). Además su semilla es alta en contenido de vitamina A y proteínas y se utiliza como fuente de aceites. Las semillas se consumen azadas o tostadas (Whitaker y Davis, 1962; Lira-Saade, 1995). Las familias puertorriqueñas utilizan la calabaza en la dieta diaria con arroz y las habichuelas. La calabaza se le añade a las habichuelas preparadas con salsa de tomate para dar firmeza, mejorar el sabor y el color. También la calabaza se utiliza en guisos, sopas, flanes, bizcochos entre otras recetas.

En la calabaza se encuentran una diversidad de enfermedades virales que limitan la producción del cultivo. De los que se han descrito, 36 son de mayor importancia. Entre éstos se incluye el *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Papaya ring spot virus* (PRSV) (sinónimo con *Watermelon mosaic 1 virus*), *Squash mosaic virus* (SqMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) y *Watermelon mosaic 2 virus* (WMV-2) (Lecoq et al., 1998). Los síntomas que pueden ser observados son deformación, mosaicos y daño de las venas, enrizamiento de las hojas así como frutos con abundantes semillas mal formadas y por tal razón reducción en el rendimiento y la calidad del fruto. Una encuesta realizada en Puerto Rico entre 2001-2002 determinó que de un 60

a 70% de las muestras recolectadas con síntomas de mosaico fueron asociadas a la presencia de ZYMV (Paz-Carrasco y Wessel-Beaver, 2002). Entre las cucúrbitas examinadas (pepinillos, melones, sandías, calabacín y calabaza), la calabaza fue la de mayor incidencia con virus. La importancia de investigar las enfermedades virales es que éstas reducen el rendimiento y la calidad de la calabaza (Lecoq et al., 1998). En *C. pepo* (calabacín) el rendimiento puede disminuir en un 100% si el 50% de las plantas sembradas están infectadas por ZYMV antes de la cosecha (Yarden et al. 2000). En Puerto Rico las infecciones tempranas en la calabaza pueden ocasionar la reducción del número de frutas por planta o frutas de características no mercadeables (L. Wessel- Beaver, datos no publicados). Las infecciones tardías durante el ciclo de crecimiento de la planta pueden reducir el vigor de la misma y ocasionar una merma en sus rendimientos. Los objetivos de este estudio fueron realizados debido al impacto negativo que tienen las enfermedades virales sobre el rendimiento en el cultivo de la calabaza y a la importancia que tiene dicho cultivo en distintas regiones del mundo y en especial en Puerto Rico.

El programa de mejoramiento de calabaza de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez (EEA-UPRM) ha desarrollado tres variedades comerciales de amplia distribución, ‘Soler’, ‘Taina Dorada’ y ‘Verde Luz’ (L. Wessel-Beaver, comunicación personal). Los tres genotipos son susceptibles a ZYMV, sin embargo tienen excelentes características hortícolas y aceptación por parte de los agricultores y consumidores.

En el 2005, el programa de mejoramiento de calabaza de EEA-UPRM inició un proyecto de retrocruzamiento bajo la dirección de la Dra. Linda Wessel-Beaver utilizando para mejorar la resistencia de las variedades locales a ZYMV. El padre donante fue ‘Nigerian Local’. Este genotipo fue identificado por Brown et al. (2003) como resistente al ZYMV, conferido por un gen dominante. Los estudios preliminares realizados en el programa de mejoramiento de EEA-

UPR sugieren que la resistencia segrega en las progenies comportándose como dominancia parcial (incompleta), por lo menos al ser incorporada en ciertos genotipos de calabaza.

Hasta la fecha no existe cultivares de *Cucurbita moschata* para producción comercial que posean resistencia genética a ZYMV en Puerto Rico. Los objetivos de esta investigación fueron confirmar la herencia de la resistencia al ZYMV en varios cultivares tropicales e identificar dentro de familias de retrocruzamiento, genotipos F₃ con resistencia al virus y con rendimientos superiores. Estos genotipos podrían ser utilizados en futuros trabajos de resistencia a ZYMV y para la posible liberación de nuevos cultivares, superiores a los existentes.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 VIRUS EN PLANTAS

Los virus son considerados parásitos intracelulares infecciosos y potencialmente patogénicos que están compuestos de nucleoproteínas y son capaces de causar enfermedades en sus huéspedes (Boyer, 1999; Hull 2002; Agrios, 2005). Se pueden multiplicar solo en células vivas y es imposible verlos individualmente en un microscopio óptico. A pesar de su tamaño los virus pueden parasitar y causar enfermedades en casi toda forma de organismo vivo, desde microorganismos unicelulares hasta plantas, animales y humanos. Los virus se encuentran entre el grupo de patógenos más importante y fascinante en la agricultura biológica (Byoung et al., 2005). Se puede suponer que la importancia relativa es menor en enfermedades causadas por virus en comparación con las pérdidas incitados por hongos. Sin embargo, los virus son responsables de mucho más pérdidas económicas que las que se conocen. La razón es porque la naturaleza en que ocurren las pérdidas es muy diferente de las que se le atribuyen a las bacterias y a los hongos (Hadidi et al, 1998). Se conocen más de dos mil virus y aproximadamente una cuarta parte de estos le causan enfermedades a las plantas. Usualmente están compuestos de ácido ribonucleico (RNA) de hebra simple y positiva (RNAss) y en otros casos por ácido desoxirribonucleico (DNA) de hebra simple o doble (Stange, 2006). Aunque los virus que contiene RNA como su genoma son más abundantes y son los de mayor importancia económica (Hari, 1995). La forma o estructura básica de un virus es en forma de bastón o polihedral, sin embargo se puede arreglar en variantes de estas. En esencia el virus es un conjunto de uno o más moléculas de ácido nucleíco encapsulado en una capa o capas de proteínas o lipoproteínas, que es capaz de replicarse solo en la célula huésped adecuada (Matthews, 1991; Agrios 2005).

Sin ayuda los virus de plantas no pueden moverse por sí mismo y tampoco pueden penetrar la cutícula de la planta huésped sana y entrar en las células (Matthews, 1991; Walkey, 1991; Hull 2002). Sin embargo, al ser parásitos obligados, la supervivencia depende de la capacidad de transmitirse de un individuo susceptible a otro con bastante frecuencia. Este problema se supera mediante un vector, el cual puede ser por inoculación mecánica o patógenos de la misma planta (Matthews, 1991; Agrios, 2005).

Luego que el virus se encuentra en la planta comienzan síntomas locales hasta sistémicos. Entre los síntomas más comunes se encuentran reducción en el crecimiento, cambio de color en las hojas como mosaicos y clorosis, necrosis causando muerte en tejidos y alteraciones como enanismos y deformaciones en hojas y frutos (Agrios, 2005). Toda esta sintomatología afecta la fisiología de la planta. Disminuyendo la capacidad fotosintética, la respiración y la capacidad metabólica. Afectando los rendimientos, bajando la producción y por consiguiente causándole grandes pérdidas económicas a la agricultura (Hadidi et al, 1998; Agrios, 2005).

2.2 ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS EN CUCURBITÁCEAS EN PUERTO RICO

En Puerto Rico se han realizado pocos trabajos en enfermedades causados por virus en *Cucúrbitas*. Hasta 1963, solo tres virus, CMV, PRSV-W (sinónimo con *Watermelon mosaic 1 potyvirus*), y SqMV se habían identificado en la isla (Pérez, 1963). En 1982 se encontró ZYMV en Puerto Rico infectando melones tipo “Honeydew” (*Cucumis melo*) (Escudero, 1992). En estudios realizados entre los años 1982 y 1991 en terrenos de la estación experimental y en fincas comerciales de la costa sur de Puerto Rico hubo una alta incidencia de los virus PRSV-W, ZYMV y WMV-2 y se reportaron pérdidas de un 30% a 40%. En abril de 1989, ZYMV y WMV-2 causaron pérdidas en más de 200 acres en el cultivo de melones “Honeydew” en la costa sur de

Puerto Rico resultando una pérdida económica de aproximadamente un millón de dólares. Un estudio de la incidencia de los virus de cucurbitáceas en Puerto Rico y la Florida se llevó a cabo desde 2000 hasta 2003 (Paz-Carrasco y Wessel-Beaver, 2002; datos no publicados de L. Wessel-Beaver y S.E. Webb). Esta encuesta se inició porque los investigadores estaban observando en cucurbitáceas un problema creciente de enfermedades de virus del mosaico en las zonas. Las muestras recolectadas en Puerto Rico más del 70% de resultó positiva a uno de dos virus: PRSV o ZYMV. Entre las cucurbitáceas estudiadas (pepinos, sandías y melones, calabacín y la calabaza tropical), la calabaza tropical tuvo la mayor incidencia de virus. PRSV y ZYMV también fueron importantes entre las enfermedades virales que afectan las cucurbitáceas en la Florida.

2.3 ZUCCHINI YELLOW MOSAIC VIRUS (ZYMV)

2.3.1 Aparición y Distribución

ZYMV es un virus que se dispersó rápidamente. Sus primeras infecciones ocurrieron a principios de 1980 en Italia y Francia (Lecoq et al., 1981; Lisa et al., 1981). En el Caribe se detectó un tiempo más tarde. Fue identificado en Venezuela en 1989 (Hernández et al., 1989), en Martinica en 1992 (Desbiez y Lecoq, 1999) y probablemente esté afectando a nivel mundial (Agrios, 2005). El número de esfuerzos realizados para describir y diferenciar a ZYMV son varios ya que los síntomas que se observan en las cucúrbitas son distintos (Lecoq et al., 1998). En el cultivo de la calabaza ZYMV induce mosaico severo y deformación de las hojas y los frutos (Lisa y Lecoq, 1984; Provvidenti, et al., 1984). Las hojas afectadas a veces se marchitan y mueren.

2.3.2 Características

Zucchini yellow mosaic virus pertenece al género *Potivirus*. Al pertenecer a este género es transmitido por áfidos de manera no persistente y mecánicamente, no se transmite por semilla.

Las partículas de ZYMV tienen un tamaño aproximado entre 680-900nm de longitud x 12nm de ancho y contiene un genoma único de ssRNA (Hari, 1995, Astier et al., 2006). Se ha observado cuando hay infecciones combinadas con otros virus como CMV, los síntomas inducidos son más severos (Lecoq et al. 1981). ZYMV es indudablemente de los principales virus emergentes en las cucurbitáceas. En poco más de 20 años, este virus ha invadido las principales zonas de producción en el mundo y causado daños considerables (Astier et al., 2006).

2.3.3 Transmisión

Los virus son transmitidos de planta a planta y de otras maneras para su supervivencia. Entre estas se encuentra la diversidad de estrategias de transmisión por vectores como los insectos, nematodos, hongos y ácaros los cuales pueden causar heridas y transmitir el virus. Además se conocen otras formas de transmisión como son las heridas en la planta, el polen, las semillas y la propagación vegetativa. Los insectos con aparato de alimentación del tipo perforador chupador, es el vector más frecuente y económicamente más importante (Agrios, 2005; Blanc et al., 2011). Los insectos vectores más comunes pertenecen al orden Hemíptero (Murant et al., 1988 citado por Nagy Falk, 2006). Estos transmiten el 80% de los virus por insectos, que representa más de 400 especies de virus dentro de 39 géneros diferentes (Ferreira y Moreno, 2009). El 50% de los artrópodos que transmiten virus son áfidos y sobre 200 especies han sido identificadas y probadas como vectores (Brunt et al., 1996; Nault, 1997; Hull, 2002).

La mayoría de los virus pertenecientes al grupo de los potivirus son transmitidos por áfidos. La transmisión viral tiene diferencias respecto a la modalidad en cuanto a la absorción del virus cuando es ingerido por el vector. Estas diferencias se centran en el tiempo o duración del virus en el vector, el lugar donde es retenido y la ruta dentro del vector. De estos factores será cuan efectiva es la transmisión, puede ser de manera no circulativa o circulativa. La transmisión

no circulativa se divide entre no persistente y semi-persistente (Ng y Perry, 2004). El tiempo de transmisión de los virus no persistentes se caracteriza por el corto tiempo viable de la inoculación que es de minutos a segundos (Pirone y Perry, 2002). Usualmente son aproximadamente 30 minutos luego de adquirido pero mayormente es menor a 5 minutos. Los virus transmitidos de manera semi-persistente, la viabilidad de estos puede durar varios días después de adquirido pero usualmente el tiempo es de pocos días a horas. La forma de transmisión circulatoria de los virus o mejor conocida como persistente, es cuando el virus permanece en el vector de manera prolongada (Ng y Perry, 2004), donde se han descrito que la viabilidad de transmisión puede durar días, semanas hasta meses.

2.4 DETECCIÓN DE ENFERMEDADES VIRALES

Los métodos para la detección y la identificación de enfermedades virales juegan un papel muy importante en el manejo de la enfermedad. Hay distintas técnicas de diagnóstico como la caracterización de síntomas visuales (sintomatología) en la planta huésped, las pruebas de transmisión como los son la inoculación mecánica y por vectores además de los injertos y la microscopia óptica (Hull, 2002; Agrios, 2005). Sin embargo, hay métodos mucho más específicos y precisos pero estos son usados como primera opción ya que nos dan una idea preliminar en el diagnóstico y cuál de los patógenos de plantas puede estar causando la enfermedad.

Los síntomas en las plantas comúnmente se utilizan para caracterizar y es una práctica muy utilizada para la detección de enfermedades virales y de esta forma diagnosticar para controlar la enfermedad. La inspección visual es relativamente fácil cuando los síntomas son claramente característicos y específicos de la enfermedad. Por otro lado, hay muchos factores

como la cepa del virus, la planta hospedera, el tiempo de infección y el medio ambiente que pueden influir sobre los síntomas presentados (Matthews, 1991). Las plantas pueden presentar síntomas similares a los virus como respuesta a factores bióticos como abióticos. Además, los virus pueden producir síntomas similares a diferentes cepas de un virus y causar síntomas distintos en el mismo huésped. Aun así los síntomas proporcionan información importante para la detección de enfermedades virales. En general, es necesario que cuando se inspecciona de manera visual los síntomas en el campo se realice en conjunto con otras pruebas para así asegurar un diagnóstico preciso de la infección del virus ya que pueden ocurrir infecciones asintomáticas (Bock, 1982). Aquí es donde es necesario utilizar pruebas para detección más precisas, aunque más costosas.

Las pruebas más utilizadas para la detección de virus actualmente son las pruebas ELISA y sus variantes. Es un este método confiable, adaptable, sensible, fácil y sobre todo se pueden probar un gran número de muestras en un tiempo relativamente corto (Clark y Bar-Joseph, 1984; Cooper y Edwards, 1986; Van Regenmortel y Dubs, 1993). Tres de las variantes son el ELISA “indirecta”, ELISA-Triple Antibody Sandwich (TAS) y ELISA-Double Antibody Sandwich (DAS). En la indirecta no se utiliza conjugados específicos para el virus, sino anticuerpos obtenidos contra inmunoglobulinas de animales (conejos, entre otros) utilizado para obtener los anticuerpos específicos del virus. La variante TAS requiere dos anticuerpos virales de animales distintos donde se complica más el proceso de obtener el anticuerpo en comparación con las otras pruebas. En la variante ELISA-(DAS), se coloca un anticuerpo en una placa seguido por la muestra de savia y luego el conjugado enzimático del virus a estudiar, este es capturado mediante una tercera incubación y seguido se utiliza un reactivo el cual le da color a muestras con el virus. Después de obtener estos resultados es muy importante determinar cuáles son las muestras que se

consideraran positivas y negativas (Tijssen, 1985). Para determinar esto es fundamental la utilización de controles positivos y negativos en cada ensayo. En general una muestra puede ser considerada positiva si el valor de absorbancia es dos o tres veces mayor que la media de la absorbancia de los controles negativos. También se puede considerar positivo cuando se obtiene más dos o tres veces la desviación estándar.

Además de las pruebas serológicas ELISA existen otras pruebas mediante la detección de los ácidos nucleicos (análisis de RNAs bicatenarios, hibridación con sondas de cDNA o cRNA) y las técnicas de RT-PCR (transcripción en reversa y reacción en cadena de polimerasa).

2.5 MANEJO Y CONTROL DE ENFERMEDADES VIRALES

Los métodos utilizados para controlar enfermedades virales difieren de los que se practican para el control de enfermedades causadas por hongos y bacterias. Las enfermedades virales comúnmente se combaten mediante la utilización de prácticas culturales, el control de los vectores y la resistencia genética (Kyle, 1993; Agrios, 2005).

2.5.1 Prácticas Utilizadas para el Control de Virus

Algunas enfermedades o plagas de cultivos se controlan mediante el uso de métodos con efecto directo combatiendo estas inmediatamente, pero en el caso del control de virus en plantas todavía no existe un método directo y menos un control químico. Como no existe este método, se usan maneras indirectas, controlando los agentes vectores de virus, la identificación de posibles huéspedes para ser eliminados y el uso de variedades de plantas que sean resistentes genéticamente (Kyle, 1993; Hull, 2002; Agrios, 2005). Se conoce que los virus necesitan de un vector para llegar a las plantas, y entre los vectores más comunes se encuentran los insectos, por esta razón la manera indirecta de controlarlos es utilizando productos químicos (insecticidas) o

biológicos. Los beneficios de estos insecticidas son la reducción del número de individuos capaces de adquirir el virus y que luego estos lo transmitan a otras plantas, por tal razón al reducir estas poblaciones se disminuye la proliferación de la enfermedad en el campo. Aunque tienen estos beneficios, el valor de estos productos es alto aumentando el costo de producción. Su uso efectivo requiere conocer bien los vectores presentes ya que el impacto dependerá de las características de transmisión del virus. Por esta razón para que el control de los virus en plantas sea efectivo se debe comenzar con la combinación y el uso de las distintas prácticas culturales. Llevar a cabo en el campo buenas prácticas culturales, además de efectivas, puede disminuir los costos de producción. Entre las numerosas prácticas se encuentran: (i) explorar y extraer plantas sintomáticas o malezas que pueden servir como reservorios de determinados virus, (ii) utilización de material propagativo certificado libre de enfermedades, (iii) herramientas limpias y estériles, (iv) aislamiento geográfico de cultivos que sirvan de hospederos y la rotación cultivos no relacionados y (v) hacer lo posible de evitar las épocas donde los niveles de las poblaciones de los vectores son más altas. Algunos virus pueden ser controlados exponiendo las plantas a altas temperaturas (Agrios, 2005). Otras de las medidas para controlar la incidencia de los virus son las reglamentaciones del uso de cuarentenas y así se evita la entrada de enfermedades virales que no se encuentran en esas localidades (Matthews, 1991).

2.5.2 Cultivares Resistentes a Virus

En estudios realizados a especies salvajes de *Cucurbita* se encontró resistencia a varias enfermedades virales (Provvidenti et al., 1978). El virus *Zucchini yellow mosaic* se encuentra entre las enfermedades más destructivas que afectan el género de las cucúrbitas incluyendo el calabacín y las calabazas. Provvidenti et al., 1984 identificaron entre las especies de *Cucurbita moschata* el cultivar ‘Nigerian Local’ con resistencia. Munger y Provvidenti (1987) observaron

que los cruces F₁ de ‘Nigerian Local’ x ‘Waltham’ mostraron síntomas claros de ZYMV, pero mucho menos grave que los de la población susceptible de ‘Waltham’. Utilizaron tres clases fenotípicas: resistentes homocigotos (con ligero moteado de las hojas viejas, hojas jóvenes sin síntomas), heterocigotos resistente (definidas con manchas en las hojas jóvenes, atrofiado leve) y susceptibles (manchas fuertes y atrofiado). Resistente a ZYMV también se ha identificado en otro genotipo de *C. moschata* ‘Menina’. Este genotipo ha sido utilizado por varias investigaciones a la resistencia a incorporarse a *C. pepo* (Paris et al., 2000), así como para la realización de estudios de la herencia en *C. moschata*. París et al. (1988) realizaron estudios utilizando sólo dos clases fenotípicas: resistentes y susceptibles. Ellos llegaron a la conclusión de que la resistencia al ZYMV de ‘Menina’ es completamente dominante y se le designó el gen *Zym*. Estudios confirman que ‘Nigerian Local’ también es fuente de genes de resistencia para PRSV, WMV y CMV y que ésta resistencia es controlada por un gen (Brown et al., 2003). Sin embargo Pachner y Lelley (2004) indicaron que al menos hay cinco genes para resistencia a ZYMV.

2.6 CALABAZA TROPICAL (*CUCURBITA MOSCHATA* DUCH.)

2.6.1 Origen, Domesticación y Distribución Mundial

La familia de las cucurbitáceas se compone de aproximadamente 118 géneros y 825 especies de los cuales solamente 11 de estos géneros son cultivados en el mundo (Molly, 1993, Lira Saade, 1995). El origen del género *Cucurbita* es de América, y las principales especies cultivadas tienen su centro de origen en diferentes lugares del continente americano. Estudios sugieren que el centro de domesticación de *Cucurbita moschata* es el área costera del norte de América del Sur en el país de Colombia ya por que se han observado una mayor diversidad además de características muy primitivas en la calabaza tropical en esta área (Nee, 1990; Wessel-

Beaver, 2000; Sanjur et al., 2002). Restos arqueológicos de las áreas costeras de Perú y el sur de México tienen edades de aproximadamente entre 5,000 y 7,000 años antes del presente (AP) (Decker-Walters y Walters, 2000). Se puede especular que este cultivo se propagó por el continente, aproximadamente 3,400 años AP en el norte de México y en el oeste de los Estados Unidos alrededor de 900 años AP. Para finales del siglo 17, un siglo más tarde de que los exploradores españoles llegaron a las Américas se cree que este cultivo se comenzó a sembrar en Europa (Paris, 2000). Este atraso pudo ser a causa de la pobre adaptación de esta especie a las condiciones climáticas templadas y geográficas como altitudes medianas y altas. En cuanto África en el siglo 19, esta especie se estableció como cultivo de consumo (Decker-Walters y Walters, 2000). Sin embargo, desde el comienzo de su origen, domesticación y diseminación por el mundo, se sigue reportado diversificación morfológica como genética en esta especie, siendo las regiones de mayor variación las regiones subtropicales y tropicales (Paris, 2000). Entre esa gama de diferencias también existen especies cultivadas del género *Cucurbita* que tienen un parecido en cuanto a la forma de la planta y sus frutos. Estas son *C. moschata*, *C. pepo*, *C. maxima*, *C. argyrosperma* y *C. ficifolia*. De estas cinco especies la que se cultiva más extensivamente en la isla de Puerto Rico es *C. moschata*.

2.6.2 Descripción y Características de la Planta

Las plantas de *C. moschata* son anuales, herbáceas, comúnmente rastreras, trepadoras y en algunos casos semi-arbustivas (Lira Saade, 1995). *C. moschata* es tolerante a altas temperaturas y requiere un pH de suelo entre 5.5 a 6.8. Su sistema radicular está constituido por una raíz principal y algunas raíces secundarias que poseen los pelos absorbentes. Las hojas se encuentran sobre pecíolos presentando frecuentemente manchas blancas entre las venas. La corola de las flores estaminadas varía de color de amarilla a anaranjada. Las flores pistiladas

poseen el ovario que puede ser de diversas formas (globoso, ovoide, cilíndrico, entre otras forma). El tallo es largo, rastrero y posee entrenudos largos, vellosos, herbáceos, sólidos cuando son jóvenes y huecos al madurarse (Kirchener-Salina, et al., 1981). En cultivares tradicionales de bejuco largo como ‘Soler’ (Wessel-Beaver, 2005), que generalmente es cultivada en la isla, se ha encontrado que las flores estaminadas tienden a aparecer entre los 45 a 50 días y las flores pistiladas entre los 48 a 54 días después de la siembra (Maynard et al., 1992, Anónimo, 1998). Sin embargo, en cultivares compactos aparecen entre 40 a 41 días después de la siembra.

2.6.3 Descripción del Fruto

Los frutos de *C. moschata* son variables en cuanto a tamaño, forma y color (Andrews et al., 1967). En cultivares tradicionales, los frutos se producen a lo largo del bejuco a una distancia de hasta 50 pies de la base de la planta, variando su forma, desde achatada en genotipos como ‘Soler’ y ‘Borinquen’, hasta redondeadas como en variedades como ‘La Segunda’ y ‘La Primera’ (Maynard et al., 1992, Anónimo, 1998). Comúnmente pueden producir de dos a cinco frutos y el rendimiento por la planta fluctúa desde cinco a cincuenta libras. Los bejucos en estos cultivares tradicionales tienden a ser largos, de crecimiento vigoroso, agresivo y rápido. Se observó que plantas tradicionales pueden alcanzar un rendimiento en producción de hasta un 56% más que en cultivares compactos (Irizarry, 1994). Se encontraron que cultivares compactos producen mayor número de frutos, el rendimiento en peso promedio es menor y los mismos pueden alcanzar un peso aproximado de hasta 1.58 kilogramos o menos y puede tener diversas formas (Maynard et al., 1992).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo en facilidades de laboratorios, invernaderos y equipos de la Facultad de Ciencias Agrícolas y la Estación Experimental Agrícola (EEA) de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez (UPRM). Los experimentos de campo fueron realizados en las Fincas Laboratorio Alzamora y en la subestación de Isabela de la EEA.

3.1 CONSERVACIÓN DEL INOCULO Y TÉCNICA DE INOCULACIÓN DE PLÁNTULAS

El aislado (No. 239) de ZYMV con que se realizaron las inoculaciones se obtuvo del Dr. Jose Carlos Verle Rodrigues (Estación Experimental Agrícola de Rio Piedras), mediante la recolección de plantas enfermas que mostraban síntomas típicos de la enfermedad. En este estudio aparte de esta investigación de tesis, muestras recolectadas fueron caracterizadas mediante ensayos serológicos (pruebas ELISA-Agdia, Elkhart, Indiana) y moleculares (transcripción en reversa-reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR)). Para la investigación actual se mantuvo la cepa (núm. 239) viva en plantas ‘Waltham’, genotipo perteneciente a la especie de *C. moschata*. Este mismo cultivar fue utilizado por Brown et al. (2003) en estudios de herencia. También se conservó inculo en el refrigerador a -4°C.

La técnica para la inoculación mecánica de las plantas fue siguiendo los protocolos utilizados previamente por Langham (2003). Se recolectó material infectado con ZYMV y se maceró el tejido en un mortero (previamente congelado) con solución amortiguadora de fosfato (buffer) con pH de 7.0 a temperatura de 4°C, y a una concentración 1:10 (1 gramo de tejido por 10 ml de buffer de extracción). Se aplicó carborundum (abrasivo para crear pequeñas heridas) en los cotiledones y con una gasa de tela se cogió el macerado y se frotó suave en los cotiledones.

Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero en iluminación natural y/o en laboratorio con iluminación artificial.

3.2 EVALUACIÓN DE LOS SÍNTOMAS Y PRESENCIA DEL VIRUS

3.2.1 Desarrollo de Escala de Severidad

Se realizó un experimento preliminar para desarrollar un sistema de evaluación de síntomas visuales. Se inoculó una muestra de plantas de varias poblaciones F₁ derivadas de cruces entre ‘Nigerian Local’ (resistente a ZYMV) y ‘Taína Dorada’, ‘Verde Luz’, ‘Soler’ y ‘Waltham’. Se obtuvo semilla de ‘Nigerian Local’ del Dr. R. R. Provvidenti (New York Agricultural Experiment Station y Cornell University, Geneva, New York) ‘Nigerian Local’ bajo el programa de mejoramiento se le realizaron dos generaciones de autopolinización para así mantener homocigosidad genética. ‘Taína Dorada’, ‘Verde Luz’ y ‘Soler’ son cultivares de polinización abierta liberados del programa de fitomejoramiento de la Estación Experimental Agrícola, UPR, Mayagüez y son susceptibles a ZYMV. Las semillas de ‘Waltham’ se adquirieron mediante Willhite Seed Inc. (Poolville, Texas). Este cultivarse desarrolló para zonas templadas y es muy susceptible a ZYMV. Fue utilizado como el genotipo susceptible en varios estudios previos (Brown et al., 2003; Pachner y Lelley, 2004).

Se tomaron fotografías de los síntomas típicos (Figura 1) y se utilizaron estas para desarrollar la escala de severidad (Tabla 1).

Tabla 1. Escala de severidad de síntomas por ZYMV 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 ZYMV	Clase de severidad
	0
	1
	2
	3

Figura 1. Síntomas típicos en cada clase de severidad de la enfermedad en plantas de *Cucurbita moschata* inoculadas con *Zucchini yellow mosaic virus*.

3.3 ENSAYO DE HERENCIA

3.3.1 Comparación de Parentales y F₁ (Experimentos 1 y 2)

En el invernadero se sembraron entre 5 a 7 semillas de (i) los parentales susceptibles ‘Soler’, ‘Taína Dorada’, ‘Verde Luz’ y ‘Waltham’, (ii) el parental resistente ‘Nigerian Local’ y (iii) entre 7 y 10 semillas de las poblaciones F₁ de ‘Soler’ x ‘Nigerian Local’, ‘Taína Dorada’ x ‘Nigerian Local’, ‘Verde Luz’ x ‘Nigerian Local’ y ‘Waltham’ x ‘Nigerian Local’ en tiestos de 8cm x 8cm x 9cm utilizando substrato Premier Pro-Mix, BX[®] (Premier Hort. Inc., Quakertown, PA). Diez días después de la siembra y germinadas las semillas, se inocularon las plántulas con ZYMV en los cotiledones cuando estas ya comenzaban a mostrar su primera hoja verdadera. Estas inoculaciones se realizaron en todos los parentales y las F₁ dejando 2 plantas control que fueron inoculadas solo con solución amortiguadora (buffer). Los tiestos fueron colocados en el invernadero en un diseño completamente aleatorizado A los 9 días después de la inoculación se comenzó a coleccionar datos visuales cada tres o cuatro días por tres semanas (21 días) en cada hoja expandida presente.

Se recolectó tejido fresco de la cuarta hoja en los materiales experimentales, para confirmar que los síntomas observados fueron causados por ZYMV. Se realizaron pruebas serológicas DAS-ELISA utilizando “kits” comerciales de Agdia[®] (Elkhart, Indiana). Los kits incluyen anticuerpos, conjugados y soluciones amortiguadoras, y se siguieron los protocolos del fabricante. Se coleccionaron muestras en bolsas plásticas pequeñas con 1 ml de solución de extracción y se maceró el tejido con un rolo de bolines hasta tener una mezcla bastante homogénea (sabia). Se realizaban varios pasos los cuales incluían una serie (4) de incubaciones: (1) se le echaba el anticuerpo a la placa poliestireno por un tiempo de cuatro horas. (2) De la bolsa de tejido se extrajo 100 µl de sabia y se colocaban en los huecos de las placas por. Dos

horas, (3) se le aplicaba el conjugado dos horas más y (4) la incubación de una hora con la solución del sustrato PNP (*p*-nitrophenol), y lavados entre cada incubación, estos pasos se realizaban con cada placa. Las placas se leyeron con un espectrofotómetro (DIAS Microplate Reader, Dynex Technologies, Chantilly, Virginia) ajustado a 405 nanómetros de absorbancia de luz (A405nm). Estas lecturas de ELISA (absorbancia 405nm) fueron examinados en un análisis de varianza. Se compararon medias de los parentales y sus F₁. Se realizaron dos repeticiones de este experimento (designados “Experimento 1” y “Experimento 2”).

3.4 PROCEDIMIENTO DE RETROCRUZAMIENTO PARA RESISTENCIA A ZYMV Y DESARROLLO DE FAMILIAS BC:F₃

El programa de mejoramiento de calabaza de la EEA-UPRM inició un programa de retrocruzamiento (BC para sus siglas (*backcross o backcrossing*) en inglés) en el año 2005, utilizando como fuente del gen *Zym* ‘Nigerian Local’. Empecé mi participación en este programa en marzo 2007 con el objetivo de desarrollar materiales para esta investigación de tesis. Se realizaron cruces entre ‘Nigerian Local’ y tres cultivares desarrollados por el programa de mejoramiento de calabaza de la UPR: ‘Soler’, ‘Verde Luz’ y ‘Taína Dorada’. ‘Soler’ es un cultivar tradicional de tallo largo (Wessel-Beaver, 2005). ‘Verde Luz’ es derivada de ‘Soler’ con frutos más pequeños y pulpa más anaranjada (Wessel-Beaver et al., 2006, donde la designación experimental de ‘Verde Luz’ es PRLongvineSLR). ‘Taína Dorada’ es una línea mejorada con crecimiento semiarbusivo y excelente calidad de fruta (Wessel-Beaver et al., 2006), donde la designación experimental de ‘Taína Dorada’ es PRShortvine-1). A pesar de la falta de resistencia a ZYMV en estos genotipos, ellos presentan excelentes características hortícolas. Se realizó una generación de retrocruzamiento con ‘Soler’ y ‘Verde Luz’ y dos generaciones de retrocruzamiento con ‘Taína Dorada’ (Figura 1). La semilla de una (BC₁:F₁ – cultivares Soler y

Verde Luz) o dos ($BC_2:F_1$ – cultivar Taína Dorada) generaciones de retrocruce fue sembrada en el invernadero y las plántulas fueron inoculadas con ZYMV. Se trasplantaron plantas resistentes a ZYMV a la Finca Alzamora en junio 2008. Se realizaron todas las autopolinizaciones posibles de las plantas $BC_2:F_1$ generando la población $BC_2:F_2$. También se sembraron los parentales de ‘Soler’, ‘Verde Luz’ y generaciones $BC_1:F_1$ de cada uno. Se siguió el mismo procedimiento utilizado para ‘Taina Dorada’ pero generando poblaciones $BC_1:F_2$ (una generación de retrocruce).

Las tres poblaciones F_2 producidas mediante retrocruces ($BC_1:F_2$ para cultivares Soler y Verde Luz y $BC_2:F_2$ para cultivar Taína Dorada) fueron seleccionadas para la evaluación en la Finca Alzamora en el campus del RUM. Las semillas fueron sembradas en tiestos 8cm x 8cm x 9cm llenos de sustrato Premier Pro-Mix, BX® (Premier Hort. Inc., Quakertown, PA) y se mantuvieron en invernadero. A los 13 días después de la siembra se inocularon cotiledones y primera hoja verdadera usando inóculo seco congelado a una relación de 25ml de solución amortiguadora “buffer” de extracción por 0.3g tejido seco. Las plantas fueron observadas semanalmente para severidad de síntomas. Para cada genotipo (‘Soler’, ‘Verde Luz’ y ‘Taina Dorada’) se seleccionaron tres poblaciones F_2 superiores (las que no mostraron síntomas o que mostraron síntomas visuales leves fueron trasplantadas en la finca laboratorio Alzamora). De cada uno de las poblaciones F_2 (nueve poblaciones F_2 en total) a los 35 días después de la siembra se trasplantaron de 54 a 58 plantas en la Finca Alzamora. Estas se colocaron en bancos cubiertos con plástico a una distancia de 3 metros entre plantas y 1.5 entre hileras. Las plantas fueron abonadas dos veces con abono 10-10-10, el agua que se le proveyó era por goteo cuando era necesario. El control de malezas se realizó con herbicida (Round-UP) y podadora manual (trimmer). Las plantas eran evaluadas semanalmente para severidad de síntomas. A los 10 y 30

días después de trasplantadas se recolectó tejido fresco de todas las plantas y se realizaron pruebas serológicas (DAS-ELISA) específicas para ZYMV y PRSV. De esta forma se aseguró que los síntomas observados en las plantas eran causados solo por ZYMV. Se autopolinizaron las plantas superiores para producir familias F₃. En la selección de plantas F₂ se consideraron vigor general de la planta, forma y tamaño de la fruta, grosor y color de la pulpa.

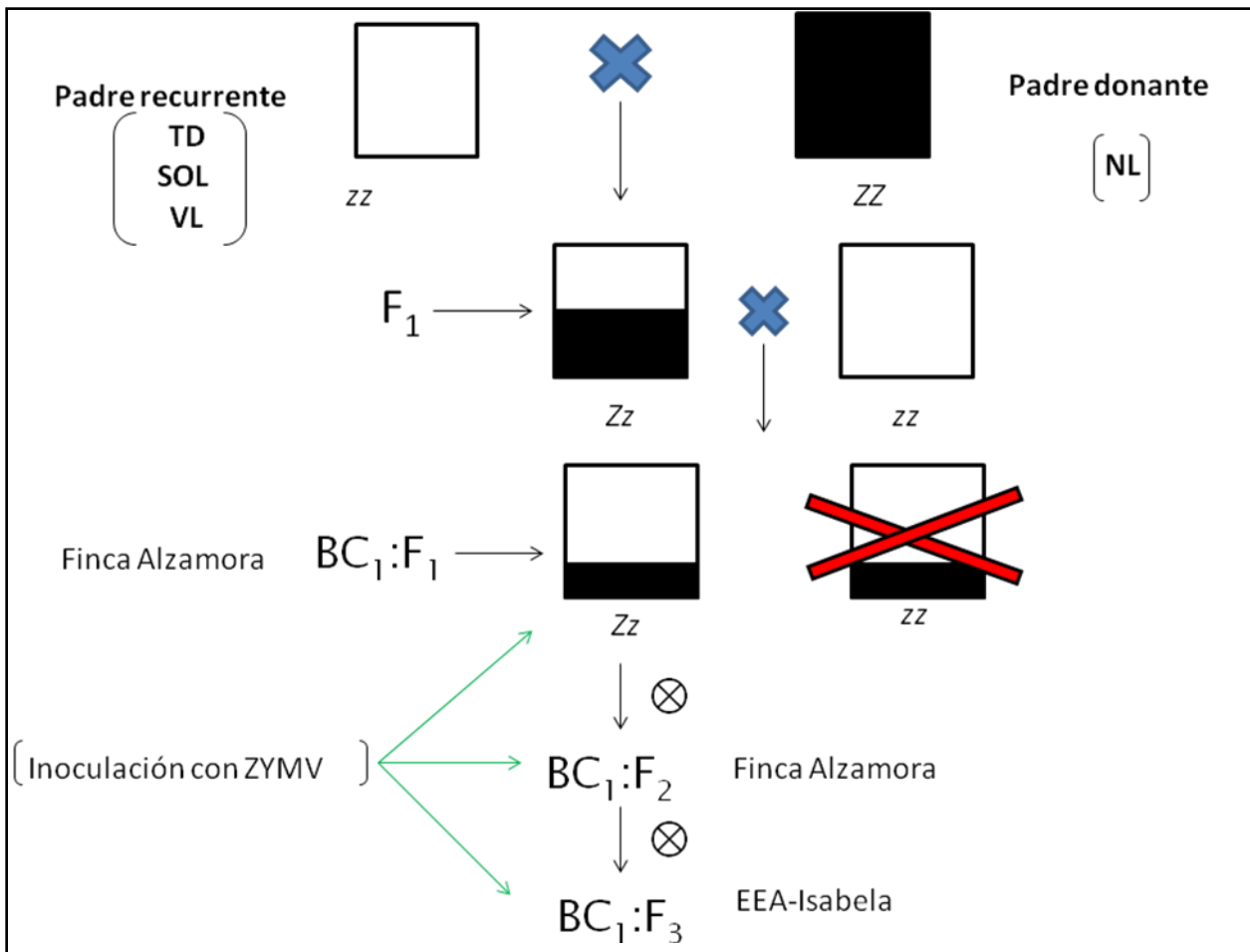


Figura 2. Diagrama de procedimiento de retrocruzamiento para incorporar resistencia a *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) en tres cultivares de calabaza. Este diagrama muestra solamente una generación de retrocruce (BC₁), el procedimiento realizado para cultivares Soler (SOL) y Verde Luz (VL). El cultivar Taína Dorada (TD) sufrió dos generaciones de retrocruce (BC₂). Se evaluó la generación BC₁:F₂ (para SOL y VL) y BC₂:F₂ (para TD) en la Finca Alzamora. Se evaluaron la líneas BC₁:F₃ (SOL y VL) y BC₂:F₃ (TD) en la subestación de Isabela.

BC = “backcross” (retrocruce), ⊗ = autopolinización, Z = *Zym* (gen dominante para resistencia a ZYMV); z = *zym* (gen recesivo para susceptibilidad a ZYMV). TD = Taína Dorada, SOL = Soler, VL = Verde Luz, NL = Nigerian Local.

3.5 NIVEL DE RESISTENCIA A ZYMV Y COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DE FAMILIAS F₃. (EXPERIMENTO 3)

En la subestación de EEA-UPR localizada en Isabela se realizó un ensayo de campo de las familias F₃. Se evaluó ocho familias de cada población, derivadas de retrocruces con ‘Soler’, ‘Verde Luz’, y ‘Taína Dorada’.

Se estableció el semillero en los invernaderos de la Universidad de Puerto Rico, sembrando de 10 a 16 plantas de cada una de las 24 familias F₃ seleccionadas, los parentales susceptibles (‘Soler’, ‘Taína Dorada’ y ‘Verde Luz’) y el parental resistente ‘Nigerian Local’, un total de 28 tratamientos en el ensayo. Por falta de semilla sólo se sembraron 10 plantas de la línea VL-32. Las semillas fueron plantadas en tiestos 8cm x 8cm x 9cm llenos de sustrato Premier Pro-Mix, BX® (Premier Hort. Inc., Quakertown, PA). Todas las plantas fueron inoculadas con el virus ZYMV cuando las plántulas tenían siete días de sembradas. Luego fueron transportadas hasta la EEA-Isabela donde fueron trasplantadas 11 días después de inoculadas. Se arregló los genotipos en un diseño de bloques completos aleatorizados con dos replicaciones. El tamaño de las parcelas en los bloques fue de 14.6m con 5 ó 8 plantas en un solo surco. La distancia de siembra de las plantas fue de 1.8m entre plantas dentro de hileras y 4.6m entre hileras. Se recolectaron datos visuales de síntomas a plantas individuales dentro de cada parcela a los 26, 33 y 46 días después de la inoculación. Los síntomas se clasificaron de acuerdo al tipo grado de severidad (Figura 1 y Tabla 1). A los 52 días después de la inoculación se tomó tejido fresco de todas las plantas de cada parcela y se realizaron pruebas serológicas (DAS-ELISA) específicas para ZYMV. Absorbancias de ≤ 0.200 se consideraron lecturas negativas para ZYMV. Valores de absorbancia ≥ 0.500 se consideraron positivos para ZYMV. Valores mayores de 0.200 y menores de 0.500 son no conclusivos. Los datos obtenidos de estas pruebas fueron utilizados para medir resistencia al virus. La resistencia se evaluó de dos maneras distintas:

severidad y absorbancia mediante la prueba DAS-ELISA. Para cada parcela se determinaron las siguientes características agronómicas: (1) número de fruto (2) rendimiento de fruto (peso total) y (3) peso promedio por fruto, y la cantidad de frutas por hectárea de cada familia se obtuvo mediante el peso total y la cantidad de frutos, convirtiendo la distancia de hilera a hectárea. Para evaluar la forma y la calidad de los frutos se picaron varias frutas longitudinalmente. Se le tomaron fotografías para determinar el largo y diámetro de los frutos, y el grosor de la pulpa usando una regla de 30.5cm que apareció en cada fotografía. Todos los datos fueron analizados usando análisis de varianza (ANOVA). Se compararon medias usando la prueba de Tukey y contrastes de un solo grado de libertad.

4. RESULTADOS

4.1 COMPARACIÓN DE PARENTALES Y F₁ (EXPERIMENTOS 1 Y 2)

Los síntomas de las plantas infectadas con *Zucchini yellow mosaic virus* comenzaron a ser visibles desde la primera o segunda hoja en adelante. Se pudo observar variación en el tipo y severidad de síntomas entre y dentro de cada población. Los síntomas comunes observados en las 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 DAS-ELISA como parte de la evaluación de síntomas, se observó que a mayor severidad del síntoma en la hoja muestreada para la prueba, en general mayor fue el valor de absorbancia resultante.

El cultivar ‘Nigerian Local’ siempre se mantuvo libre de síntomas y con valores de absorbancia menores de 0.23 (Tabla 2), un valor que se considera como negativo para la presencia de virus. Durante este experimento se observó valores de absorbancia de 0.25 o menos para el control negativo y el “buffer” (solución amortiguadora). Las reacciones de los parentales susceptibles (‘Soler’, Taína Dorada’, ‘Verde Luz’ y ‘Waltham’) en general siempre fueron similares entre ellos. Estos nunca estuvieron libres de síntomas y en cada hoja nueva la severidad de los síntomas aumentaba y exhibieron altas lecturas DAS-LISA (positivas a ZYMV). En los experimentos 1 y 2 las valores de absorbancia para DAS-ELISA en los parentales susceptibles fueron lecturas mayores de 0.44 hasta 0.85 (Tabla 2). En el experimento 1 para Taína Dorada las lecturas de absorbancia fueron las más bajas con 0.44 y Verde Luz obtuvo los valores más altos con 0.79. Para el experimento 2 los resultados de absorbancia para los parentales no mostraron diferencia en los valores que estuvieron en el rango de 0.76 y 0.85 (Tabla 2).

Las poblaciones F₁ aunque en la mayoría de las ocasiones mostraban síntomas, el tipo de estos eran de leves a moderados y severidad de (0 y 1). Contrario a los parentales, los síntomas de estas poblaciones disminuían en las hojas nuevas. También las lecturas DAS-ELISA fueron más bajas que la de los parentales. En los experimentos 1 y 2 los valores de absorbancia oscilaron en el rango de 0.27 y 0.41 (Tabla 2).

Tabla 2. Medias de absorbancia y severidad en pruebas DAS-ELISA para ZYMV en parentales y generaciones F₁.

Genotipo	Experimento1			Experimento2		
	405nm		Severidad	405nm		Severidad
<i>Parental resistente</i>						
Nigerian Local (NL)	0.23	ab	0.00	0.09	ab	0.00
<i>Parentales susceptibles</i>						
Soler (Sol)	0.54	d	3.00	0.85	d	3.00
Taína Dorada (TD)	0.44	bcd	3.00	0.79	d	3.00
Verde Luz (VL)	0.79	e	3.00	0.76	d	3.00
Waltham (Walt)	0.48	cd	3.00	0.85	d	3.00
<i>Generaciones F₁</i>						
(Sol x NL)	0.30	abc	1.00	0.35	c	1.00
(NL x TD)	0.30	abc	1.00	0.27	bc	1.00
(NL x VL)	0.31	abc	1.00	0.41	c	2.00
(NL x Walt)	0.34	bc	1.00	--*		
<i>Controles</i>						
Plantas control ¹	0.16	a		0.09	ab	
Control positivo	1.18	f		0.91	d	
Control negativo	0.18	ab		0.08	a	

Plántulas fueron inoculadas en los dos cotiledones 7 días después de emergencia y la evaluación fue realizada con extracto de la 4ª. Hoja verdadera 21 días después de la inoculación. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0.05) de acuerdo con la prueba Diferencia Mínima Significativa de Fisher.

¹ Plantas inoculadas con buffer. *Semilla no disponible.

4.2 NIVEL DE RESISTENCIA A ZYMV Y COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DE FAMILIAS F₃ PRODUCIDOS DEL PROGRAMA DE RETROCRUZAMIENTO (EXPERIMENTO 3).

4.2.1 Nivel de resistencia de líneas F₃ a ZYMV

En la evaluación de campo, todas las plantas fueron inoculadas mecánicamente con *Zucchini yellow mosaic virus*. Las plantas de ‘Nigerian Local’ además de estar libre de síntomas siempre exhibieron lecturas bajas en la prueba DAS-ELISA (valores negativos para ZYMV). Los resultados de las lecturas de ‘Nigerian Local’ tuvieron promedios para severidad de 0.00 y medias de absorbancia promedio de 0.12 (Tabla 3). Los parentales susceptibles ‘Soler’, ‘Taína Dorada’ y ‘Verde Luz’ la mayoría de las plantas mostraron síntomas de leves hasta fuertes como se muestran en la figura 1. Las lecturas de absorbancia de las pruebas DAS-ELISA realizadas a estos parentales fueron valores altos (positivos para ZYMV). Los síntomas mostraron severidad promedio de 1.25 y 2.38 (Tabla 3), mientras que los valores de absorbancia fluctuaron en un rango entre 0.46 a 0.60 respectivamente (Tabla 3). Las plantas del parental susceptible ‘Soler’ (código 503) mostraron un promedio de 0.460 para absorbancia (DAS-ELISA) y los síntomas visuales de severidad en el campo fueron de leves a moderados con un promedio de 1.25 (Figura 2, Tablas 3, 4 y 5). ‘Taína Dorada’ (código 502) mostró síntomas visuales de moderados a fuertes y lecturas altas para absorbancia (405nm) en la prueba DAS-ELISA. El promedio de los valores de severidad fue de 2.38 y un valor promedio de 0.505 para las lecturas de absorbancia para DAS-ELISA (Tablas 3, 4 y 5). Las plantas del parental ‘Verde Luz’ (código 504) al igual que los otros dos parentales susceptibles siempre hubo presencia de síntomas y se observó severidad promedio de 2.13 además de mostrar lecturas altas para absorbancia de 0.600 en la prueba DAS-ELISA (Tablas 3, 4 y 5).

Muchas de las plantas de las familias (líneas) F₃ mostraron síntomas de ZYMV pero en su mayoría la severidad y las lecturas de absorbancia (DAS-ELISA) fueron menores comparados con su respectivo parental recurrente (Tablas 4 y 5).

Las plantas de las familias F₃ derivadas del cruce Soler x Nigerian Local, en general mostraron síntomas de ZYMV pero estos fueron bajos para severidad al igual que los valores de absorbancia para las pruebas DAS-ELISA. Las líneas 14, 15, 76 y 95 mostraron resistencia a ZYMV (severidad promedio de 0 y 1) y tuvieron una absorbancia promedio de 0.165. Sin embargo las líneas 63 y 159 mostraron severidad 2 y 3, y valores de absorbancia mayores de 0.300 (Tabla 3). Las familias F₃ derivadas de Taína Dorada x Nigerian Local (líneas 59, 61, 129 y 165) presentaron una severidad promedio entre 0.88 y 1.31 (resistencia fuerte a moderada), mientras que las líneas 56, 97, 139 y 154 mostraron severidad en un rango de 1.7 a 2.0 (resistencia moderada a susceptible). Los valores de absorbancia oscilaron en un rango de 0.23 a 0.41 (Tabla 3). Las líneas F₃ (24, 122 y 155) derivadas de Verde Luz x Nigerian Local, la severidad promedio fue de 0.08 y el valor promedio de absorbancia fue de 0.150 siendo estas las más resistentes a ZYMV en esta familia. Todas las plantas de 'Nigerian Local' mostraron un nivel de resistencia uniforme, severidad promedio de 0.00 y valores de absorbancia promedio de 0.102 (Tabla 3).

Tabla 3. Medias de severidad y lecturas ELISA (absorbancia a 405nm) de familias F₃ y sus parentales inoculados con *Zucchini yellow mosaic virus* y evaluados en el campo en Isabela, Puerto Rico en 2009.

Pariente ¹ recurrente	Código experimental	Severidad ²	ELISA ³ (absorbancia 405nm)
<i>Familias F3</i>			
Soler	14	0.13 ab	0.15 ab
Soler	15	0.13 ab	0.14 ab
Soler	63	1.00 bcdefg	0.41 bcde
Soler	76	0.31 abcd	0.17 ab
Soler	95	0.44 abcde	0.19 abc
Soler	106	0.46 abcde	0.28 abcd
Soler	132	0.27 abc	0.18 abc
Soler	159	0.75 abcdef	0.30 abcd
Taína Dorada	56	1.81 ghij	0.26 abcd
Taína Dorada	59	0.88 abcdefg	0.24 abcd
Taína Dorada	61	1.25 defghi	0.25 abcd
Taína Dorada	97	2.00 hij	0.27 abcd
Taína Dorada	129	1.25 defghi	0.27 abcd
Taína Dorada	139	1.69 fghij	0.41 bcde
Taína Dorada	154	1.69 fghij	0.23 abcd
Taína Dorada	165	1.31 efghi	0.29 abcd
Verde Luz	2	1.06 bcdefgh	0.35 abcde
Verde Luz	24	0.06 a	0.10 a
Verde Luz	32	0.00 a	0.29 abcd
Verde Luz	54	0.69 abcde	0.28 abcd
Verde Luz	94	1.20 cdefhi	0.37 abcde
Verde Luz	122	0.13 ab	0.16 ab
Verde Luz	145	0.19 ab	0.18 abc
Verde Luz	155	0.06 a	0.18 abc
<i>Parentales</i>			
Nigerian Local	501	0.00 a	0.12 a
Soler	503	1.25 defghi	0.46 cde
Taína Dorada	502	2.38 j	0.51 df
Verde Luz	504	2.13 ij	0.60 e

¹Pariente recurrente en el retrocruce con Nigerian Local. ²Promedio de dos repeticiones de 5 a 8 plantas por repetición. Los síntomas de las plantas fueron evaluados usando una escala 0-3 donde 0 = no síntomas, 1= síntomas leves, 2 = síntomas moderados y 3 = síntomas fuertes. ³Promedio de lecturas de 8 plantas por parcela en ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). En la misma columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes al nivel de probabilidad de 0.05 de acuerdo con la prueba de Diferencia Mínima Significativa de Tukey.

En las pruebas DAS-ELISA la absorbancia promedio de todas las familias F_3 y de los parentales fluctuó entre 0.115 a 0.600 (Tabla 5). En general, hubo variación y no una correlación entre la absorbancia promedio con la severidad promedio dentro de cada familia. En las figuras 3, 4 y 5 se puede observar las dispersiones de los valores de absorbancia para cada una de las familias F_3 , comparado con su parental recurrente y NL.

‘Nigerian Local’ fue el único cultivar que mostró una asociación entre los resultados de severidad y lecturas ELISA (Figura 2, Tablas 4 y 5). Los promedios de severidad y lecturas ELISA en los parentales (‘Soler’, ‘Taína Dorada’ y ‘Verde Luz’) tuvieron cierto grado de correlación (Tablas 4 y 5). Sin embargo, evaluadas las plantas individualmente de cada parental y líneas F_3 , se puede observar en algunos casos variación en cuanto al grado de severidad y las lecturas ELISA (Figuras 3, 4 y 5). Por ejemplo el parental ‘Soler’ y algunas de las líneas (132 y 159) hubo plantas que mostraron estar libre de síntomas no obstante las lecturas de absorbancia fueron mayores de 0.500 y viceversa, plantas que mostraron severidad 2 y 3 las lecturas de absorbancia fueron menores de 0.200 (Figura 3). Esta tendencia también se puede observar en los otros cultivares y familias F_3 evaluadas (Figuras 4 y 5). Aunque si se pudo observar familias F_3 (14, 15, 76, 59, 122, y 155) que resultaron con valores de absorbancia por debajo de 0.200 y con severidad de 0 y 1.

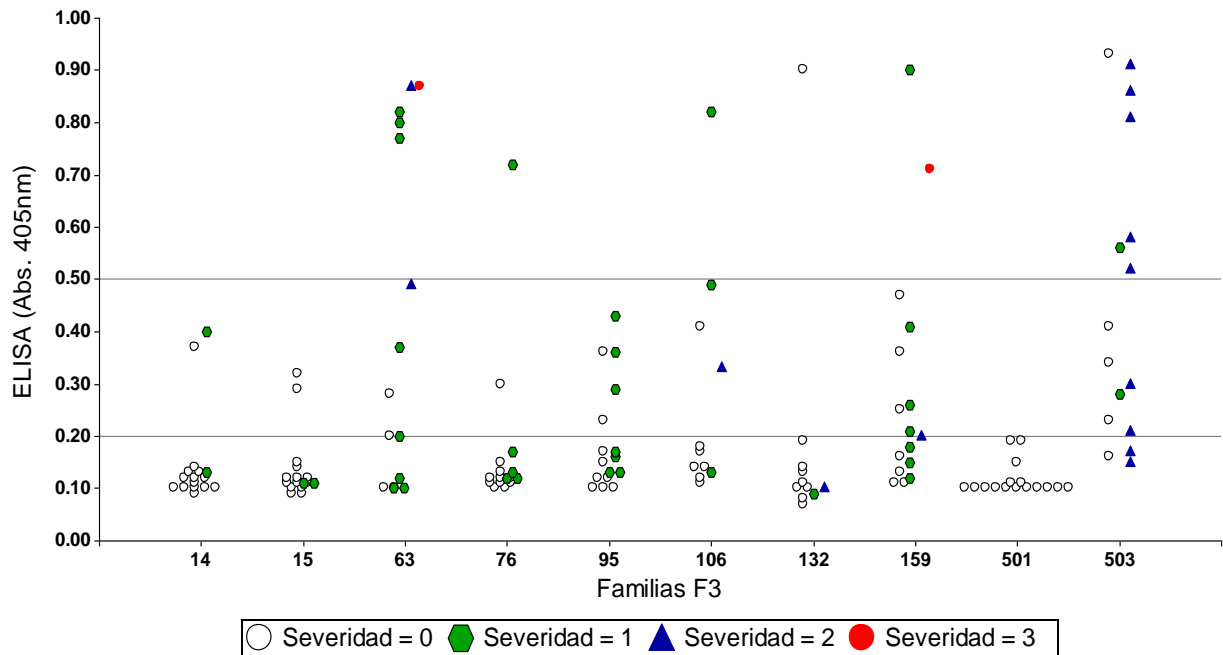


Figura 3. Asociación entre severidad y lecturas de absorbancia (405nm) de pruebas ELISA en los parentales Nigerian Local (NL) y Soler (SOL) y ocho familias F₃ (Núm. 14 a 159) derivadas del cruce Soler x Nigerian Local seguido por una generación de retrocruce, todas inoculadas mecánicamente con *Zucchini yellow mosaic virus*. Colores representan cada clase de severidad. Lecturas de ELISA menor de 0.20 (línea inferior) se consideran negativos para ZYMV y lecturas mayor de 0.50 (línea superior) se consideran positivos para ZYMV.

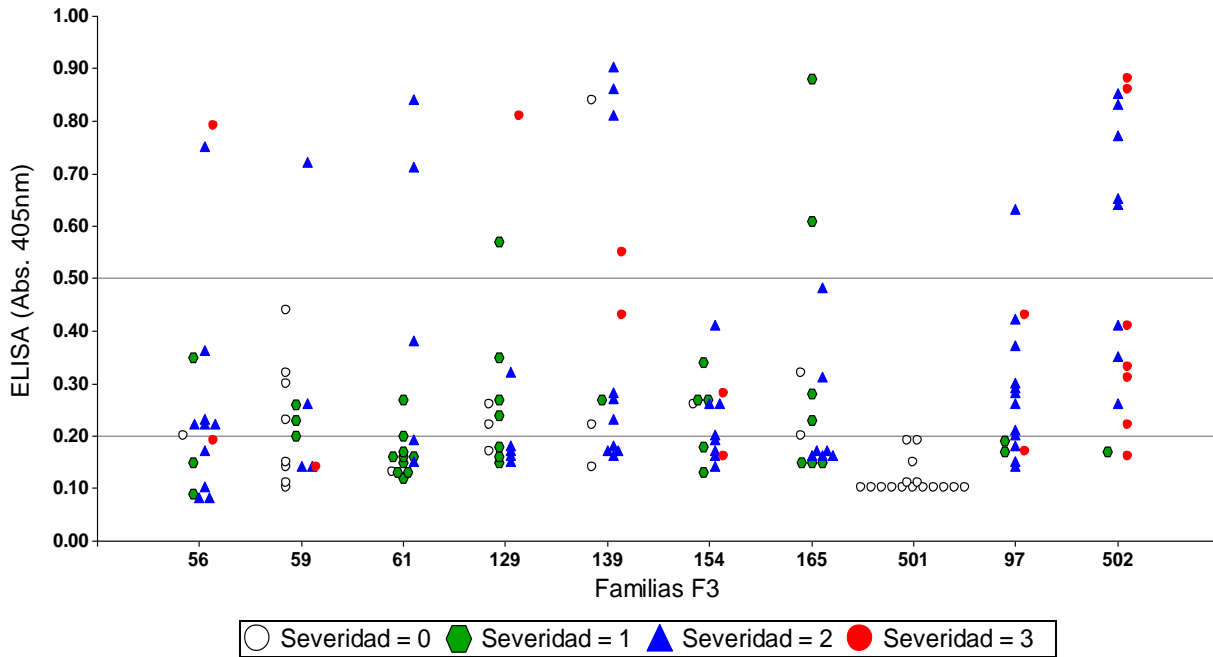


Figura 4. Asociación entre severidad y lecturas de absorbancia (405nm) de pruebas ELISA en los parentales Nigerian Local (NL) y Taína Dorada (TD) y ocho familias F₃ (Núm. 56 a 165, y 97) derivadas del cruce Taína Dorada x Nigerian Local seguido por dos generaciones de retrocruce con Taína Dorada, todas inoculadas mecánicamente con *Zucchini yellow mosaic virus*. Colores representan cada clase de severidad. Lecturas de ELISA menor de 0.20 (línea inferior) se consideran negativos para ZYMV y lecturas mayor de 0.50 (línea superior) se consideran positivos para ZYMV.

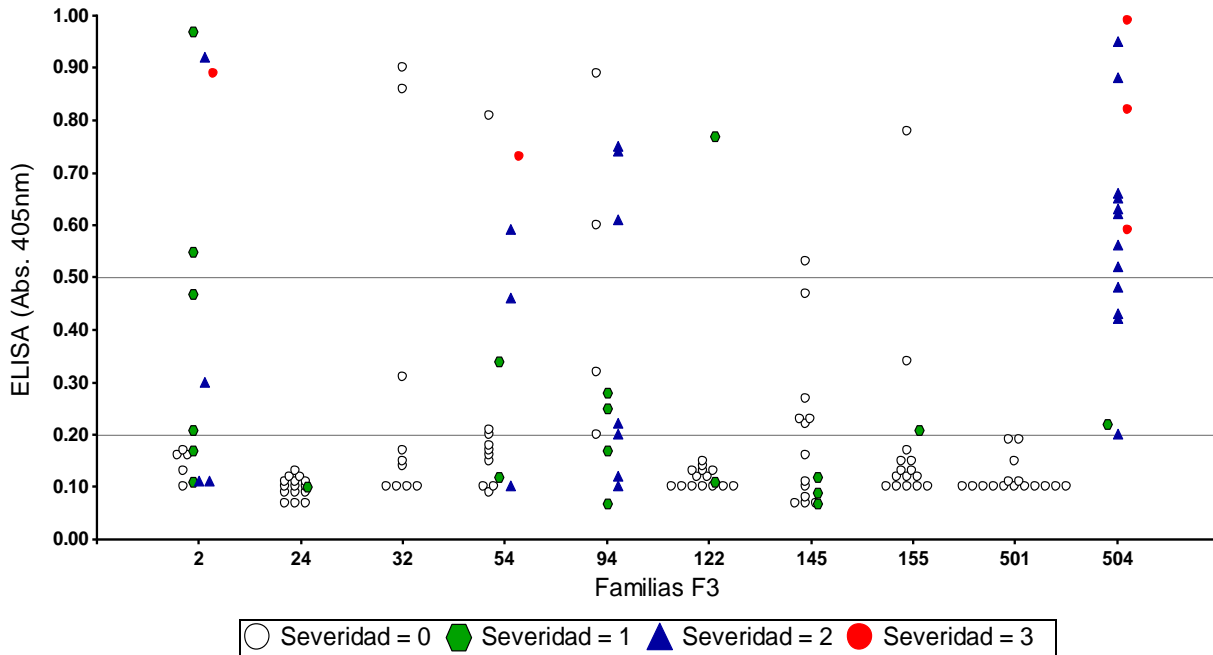


Figura 5. Asociación entre severidad y lecturas de absorbancia (405nm) de pruebas ELISA en los parentales Nigerian Local (NL) y Verde Luz (VL) y ocho familias F₃ (Núm. 2 a 155) derivadas del cruce Verde Luz x Nigerian Local seguido por una generación de retrocruce, todas inoculadas mecánicamente con *Zucchini yellow mosaic virus*. Colores representan cada clase de severidad. Lecturas de ELISA menor de 0.20 (línea inferior) se consideran negativos para ZYMV y lecturas mayor de 0.50 (línea superior) se consideran positivos para ZYMV.

Tabla 4. Contrastes para medias de severidad de líneas F₃ de retrocruzamiento versus Nigerian Local o su parental recurrente inoculados con *Zucchini yellow mosaic virus* y evaluados en el campo en Isabela, Puerto Rico en 2009.

Contrastes			Severidad		Probabilidad de prueba F del contraste	
Línea F ₃ ^a	vs.	Parental	Línea F ₃ ^a	vs.		Parental
Soler		Soler	0.44		1.25	0.0099
Soler		Nigerian Local	0.44		0.00	0.1474
Taína Dorada		Taína Dorada	1.49		2.38	0.0051
Taína Dorada		Nigerian Local	1.49		0.00	<0.0001
Verde Luz		Verde Luz	0.42		2.13	<0.0001
Verde Luz		Nigerian Local	0.42		0.00	0.1624

^a Líneas derivadas de retrocruzamiento entre Nigerian Local y el parental susceptible indicado.

Tabla 5. Contrastes para medias de lecturas ELISA (absorbancia a 405nm) de líneas de retrocruzamiento versus Nigerian Local o su parental recurrente inoculados con *Zucchini yellow mosaic virus* y evaluados en el campo en Isabela, Puerto Rico en 2009.

Contrastes			ELISA (absorbancia 405nm)		Probabilidad de prueba F de contraste	
Línea F ₃ ^a	vs.	Parental	Línea F ₃ ^a	vs.		Parental
Soler		Soler	0.229		0.460	0.0178
Soler		Nigerian Local	0.229		0.115	0.2213
Taína Dorada		Taína Dorada	0.278		0.505	0.0195
Taína Dorada		Nigerian Local	0.278		0.115	0.0854
Verde Luz		Verde Luz	0.239		0.600	0.0005
Verde Luz		Nigerian Local	0.239		0.115	0.1846

^a Líneas derivadas de retrocruzamiento entre Nigerian Local y el parental susceptible indicado.

4.2.3 Características Agronómicas

Los parentales susceptibles ‘Soler’ y ‘Taína Dorada’ exhibieron buenos promedios en todas las características agronómicas evaluadas mientras que ‘Verde Luz’ fue inferior. El parental que se utilizó para incorporar la resistencia ‘Nigerian Local’ exhibió pobres características agronómicas, como se esperaba. Se pudo observar en cada uno de los parentales recurrentes líneas mejoradas que mostraron buenas características agronómicas.

Las líneas F₃ de ‘Soler’ con buenos rendimientos fueron las 76 y 106, con rendimientos de 11,618 kg/ha y 13,851 kg/ha, respectivamente. Estas dos líneas no mostraron diferencias significativas con el parental ‘Soler’ la cual tuvo un rendimiento de 18,747 kg/ha. (Tabla 6). El parental susceptible ‘Taína Dorada’ tuvo rendimiento de 12,869 kg/ha. Las dos líneas F₃ derivadas de ‘Taína Dorada’ con mayor rendimiento fueron las 56 (9,270 kg/ha) y 59 (11,837 kg/ha) (Tabla 6). ‘Verde Luz’ fue el parental susceptible con menor rendimiento, el cual fue 3,222 kg/ha. En cuanto a las líneas F₃ derivadas de Verde Luz, la 94 (13,463 kg/ha) y la 155 (11,510kg/ha) fueron las de mayor rendimiento en esta familia (Tabla 6). Mientras tanto los parentales susceptibles ‘Soler’ y ‘Taína’ tuvieron rendimientos mayores que los de sus líneas F₃ (Tabla 7). Por otra parte, el rendimiento promedio de las líneas F₃ derivadas de Verde Luz fue 7,405 kg/ha, mayor al rendimiento promedio del parental ‘Verde Luz’ que fue 3.222 kg/ha (Tabla 7).

Las líneas 76 y 106 derivadas de Soler fueron las de mayor cantidad de frutos por hectárea con 5,793 y 5,831 respectivamente, mientras que el parental tuvo 4,485 frutos por hectárea (Tabla 6). El parental ‘Soler’ comparado con las líneas derivadas no mostró diferencia en la cantidad de frutos con 4,485 y 4,726 respectivamente (Tabla 8). ‘Taína Dorada’ rindió 3,738 frutos por hectárea y las líneas F₃ 56 y 59 tuvieron 3,204 y 2,990 frutos por hectárea correspondientemente (Tabla 6) En general la cantidad de frutos por hectárea de las líneas F₃ promediaron 2,930 y no hubo diferencia con el parental ‘Taína Dorada’ (Tabla 8). La cantidad promedio de frutos por hectárea de ‘Verde Luz’ fue 2,376 menor al promedio de las líneas F₃ el cual fue 5,795 frutos por hectárea (Tabla 8).

El peso promedio de los frutos de ‘Soler’ fue de 4.4 kg (Tabla 9). Tres líneas F₃ derivadas ‘Soler’ (15, 76 y 106) mostraron peso razonable mayor de 2.0 kg (Tabla 6). Seis de las ocho

familias F_3 derivadas de 'Taína Dorada' (56, 59, 97, 139, 154 y 165) tuvieron un peso promedio de frutos mayor de 2.0 kg. Las líneas 59 (4.0 kg) y 97 (3.15 kg) con los frutos más grandes no tuvieron diferencia significativa al parental 'Taína Dorada' (Tabla 6). El peso de los frutos del parental 'Taína Dorada' promedio 3.5 kg, mientras que el promedio de las líneas F_3 fue 2.6 kg (Tabla 9). Para el parental 'Verde Luz' y las líneas F_3 no fueron significativamente diferentes ya que los pesos promedios de sus frutos fueron 1.4 y 1.3 kg respectivamente.

Tabla 6. Medias de rendimiento (peso) por hectárea, número de frutos por hectárea y peso promedio de frutos de familias F₃ y sus parentales inoculados con *Zucchini yellow mosaic virus* y evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009.

Pariente recurrente ¹	Código experimental	Rendimiento (Kg/ha)	Número de frutos por hectárea	Peso promedio de frutos (kg)
Familias F₃				
Soler	14	6481 abc	3925 ab	1.7 abcdef
Soler	15	8761 abc	3444 ab	2.6 defgh
Soler	63	5533 abc	2990 a	1.8 abcdef
Soler	76	11618 abcd	5793 ab	2.0 abcdefg
Soler	95	7475 abc	4112 ab	1.8 abcdef
Soler	106	13851 cd	5831 ab	2.4 cdefg
Soler	132	5465 abc	6479 ab	0.8 ab
Soler	159	9301 abc	5233 ab	1.8 abcdef
Taína Dorada	56	9270 abc	3204 ab	2.9 efgh
Taína Dorada	59	11837 abcd	2990 a	4.0 hi
Taína Dorada	61	6224 abc	3978 ab	1.6 abcde
Taína Dorada	97	6862 abc	2190 a	3.2 fghi
Taína Dorada	129	4842 abc	2990 a	1.7 abcdef
Taína Dorada	139	7220 abc	3177 ab	2.2 bcdefg
Taína Dorada	154	6904 abc	2750 a	2.4 cdefg
Taína Dorada	165	5321 abc	2163 a	2.4 cdefg
Verde Luz	2	3610 ab	5295 ab	0.7 a
Verde Luz	24	6795 abc	7102 ab	1.0 abc
Verde Luz	32	4482 abc	4058 ab	1.0 abcd
Verde Luz	54	7070 abc	6016 ab	1.2 abcd
Verde Luz	94	13463 cd	4672 ab	2.9 efgh
Verde Luz	122	6073 abc	4859 ab	1.3 abcd
Verde Luz	145	6237 abc	5393 ab	1.2 abcd
Verde Luz	155	11510 abcd	8970 b	1.3 abcd
Parentales				
Nigerian Local	501	8834 abc	4859 ab	1.8 abcdef
Soler	503	18748 d	4485 ab	4.4 i
Taína Dorada	502	12868 bcd	3738 ab	3.4 ghi
Verde Luz	504	3222 c	2376 a	1.4 abcd

¹Pariente recurrente de retrocruce con Nigerian Local. En la misma columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey.

Tabla 7. Contrastes para medias en rendimiento de líneas F₃ versus Nigerian Local o su parental recurrente. Los genotipos fueron evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009.

Contrastes		Rendimiento (kg/ha)		Probabilidad de prueba F del contrastes
Línea F ₃ ^a	vs. Parental	Línea F ₃	vs. Parental	
Soler	Soler	8561	18747	<0.0001
Soler	Nigerian Local	8561	8834	0.8751
Taína Dorada	Taína Dorada	7310	12868	0.0033
Taína Dorada	Nigerian Local	7310	8834	0.3839
Verde Luz	Verde Luz	7405	3222	0.0220
Verde Luz	Nigerian Local	7405	8834	0.4138

^a Líneas derivadas de retrocruzamiento entre Nigerian Local y el parental susceptible indicado.

Tabla 8. Contrastes para medias de número de frutos por hectáreas de líneas de retrocruzamiento versus Nigerian Local o su parental recurrente. Los genotipos fueron evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009.

Contrastes		Número de frutos/ha		Probabilidad de prueba F del contrastes
Línea F ₃ ^a	vs. Parental	Línea F ₃	vs. Parental	
Soler	Soler	4726	4485	0.8261
Soler	Nigerian Local	4726	4859	0.9029
Taína Dorada	Taína Dorada	2930	3738	0.4626
Taína Dorada	Nigerian Local	2930	4859	0.0865
Verde Luz	Verde Luz	5795	2376	0.0039
Verde Luz	Nigerian Local	5795	4859	0.3954

^a Líneas derivadas de retrocruzamiento entre Nigerian Local y el parental susceptible indicado.

Tabla 9. Contrastes para medias de peso de fruto de líneas de retrocruzamiento versus Nigerian Local o su parental recurrente. Los genotipos fueron evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009.

Contrastes		Peso de fruto (kg)		Probabilidad de prueba F de contrastes
Línea F ₃ ^a	vs. Parental	Línea F ₃	vs. Parental	
Soler	Soler	1.9	4.4	<0.0001
Soler	Nigerian Local	1.9	1.8	0.8240
Taína Dorada	Taína Dorada	2.6	3.5	0.0040
Taína Dorada	Nigerian Local	2.6	1.8	0.0160
Verde Luz	Verde Luz	1.3	1.4	0.8260
Verde Luz	Nigerian Local	1.3	1.8	0.0940

^a Líneas derivadas de retrocruzamiento entre Nigerian Local y el parental susceptible indicado.

El diámetro promedio de los frutos del parental ‘Soler’ fue 24.1 cm. El rango de los diámetros de las líneas F_3 derivadas de ‘Soler’ osciló entre 12.8 y 20.3 cm (Tabla 10). El diámetro promedio de las líneas F_3 fue 17 cm siendo significativamente diferente al parental ‘Soler’ (Tabla 11). Los frutos del parental ‘Taína Dorada’ tuvieron un diámetro promedio de 22.6 cm. Los diámetros de los frutos de las líneas F_3 oscilaron en un rango entre 16.6 y 22.1cm promediando 18.6 cm (Tabla 11). Las líneas F_3 de ‘Taína Dorada’ (59, 97 y 154) obtuvieron los mejores resultados de esta familia, el rango de los diámetros estuvo entre 19.4 y 22.1 cm. No hubo diferencias entre estas líneas y el parental ‘Taína Dorada’ (Tabla 10). De acuerdo a los datos no hubo diferencia significativa entre ‘Verde Luz’ y las líneas F_3 (Tabla 11). Las líneas F_3 94 y 155 fueron las de mayor diámetro de frutos con 21.1 y 15.5cm (Tablas 10). El diámetro promedio del parental susceptible ‘Verde Luz’ fue 15.8 cm, mientras el de las líneas F_3 fue 14.9 cm.

Para grosor de la pulpa hubo diferencia significativa entre los promedios de las líneas F_3 y los parentales. ‘Soler’ y ‘Taína Dorada’ con el mismo promedio de 4.4cm en tamaño del grosor de la pulpa con en promedio mientras que ‘Verde Luz’ promedio 3.5 cm. (Tabla 10). Las líneas F_3 derivadas de ‘Soler’ ‘Taína Dorada’ y ‘Verde Luz’ los promedios estuvieron en, 3.2, 3.3 y 2.7cm en el cual hubo diferencia entre los parentales y las líneas F_3 (Tabla 12). Sin embargo, las líneas F_3 de ‘Soler’ (76 y 106) de ‘Taína Dorada’ (59) y ‘Verde Luz’ (54 y 155) no expresaron diferencia con los parentales correspondientes (Tabla 10).

Tabla 10. Medias de diámetro y grosor de pulpa del promedio de frutas de familias F₃ y parentales inoculados con *Zucchini yellow mosaic virus* y evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009.

Pariente ¹ recurrente	Código experimental	Diámetro(cm)	Grosor(cm)
<i>Familias F₃</i>			
Soler	14	18.4 cdefgh	3.6 ab
Soler	15	20.3 defgh	3.6 ab
Soler	63	16.6 abcdefg	2.9 ab
Soler	76	16.8 abcdefg	3.3 ab
Soler	95	18.1 bcdefgh	2.9 ab
Soler	106	18.6 bcdefgh	3.6 ab
Soler	132	12.8 ab	2.3 a
Soler	159	17.3 abcdefg	3.4 ab
Taína Dorada	56	19.2 bcdefgh	3.1 ab
Taína Dorada	59	22.1 fgh	3.3 ab
Taína Dorada	61	15.7 abcdef	3.2 ab
Taína Dorada	97	19.9 cdefgh	3.8 ab
Taína Dorada	129	16.6 abcdefg	3.0 ab
Taína Dorada	139	17.8 abcdefgh	3.9 ab
Taína Dorada	154	19.4 cdefgh	3.6 ab
Taína Dorada	165	18.6 bcdefgh	2.9 ab
Verde Luz	2	11.4 a	2.2 a
Verde Luz	24	13.9 abcd	2.5 a
Verde Luz	32	14.6 abcd	2.6 a
Verde Luz	54	14.8 abcde	3.4 ab
Verde Luz	94	21.1 efgh	2.8 ab
Verde Luz	122	13.8 abc	2.8 ab
Verde Luz	145	14.3 abcd	2.4 a
Verde Luz	155	15.5 abcde	3.0 ab
<i>Parentales</i>			
Nigerian Local	501	18.5 bcdefgh	2.2 a
Soler	503	24.1 h	4.4 b
Taína Dorada	502	22.6 gh	4.4 b
Verde Luz	504	15.8 abcdef	3.5 ab

¹Pariente recurrente de retrocruce con Nigerian Local.

En la misma columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey.

Tabla 11. Contrastes para medias de diámetro de frutas en líneas de retrocruzamiento versus Nigerian Local o su parental recurrente. Los genotipos fueron evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009.

Contrastes		Diámetro de frutas (cm)		Probabilidad de prueba F de contrastes
Línea F ₃ ^a	vs. Parental	Línea F ₃	vs. Parental	
Soler	Soler	17.3	24.1	<0.0001
Soler	Nigerian Local	17.3	18.5	0.3320
Taína Dorada	Taína Dorada	18.6	22.6	0.0030
Taína Dorada	Nigerian Local	18.6	18.5	0.9030
Verde Luz	Verde Luz	14.9	15.8	0.4840
Verde Luz	Nigerian Local	14.9	18.5	0.0050

^a Líneas derivadas de retrocruzamiento entre Nigerian Local y el parental susceptible indicado.

Tabla 12. Contrastes para medias de grosor de pulpa en frutos de líneas de retrocruzamiento versus Nigerian Local o su parental recurrente. Los genotipos fueron evaluados en Isabela, Puerto Rico en 2009.

Contrastes		Grosor de pulpa (cm)		Probabilidad de prueba F de contrastes
Línea F ₃ ^a	vs. Parental	Línea F ₃	vs. Parental	
Soler	Soler	3.2	4.4	0.0010
Soler	Nigerian Local	3.2	2.2	0.0040
Taína Dorada	Taína Dorada	3.3	4.4	0.0030
Taína Dorada	Nigerian Local	3.3	2.2	0.0010
Verde Luz	Verde Luz	2.7	3.5	0.0170
Verde Luz	Nigerian Local	2.7	2.2	0.1120

^a Líneas derivadas de retrocruzamiento.

5. DISCUSIÓN

Lecoq et al., (1998) y Pachner y Lelley (2004) observaron una gama de síntomas causados por ZYMV en cultivos de cucurbitáceas. Entre los síntomas causados por esta enfermedad viral se encontraban: mosaicos, deformaciones y manchas cloróticas, principalmente en las hojas. Estos síntomas también se han observado en Puerto Rico. A pesar que hubo un grado de variación al tipo y severidad de los síntomas en cada una de las poblaciones evaluadas, estos síntomas fueron similares a los causados por ZYMV antes descritos. 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’, ‘Taína Dorada’ y ‘Verde Luz’ son poblaciones de polinización abierta. El cultivar ‘Nigerian Local’ consistentemente lució libre de síntomas mostrando resistencia como en estudios previos.

En los estudios de herencia realizados para resistencia y susceptibilidad a ZYMV, los resultados mostraron una pequeña diferencia a lo esperado en los valores de absorbancia, aunque en general se pudo ver diferencia en los valores de severidad de los síntomas entre los parentales y F_1 . Las poblaciones F_1 mostraron cierto nivel de resistencia al igual que en estudios previamente realizados (Brown et al., 2003; Pachner y Lelley, 2004). En las poblaciones F_1 estudiadas las plantas en general (data no mostrada) exhibieron síntomas leves los que fueron clasificados con severidad de 1 (Tabla 2). Aunque la población F_1 ‘Nigerian Local’ x ‘Verde Luz’ en uno de los experimentos mostró sintomatología de moderadamente a fuerte y clasificada con severidad 2, sus síntomas no llegaron ser como los de su parental. Todos los parentales susceptibles (‘Soler’, ‘Taína Dorada’, ‘Verde Luz’), mostraron el nivel de severidad más alto en la escala, con 3. Al comparar que el parental resistente ‘Nigerian Local’ en el estudio estuvo

completamente libre de síntomas, las poblaciones F_1 mostraron síntomas mucho más leves que los de sus parentales. Estos resultados dan pie a que la dominancia es parcial y no dominancia completa previamente dicho por Munger y Provvidenti (1987). Las evaluaciones realizadas a estas mismas poblaciones para la prueba serológica (DAS-ELISA) de detección de partículas virales mediante absorbancia (405nm) fueron datos variables. Aunque numéricamente en el experimento 1 (Tabla 2) los resultados de las poblaciones F_1 fueron más bajos que las de sus parentales, estadísticamente las medias de ‘Taína Dorada’ y ‘Waltham’ no mostraron diferencia significativa. El parental Taína Dorada además de no tener diferencia significativa con el F_1 tampoco tuvo diferencia con el parental ‘Nigerian Local’. Esto pudo deberse a una inoculación inefectiva o factores que no conocemos y que podrían ser estudiados posteriormente. Todas las poblaciones F_1 no mostraron diferencia significativa para absorbancia (405nm) con el parental resistente ‘Nigerian Local’. En el experimento 2 (Tabla 2) los resultados estuvieron más cerca de los esperados. Las poblaciones F_1 mostraron un grado de resistencia más alto que la de sus parentales. En los dos experimentos ‘Nigerian Local’ además de estar libre de síntomas, los valores de absorbancia fueron menores que los F_1 y los parentales susceptibles. En general, la evidencia de estos experimentos indican que la herencia de resistencia de ‘Nigerian Local’ es de dominancia incompleta, no la dominancia completa indicada por Brown et al., 2003.

En el estudio de campo las líneas F_3 mejoradas por retrocruces fueron evaluadas para resistencia por razón de datos visuales para severidad de los síntomas y la presencia de partículas virales mediante el uso de la prueba DAS-ELISA (absorbancia 405nm). Se observaron datos variables ya que la mayoría de las familias evaluadas no mostraron la resistencia esperada y desarrollaron síntomas, aunque en general más leves que los parentales susceptibles (Tabla 3). De nuevo, estos resultados indican que la herencia de resistencia de ‘Nigerian Local’ no es de

tipo de dominancia completa. La herencia de resistencia a ZYMV puede ser controlada por varios genes. Pachner y Lelley (2004) y Pachner et al (2011) concluyeron que hay varios genes controlando la resistencia de 'Nigerian Local', entre estos genes se encuentran genes dominantes y recesivos.

Para ZYMV evaluado en campo para estas familias F_3 , los resultados afirman que hay cierto grado de complejidad cuando se intenta incorporar resistencia en cultivares de polinización abierta y que es necesario realizar pruebas para asegurar que las plantas seleccionadas para ZYMV producen progenies resistentes. No se puede confiar que todas las plantas seleccionadas en la F_2 como resistentes (por medio de una inoculación mecánica), y que son genes dominantes los que controlan la resistencia.

Se combinaron los datos de severidad y presencia de partículas virales (DAS-ELISA), para tratar de desarrollar una manera más eficiente de detección y clasificación, y tratar de distinguir con más certeza la resistencia o susceptibilidad de las plantas. En los experimentos de ensayo de herencia antes discutidos (Tabla 2) hubo relación entre los síntomas y el valor de absorbancia, mientras a mayor severidad de síntomas más altos fueron los valores de absorbancia. En la evaluación de las familias F_3 se realizó una gráfica individual de cada parental recurrente (Figuras 3, 4 y 5). En estas graficas se pueden observar casos con diferencia entre el grado de severidad y los valores de absorbancia. Se observó que hubo plantas clasificadas con severidad de 0 y 1 que obtuvieron valores de absorbancia mayor de 0.50 al igual que plantas con severidad de 3 y que los valores estuvieron por debajo de 0.20. 'Nigerian Local' fue la única población de plantas que mostró completa relación entre la severidad de sus síntomas y los valores de ELISA. En algunos casos las líneas mejoradas mostraron algún tipo de relación entre la grado de severidad y los valores de absorbancia 405nm (DAS-ELISA), entre estas se

encuentran las familias F₃ mejoradas de ‘Soler’ (14, 15, 76 y 95), de ‘Taína Dorada’ (56, 97, 139, y 154) y ‘Verde Luz’ (24, 122, 155). Estas diferencias entre la severidad observada y las lecturas ELISA se pudieron deber a la respuesta de la planta al virus. Se debe considerar otros factores más que resistencia y susceptibilidad, y poder decir que las plantas muestran algo de tolerancia o sensibilidad al virus en cuanto a su sintomatología (Cooper y Jones, 1983). En estudios previos, los valores de absorbancia ayudan a identificar y seleccionar de manera cuantitativa síntomas leves y severos. Mientras que es un poco más complicado utilizar estos valores y para así distinguir entre plantas que muestren síntomas con un grado intermedio por la razón que el rango de severidad es amplio. Combinando los dos datos de severidad y absorbancia (DAS- ELISA), las familias de F₃ de ‘Soler’ y ‘Verde Luz’ resultaron ser las más resistentes a ZYMV ya que obtuvieron valores promedios menores de 0.44 para severidad y lecturas promedios de absorbancia de 0.239 (Tablas 4 y 5).

Después de evaluada la resistencia y combinarlos con las características agronómicas las siguientes familias F₃ podrían ser utilizadas para futuros estudios en el programa de mejoramiento ya que los resultados fueron bastante significativos. La línea 76 derivada de ‘Soler’ mostró resistencia y buen rendimiento, en general buenas características hortícolas (Tabla 3,6 y 10). Una de las líneas mejoradas derivadas de ‘Taína Dorada’ no mostró diferencia significativa en ninguna de las características agronómicas evaluadas mientras que se observó mayor resistencia. Esta fue la línea 59 la cual podría seguir siendo evaluada posteriormente. En tanto ‘Verde Luz’ siendo el parental con mayor susceptibilidad y mostrando también que su rendimiento se vio afectado, no obstante se pudo ver que una de sus líneas F₃ (155) respondió a los objetivos bajo estudio de resistencia combinado con buenas características agronómicas. De cada una de los parentales recurrentes se pudo sacar al menos una línea F₃ prometedora.

6. CONCLUSIÓN

En este estudio para mejoramiento de cultivares susceptibles a *Zucchini yellow mosaic virus* los resultados obtenidos para la herencia de resistencia demostraron que el cultivar ‘Nigerian Local’ posee un gen de dominancia incompleta para resistencia a este virus. La resistencia transferida a los cultivares susceptibles parece más parcial que dominante. Ya que las poblaciones F₁ mostraron cierto grado de resistencia pero no tan fuerte como ‘Nigerian Local’, y podemos distinguir entre el homocigoto y heterocigoto. Las poblaciones F₃ evaluadas en el campo, no se pudo observar resistencia uniforme entre las plantas de las mismas líneas, descartando que la resistencia este controlada por un gen (Munger y Provvidenti 1987; Paris et al, 1988). Debido a que los cultivares locales (Sol, TD, VL) son de polinización abierta (genéticamente heterogéneas) pudo haber alguna interacción génica entre estos cultivares y ‘Nigerian Local’. Esto hace que la transferencia de resistencia es más compleja donde hay más genes envueltos (Pachner et al., 2011). El uso combinado de las técnicas de identificación y clasificación para resistencia a ZYMV, como la severidad de los síntomas y la prueba DAS-ELISA, pueden servir de ayuda para seleccionar de manera cuantitativa plantas clasificadas con síntomas leves y fuertes. En cuanto a los datos obtenidos de las familias F₃ para resistencia y características agronómicas evaluadas, se pudo identificar varias líneas que mostraron un grado mayor de resistencia que sus parentales recurrentes y sumando a esto buenas características agronómicas. Estas líneas F₃ (59, 76 y 155) podrían ser utilizadas para continuar realizando estudios posteriores para el programa de mejoramiento de la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez.

7. LITERATURA CITADA

Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5th Edition Elsevier Academic Press Publication, San Diego, California. 922 pp.

Andrews, F.J., Edmon y S. Til. 1967. Principios de horticultura. Tercera Edición. Editorial Continental, S.A. México, D, F

Anónimo. 2007. Ingreso bruto de la agricultura de Puerto Rico (Cifras revisadas 2005/2006 y preliminares 2006/2007. Departamento de Agricultura, Oficina de Estadísticas Agrícolas, p. 14.

Anonimo, 1998. Conjunto tecnológico para la producción de calabaza. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. Estación Experimental Agrícola, Rio Piedras, Puerto Rico. 32pp.

Astier, S., J. Albouy, Y. Maury, C. Robaglia, H. Lecoq. 2006. Principles of Plant Virology, Genome, Pathogenicity, Virus Ecology. Science Publishers, Enfield, NH, USA.

Blanc, S., M. Uzest y M. Drucker. 2011. New research horizons in vector-transmission of plant viruses. Current opinion in Microbiology 14: 483-491.

Bock, K.R. 1982. The identification and partial characterization of plant viruses in the tropics. Tropical Pest Management 28: 399-411.

Boyer, R. 1999. Conceptos de Bioquímica. International Thomson Editores, S. A. 694pp.

Brown, R.N., A. Bolanos, J.R. Myers y M.M. Jahn, 2003. Inheritance of resistance to four cucurbit viruses in *Cucurbita moschata*. Euphytica 129:253-258.

Brunt, A.A., K. Crabtree, M.J. Dallwitz, A.J. Gibbs, L. Watson y E.J. Zurcher, 1996. Plant viruses online: description and lists from the VIDE database. Version: 20 August 1996. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>

Byoung-Cherol, K., I. Yeam, y M. Molly Jahn. 2005. Genetics of plants virus resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 43:581-621.

Clark, M.F. y M. Bar-Joseph. 1984. Enzyme immunosorbent assay in plant virology. Pages 51-85 *En* Methods in virology, edited by K. Maramorosch y H. Koprowski. Academic Press, New York, USA.

Cooper, J.I. y M.L. Edwards. 1986. Variations and limitations of enzyme-amplified immunoassays. Pages 139-154 *En*: Developments and applications in virus testing, edited by R.A.C. Jones y L. Torrance. Association of Applied Biologist, Wellesbourne, UK.

Decker-Walters, D.S. y T.W. Walters. 2000. Squash, pp. 335-351. *En*: K.F. Kiple and K.C. Ornelas (ed.) The Cambridge world history of food. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Desbiez, C. y H. Lecoq. 1999. Evolution of zucchini yellow mosaic potyvirus (ZYMV) on Martinique Island since its first detection. Virus Evolution Workshop, Oct. 21- 24, 1999, Ardmore, Oklahoma.

Escudero, J. 1992. El cultivo de cucurbitáceas: memorias del foro técnico, June 26, 1992, Lajas Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Estación Experimental Agrícola.), p. 44-51.

Fereres, A. y A. Moreno. 2009. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research* 141(2): 158-168.

Gwanama, C. y K. Nichterlein. 1996. Leaf yield components and nutritional quality of Zambian pumpkin (*Cucurbita* L.) landraces. *En*: M. L. Gomes-Guillamón, C. Soria, J. Cuartero, J. A. Torres y R. Fernández- Muñoz (Eds.). Cucurbits towards 2000. Proceedings of the VIth Eucarpia meeting on cucurbit genetics and breeding, pp 134-140, Málaga, España.

Hadidi, A., R.K. Khetarpal y H. Koganezawa. 1998. Plant Virus Disease Control. APS PRESS, St. Paul, Minnesota. 864 pp.

Hari, V. 1995. The Potyviridae. *En*: Singh, R.P., U.S. Singh y K. Kohmoto (ed.). Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathology, biochemical, genetic and molecular bases. Volume 3 Viruses & Viroids, Cap 1: 1-18 pp. Elsevier Science, Inc. Tarrytown, NY, U.S.A.

Hernandez, J., G.E. Trujillo, M. Albarracin y F. Zapata. 1989. Nueva enfermedad viral afectando cucurbitáceas en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 2(1):23.

Hull, R. 2002. Matthew's Plant Virology. 4th Edition. Academic Press, Inc.

Irrizary, Juan. 1994. Comparación de prácticas de manejo en calabaza de bejuco corto y bejuco largo. Tesis de Maestro en Ciencias, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, Puerto Rico.

Kirchener-Salina, F., J. Medina-Figueroa, J.R. Madoñedo y D. B. Parson. 1981. Clasificación, morfología y fisiología. Capítulo 2. Cucurbitáceas. Editorial Trillas, SA, México, D.F.

Kyle, Molly M. 1993. Resistance to viral diseases of vegetables: genetics and breeding. Timber Press, Inc. 278 pp.

Langham M. 2003. Mechanical inoculation of plant viruses. Plant pathology: concepts & laboratory exercises, Cap 5: 33-40. CRC Press LLC.

- Larsen, L.J. 2004. The foreign born population in the United States: 2003. US Department of Commerce, Economics and Statistics Administration, US Census Bureau.
- Lecoq, H., M. Pitrat, y M. Clement 1981. Identification et caracterisation d'un potyvirus provoquant la maladie du rabougrissement jaune de melón. *Agronomie*, 1:827-837.
- Lecoq, H., G. Wisler y M. Pitrat. 1998. Cucurbit viruses: the classics and the emerging. En: J.D. McCreight (ed), *Cucurbitaceae '98: Evolution and enhancement of cucurbit germplasm*. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Lira Saade, R. 1995. Estudios taxonómicos y ecográficos de las cucurbitáceas latinoamericanas de importancia económica. *Systematic and ecographic studies on crop gene pools*, 9. Internacional Plant Genetics Resources Institute. Rome, Italy
- Lisa, V., G. Boccardo, D. Agostino, G. Dellavalle y M. Aquilio. 1981. Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. *Phytopathology*, 71:667-672.
- Lisa V., H. Lecoq. 1984. Zucchini yellow mosaic virus. *En: CMI / AAB Descriptions of Plant Viruses*, No. 282. 4. pp. Eds. A. F. Murrant and B. D. Harrison, Wellesbourne, UK: Association of Applied Biologists.
- Matthews, R.E.F. 1991. *Plant Virology*. 3th Edition, Academic Press Inc, New York. 835 pp.
- Maynard, D.N., G.W. Elmstrom, L. Wessel-Beaver y T.G. McCollam, 1992. Flowering habit, yield and fruit shape of calabaza cultigens. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 105:355-358.
- Munger, H.M y R.R. Provvidenti. 1987. Inheritance of resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita moschata*. *Cucurbit Genetics Coop. Rep.* 10:80-81.
- Murrant AF, B. Raccach, T.P. Pirone. 1988. Transmission by vectors. *En: The Filamentous Plant Viruses*, ed. RG Milne, pp. 237-73. New York: Plenum.
- Nault, L.R. 1997. Arthropod transmission of plant viruses-a new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90, 521-541.
- Nee, M. 1990. The domestication of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Economic Botany* 44(3) Supplement.
- Ng, C.K.J. y Perry, K.L. 2004. Transmission of plant viruses by aphid vector. *Molecular Plant Pathology*. 5(5): 505-511.
- Ng, C.K.J. y B.W. Falk. 2006. Virus-Vector interaction mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:183-212.
- Pachner, M. y T. Lelley. 2004. Different genes for resistance to *zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) in *Cucurbita moschata*. *En: A. Lebeda y H. S. Paris (eds.) Progress in Cucurbit*

Genetics and Breeding Research, Proc. of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, Palacky University, Olomouc, Czech Republic, pp 237-243.

Pachner, M., H.S. Paris y T. Lelley. 2011. Genes for resistance to *zucchini yellow mosaic* in topical pumpkin. The American Genetic Association. Journal of Heredity 102(3): 330-335.

Paris, H.S. 2000. First two publications by Duchesne of *Cucurbita moschata* (Cucurbitaceae). Taxon 49: 305-319.

Paris, H.S., S. Cohen, Y. Burger y R. Yoseph. 1988. Single-gene resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita moschata*. Euphytica 37:27-29.

Paris, H.S. y S. Cohen. 2000. Oligogenic inheritance for resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita pepo*. Ann. Appl. Biol., 136: 209-214.

Paz-Carrasco, L. y L. Wessel-Beaver. 2002. Survey of cucurbit viruses in Puerto Rico. En: D. N. Maynard (ed.), Cucurbitaceae 2002: 256-264. American Society for Horticultural Science Press. Alexandria, VA.

Pérez, J. E. 1963. A strain of squash mosaic virus and other cucurbit viruses found in Puerto Rico, during 1958-62. J. Agric. Univ. Puerto Rico 47:141-153.

Pirone, T.P. y K.L. Perry. 2002. Aphids: Non-persistent Transmission. Advanced in Botanical Research. 36, 1-19.

Provvidenti, R.R., R.W. Robinson, y H.M. Munger. 1978. Resistance in feral species to six viruses infecting *Cucurbita*. Plant Dis. Rep. 62:326-329.

Provvidenti, R., D. Gonsalves y H. S. Humaydan, 1984. Ocurrence of zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from Connecticut, New York, Florida and California. Plant Dis 68: 443-446.

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.

Stange, C. 2006. Interacción planta-virus durante el proceso infectivo [versión electrónica]. Ciencia e Investigación Agraria, 33(1): 3-21.

Tijssen, P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. (Burdon, R.H. & P.H. van Knippenberg, eds.). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam: 549 pp.

Van Regenmortel, M.V.V. y M.-C. Dubs. 1993. Serological procedures. Pages 159-214 in Diagnosis of plant virus diseases, edited by R.F.F. Matthews. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

- Walkey, D. 1991. Applied plant virology. 2nd edition. Chapman and Hall, NY, 338pp.
- Wessel-Beaver, L. 2005. Release of 'Soler' tropical pumpkin. J. Agric. Uni. PR. 80(3-4): 263-266.
- Wessel-Beaver, L., O. Roman y L. Flores. 2006. Performance of new tropical pumpkin genotypes under varying cultural practices. J. Agric. Univ. P.R. 90(3-4): 193-206.
- Whitaker, T. W. y G. N. Davis. 1962. Cucurbits: Botany, Cultivation and utilization. Interscience Publishing, Inc., New York, 273 pp.
- Yarden, G., R. Hemo, H. Livne, E. Maoz, E. Lev, H. Lecoq y B. Raccach. 2000. Cross-protection of cucurbitaceae from zucchini yellow mosaic potyvirus. In: N. Katzir y H. S. Paris (eds.), Proceedings of the VII Eucarpia Meeting of Cucurbit Genetics and Breeding, ISHA Acta Horticulturae 510:349-356.