

VIRUS ASOCIADOS AL MARCHITAMIENTO SÚBITO DE LA SANDÍA
(*CITRULLUS LANATUS*) EN EL SUROESTE DE PUERTO RICO

Por

Verónica Acevedo Torres

Tesis sometida en cumplimiento parcial como requisito para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
en
PROTECCIÓN DE CULTIVOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2012

Aprobado por:

Consuelo Estévez de Jensen, Ph. D.
Presidente del Comité Graduado

Fecha

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

Fecha

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

Fecha

Nanette Difffoot, Ph. D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Hipólito O'Farrill Nieves, Ph. D.
Directo Interino del Departamento

Fecha

Resumen

Las enfermedades virales son un factor limitante en la producción comercial de sandía [*Citrullus lanatus* (Thumb) Matsun & Nakai] en la zona suroeste de Puerto Rico. Muestreos realizados durante los años 2009 y 2010 determinaron que los virus de mayor prevalencia afectando al cultivo de sandía fueron *Papaya ringspot virus* (PRSV) y *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). Transmitidos por áfidos. En muestras de sandía y calabaza colectadas en Guánica, Santa Isabel, Juana Díaz y Mayagüez se identificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción al revés (RT-PCR) la presencia del *Squash vein yellowing virus* (SqVYV) como el agente causal de la marchitez súbita de la sandía. El vector responsable de la transmisión de este novel virus es la mosca blanca. Se realizaron inoculaciones con PRSV, ZYMV y SqVYV en sandía y calabaza. En sandía el SqVYV y PRSV produjeron necrosis en los cotiledones y pérdida de vigor, mientras que ZYMV en sandía produjo una clorosis general. Las inoculaciones en calabaza con PRSV y ZYMV presentaron deformación de hojas y aclaramiento de venas. En cambio el SqVYV presentó clorosis intervenal. En todas las inoculaciones mixtas realizadas en sandía se observó síntomas de marchitez, mientras que en calabaza la inoculación PRSV con ZYMV produjo necrosis en los cotiledones y falta de vigor. Entre el año 2009 al 2010 se realizaron dos experimentos para observar el efecto de barrera (sandía intercalada con sorgo o con borde de sorgo) en la incidencia de PRSV y ZYMV y SqVYV. En el 2010 sandía sorgo con borde o intercalado mostró baja incidencia de PRSV y ZYMV. Los rendimientos fueron más altos en el 2010 con una producción total de 448 kg/parcela, mientras que en el experimento del 2009 fue de 215 kg/parcela. Estos resultados demuestran que el manejo de las enfermedades virales deberá ir enfocado en el control de vectores y plantas hospederas.

Abstract

Viral diseases are a limiting factor in southwestern Puerto Rico for watermelon [*Citrullus lanatus* (Thumb) Matsun & Nakai] production. Scouting carried out in 2009 and 2010 found that *Papaya ringspot virus* (PRSV) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) were the most prevalent viruses affecting watermelon. The vectors of these *Potyvirus* are aphids. In watermelon and pumpkin samples collected in Guánica, Santa Isabel, Juana Díaz and Mayaguez *Squash vein yellowing virus* (SqVYV) was identified with Reverse Transcription Chain Polymerase (RT-PCR). This virus is the causal agent of watermelon vine decline disease, which is transmitted by whitefly. Plants of watermelon and pumpkin were inoculated with PRSV, ZYMV and SqVYV alone and in combination. In watermelon inoculated with SqVYV and PRSV necrosis occurred in the cotyledons and plants exhibited loss of vigor. General necrosis occurred in watermelon inoculated with ZYMV. Inoculations in pumpkin plants presented leaf deformation and vein clearing. In contrast, the SqVYV inoculations presented interveinal chlorosis. The mixed inoculations in watermelon plants presented wilting symptoms, while pumpkin plants inoculated with PRSV+ZYMV showed cotyledon necrosis and loss of vigor. For the years 2009 and 2010 two experiments were carried out to observed the effect of barrier crops (watermelon intercropped with sorghum and watermelon with sorghum borders) on incidence PRSV and ZYMV) and SqVYV. The data indicated that incidence of PRSV and ZYMV was less in watermelon intercropped with sorghum or with sorghum border for the 2010 experiment. The yields were more in 2010 with a total production of 448 kg/plot, compared to 215 kg/plots in 2009. These results indicate that the management of viral diseases should be focused on control of vectors and hosts plants.

*Con mucho amor y admiración dedico este trabajo a los seres
que me dieron la vida. A ellos que me han enseñado
lo importante de creer en mis capacidades,
amar a la familia, valorar el trabajo
y crecer en la perseverancia.*

Esto va dedicado a mis padres

Wilmer Acevedo Martínez y Angelita Torres Medina

¡Son mi mayor bendición!

Agradecimiento

Primeramente agradezco a Dios el motor de mi alma por el privilegio de la vida y por permitirme tener esta experiencia de vida llamada maestría. Por permitirme disfrutar de mi profesión y vocación que es la agricultura. Simplemente le agradezco por esta aventura llena de grandes enseñanzas.

Quiero agradecer de manera especial a mi consejera la Dra. Consuelo Estévez de Jensen por sus consejos y su dirección en estos años de trabajo. Su dedicación y compromiso con la agricultura y sobre todo con la fitopatología han sido mi inspiración para trazarme otras metas dentro de este campo. Por otro lado quiero agradecer grandemente a otro miembro de mi comité la Dra. Linda Wessel-Beaver, por poner su confianza en mí para llevar a cabo esta propuesta y por ser parte esencial en mis experiencias profesionales. De mí usted tiene toda mi admiración. También agradezco al Dr. Jose Carlos Rodrigues por ser parte de mi comité y brindarme de su conocimiento y tiempo para llevar a cabo los objetivos de este trabajo. Agradezco mucho sus enseñanzas y correcciones, me servirán mucho en mi camino profesional.

Es para mí de mucha importancia agradecerle a la Dra. Lydia Rivera, ya que fue la que sembró en mí el interés por la investigación en la fitopatología al darme la oportunidad de trabajar con ella a nivel subgraduado con la identificación de añublos polvorientos. También quiero agradecer a todo el personal de la Facultad de Ciencias Agrícolas que colaboraron en este trabajo, muy en especial al Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales y a las Estaciones Experimentales Agrícolas de Juana Díaz y Río Piedras. Mis más sinceras gracias a todos los agricultores que nos permitieron realizar parte de este trabajo en sus facilidades y sobre todo por regalarnos de su tiempo para atendernos cada semana.

Con gran cariño quiero agradecer a toda mi familia y amistades por ayudarme con sus palabras llenas de motivación, por sus oraciones y apoyo incondicional. En especial a mis compañeras de estudio y aventura Giseiry Rosa, Laura Bonilla, Jessica Torres, Mayra González, María Rojas y Adamaris Lamourt. Con su amistad y ayuda esta experiencia me ayudó a crecer en mi calidad humana. ¡Que mucho aprendimos una de la otra, gracias por su amistad! Por último y no menos especiales les doy todas las gracias del mundo a mis padres, a mi querida hermana Ericka Acevedo Torres y a mi amado esposo Joel Berríos Rosado, que con su apoyo y fe en mí me hicieron perseverar y dar lo mejor de mí para lograr esta meta profesional.

Esta investigación se llevo a cabo con fondos del USDA-CSREES-TSTAR Program Award No. 2008-3435-19505 (PR00TSTAR123) y (PR00TSTAR133) Program Award No. 2010-34135-21022.

Tabla de Contenido

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 1: <i>Identificación de los virus prevaletentes en el cultivo de la sandía en la zona sur-oeste de la isla e identificación a nivel molecular del agente causal de la enfermedad conocida como la Marchitez Súbita de la Sandía</i>	5
1.1 REVISION DE LITERATURA.....	6
1.1.1 <i>Papaya ringspot virus</i>	7
1.1.2 <i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	7
1.1.3 <i>Watermelon mosaic virus</i>	8
1.1.4 <i>Cucumber mosaic virus</i>	8
1.1.5 <i>Squash vein yellowing virus</i>	9
1.2 MATERIALES YMETODOS.....	11
1.2.1 <i>Recolección de plantas con síntomas virales</i>	11
1.2.2 <i>Identificación de virus por técnicas serológicas</i>	12
1.2.3 <i>Identificación del Squash vein yellowing virus mediante RT-PCR</i>	14
1.2.3.A <i>Extracción de RNA</i>	14
1.2.3.B <i>RT-PCR</i>	15
1.2.3.C <i>Protocolo para la reacción en cadena de polimerasa (PCR)</i>	15
1.2.3.D <i>Nested-PCR</i>	16
1.2.4 <i>Mantenimiento de plantas infectadas con ZYMV, PRSV y SqVYV</i>	17
1.3 RESULTADOS.....	19
1.3.1 <i>Recolección de muestras en fincas productoras de cucurbitácea</i>	19
1.3.2 <i>Evaluación de las poblaciones de vectores</i>	24
1.3.3 <i>Identificación del Squash vein yellowing virus</i>	28
1.4 DISCUSION	31
1.5 CONCLUSIONES.....	33
1.6 RECOMENDACIONES.....	34
CAPITULO 2: <i>Efecto de las interacciones virales entre Squash vein yellowing virus, Zucchini yellow mosaic virus y Papaya ringspot virus</i>	35
2.1 REVISION DE LITERATURA.....	36
2.2 MATERIALES Y METODOS.....	39
2.2.1 <i>Siembra y mantenimiento de plantas</i>	39
2.2.2 <i>Procedencia del inóculo utilizado en las inoculaciones</i>	39
2.2.3 <i>Inoculaciones mecánicas</i>	40
2.2.4 <i>Evaluaciones de síntomas y pruebas serológicas</i>	41
2.2.4.A <i>Prueba Serológica DAS-ELISA y ELISA Indirecto</i>	41
2.2.4.B <i>Detección del Squash vein yellowing virus mediante RT-PCR</i>	43
2.2.4.B.a <i>Extracción de RNA</i>	43
2.2.4.B.b <i>RT-PCR</i>	44

2.2.4.B.c <i>Protocolo para la reacción en cadena de polimerasa (PCR)</i>	44
2.2.4.B.d <i>Nested-PCR</i>	45
2.2.5 <i>Análisis Estadísticos</i>	45
2.3 RESULTADOS.....	47
2.4 DISCUSION.....	57
2.5 CONCLUSIONONES.....	60
2.6 RECOMENDACIONES.....	60
CAPITULO 3: <i>La efectividad del sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L.) como cultivo intercalado o borde en el control de las infecciones virales con ZYMV, PRSV y la Marchitez Súbita de la Sandía</i>	61
3.1 REVISION DE LITERATURA.....	62
3.2 MATERIALES Y METODOS.....	65
3.2.1 <i>Temperatura y precipitación</i>	65
3.2.2 <i>Primer experimento de campo</i>	66
3.2.3 <i>Evaluación de la población de vectores</i>	68
3.2.4 <i>Incidencia de infecciones virales</i>	68
3.2.5 <i>Segundo experimento de campo</i>	68
3.2.6 <i>Análisis Estadísticos</i>	69
3.2.7 <i>Identificación del Squash vein yellowing virus (SqVYV)</i>	69
3.3 RESULTADOS.....	70
3.3.1 Experimento 1 (diciembre del 2009 a febrero del 2010).....	70
3.3.1.1 <i>Evaluación de las poblaciones de mosca blanca y áfidos</i>	70
3.3.1.2 <i>Incidencias de virus y pruebas serológicas</i>	72
3.3.1.3 <i>Resultado de los rendimientos</i>	72
3.3.2 Experimento 2 (de mayo a agosto del 2010).....	75
3.3.2.1 <i>Evaluación de las poblaciones de mosca blanca y áfidos</i>	75
3.3.2.2 <i>Incidencias de virus y pruebas serológicas</i>	78
3.3.2.3 <i>Resultado de los rendimientos</i>	78
3.3.3 <i>Identificación del SqVYV</i>	79
3.4 DISCUSION.....	80
3.5 CONCLUSIONES.....	83
3.6 RECOMENDACIONES.....	84
LITERATURAS CITADAS.....	85

Lista de Tablas

Tabla 1. Fincas comerciales muestreadas en la zona suroeste de Puerto Rico (desde octubre, 2009 a noviembre, 2010) en diferentes etapas fenológicas del cultivo.....	12
Tabla 2. Muestras de sandía recolectadas en fincas comerciales de la zona suroeste de Puerto Rico con síntomas de la marchitez súbita de la sandía (octubre 2009 a noviembre 2010).....	20
Tabla 3. Síntomas observados en diferentes cucurbitáceas en fincas comerciales de la zona suroeste de Puerto Rico (octubre 2009 a noviembre 2010).....	21
Tabla 4. Porcentaje de muestras de sandía con una reacción positiva en las pruebas ELISA para <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV), <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV) y <i>Potyvirus</i> (POTY) de fincas comerciales de la zona suroeste de Puerto Rico (octubre del 2009 a noviembre del 2010).....	22
Tabla 5. Severidad de los síntomas de marchitez en plantas de sandía ‘Crimson Sweet’ inoculadas de forma simples y combinadas con <i>Squash vein yellowing virus</i> (SqVYV), <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-W) y <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV), a los 8 y 14 días después de la inoculación.....	50
Tabla 6. Severidad de los síntomas de marchitez en plantas de calabaza ‘Waltham’ inoculadas de forma simples y combinadas con <i>Squash vein yellowing virus</i> (SqVYV), <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV-W) y <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV) a los 8 y 14 días después de la inoculación.....	51
Tabla 7. Valores promedios de absorbancia de la prueba serológica DAS-ELISA para detectar <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV) en sandía ‘Crimson Sweet’ inoculadas con ZYMV de forma simple y mixta.....	52
Tabla 8. Valores promedios de absorbancia de la prueba serológica DAS-ELISA para detectar <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV) en sandía ‘Crimson Sweet’ inoculadas con PRSV de forma simple y mixta.....	53
Tabla 9. Valores promedios de absorbancia de la prueba serológica ELISA Indirecto para detectar potyvirus en sandía ‘Crimson Sweet’ inoculadas de forma simple y mixta con <i>Squash vein yellowing virus</i>	53
Tabla 10. Valores promedios de absorbancia de la prueba serológica DAS-ELISA para detectar <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV) en calabaza ‘Waltham’ inoculadas con ZYMV de forma simple y mixta.....	54
Tabla 11. Valores promedios de absorbancia de la pruebas serológicas DAS-ELISA para detectar <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV) en calabaza ‘Waltham’ inoculadas con PRSV de forma simple y mixta.....	54

Tabla 12. Valores promedios de absorbancia de la prueba serológica ELISA Indirecto para detectar potyvirus en calabaza ‘Waltham’ inoculadas de forma simples y mixtas con <i>Squash vein yellowing virus</i>	56
Tabla 13. Por ciento de muestras de sandía (n=8) positivas para <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV), <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV) y <i>Potyvirus</i> con sorgo intercalado (Intercalado), sandía con borde de sorgo (Borde) y sandía (Control), 14 días después del transplante (diciembre de 2009 a enero 2010) en Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 1).....	73
Tabla 14. Promedio del rendimiento comercial (kg/parcela) y número de frutos comerciales por parcela (n=4) en plantas de sandía en los tratamientos sandía sola (control), sandía intercalada con sorgo y sandía con sorgo como borde en Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 1).....	74
Tabla 15. Por ciento de muestras de sandía (n=8) positivas para <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV), <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV) y <i>Potyvirus</i> con sorgo intercalado (Intercalado), sandía con borde de sorgo (Borde) y sandía (Control), 21 días después del transplante (mayo a junio, 2010) en Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 2).....	77
Tabla 16. Promedio del rendimiento comercial (kg/parcela) y número de frutos comerciales por parcela (n=4) en plantas de sandía en los tratamientos sandía solamente(control), sandía intercalada con sorgo y sandía con sorgo como borde en el experimento 2 comenzado en mayo del 2010 en Juana Díaz, Puerto Rico.....	78

Lista de Figuras

- Figura 1. Número promedio de adultos de mosca blanca por trampas en cuatro predios de sandía (A a D) de la finca comercial “Agro-Hortalizas” en tres semanas de muestreo (octubre, 2009).....25
- Figura 2. Número promedio de adultos de mosca blanca por trampas (n=2) en dos predios de sandía de la finca comercial “Io.c.y Farm” en cinco semanas de muestreos (noviembre, 2010).....25
- Figura 3. Número promedio de adultos por trampa de mosca blanca (n=2) en dos predios de sandía de la finca comercial “Odito Farm” en seis semanas de muestreos (noviembre, 2010).....26
- Figura 4. Número promedio de adultos por trampa (n=2) de áfidos (alados) en dos predios de sandía de la finca comercial “Io.c.y. Farm” en cinco semanas de muestreos (noviembre, 2010).....26
- Figura 5. Número promedio de adultos de áfidos (alados) por trampas (n=2) en dos predios de sandía de la finca comercial “Odito Farm” en seis semanas de muestreos (noviembre, 2010).....28
- Figura 6. Fragmentos amplificados para *Squash vein yellowing virus* (SqVYV) utilizando RT-PCR y Nested-PCR en muestras recolectadas en Mayagüez (A, G, D y H), Santa Isabel (5OR, 8OR, 10-OR y 7OR) y muestras de malezas positivas a *Papaya ringspot virus* y *Zucchini yellow mosaic virus* recolectadas por la estudiante Isis López (1I y 2I). Control positivo para SqVYV colocado en el último carril. Se utilizó RNA total como molde para la amplificación con cebadores basados en la secuencia de la cápsula proteica del virus y analizada en un gel de agarosa al 1%. Marcador 1kb en el primer carril. Bandas con tamaño de 591bp corresponden a SqVYV.....29
- Figura 7. Fragmentos amplificados para *Squash vein yellowing virus* (SqVYV) utilizando RT-PCR y Nested-PCR en muestras recolectadas de Santa Isabel, Guánica y Mayagüez analizadas en un gel de agarosa al 1%. Carril 1 y 9: Marcador con un tamaño de 100bp. Carril 2, 3 y 6: Muestras donde el SqVYV no fue detectado. Carril 4, 5 y 7: Muestras con resultados positivos al SqVYV con bandas de 591bp. Carril 8: Control positivo para SqVYV.....30
- Figura 8. Síntomas observados en las hojas de calabaza y sandía luego de las inoculaciones. A. Inoculación simple con SqVYV, B. Inoculación simple con PRSV-W, C. Inoculación simple con ZYMV, D. Inoculación doble con ZYMV y PRSV-W, E. Inoculación doble con ZYMV y SqVYV, F. Inoculación doble con PRSV-W y SqVYV, G. Inoculación triple con ZYMV, PRSV-W y SqVYV y H. Síntoma típicos producido por inoculaciones simples, dobles y triples en sandía.....48
- Figura 9. Temperatura (°C) máxima, mínima y promedio en la Estación Experimental de Juana Díaz, Puerto Rico para los meses de diciembre del 2009 a agosto del 2010.....65

Figura 10. Total de precipitación en la Estación Experimental de Juana Díaz, Puerto Rico para los meses de diciembre 2009 a agosto del 2010.....	66
Figura 11. Ilustración de los tratamientos con sandía como cultivo principal y sorgo como cultivo borde e intercalado. A. Parcela con sandía e intercalado con sorgo, B. Parcela con sandía con borde de sorgo y C. Parcela control (sandía solamente).....	67
Figura 12. Promedios por trampas (n=8) de mosca blanca en etapa adulta en sandía solo (control), sandía con bordes de sorgo y sandía intercalada con sorgo 7 días después del trasplante en Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 1). Datos transformados a raíz cuadrada. Dentro de los días después del trasplante, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de acuerdo con la prueba de diferencias mínimas significativas: NS= no significativa.....	71
Figura 13. Promedios por trampas (n=8) de áfidos en etapa adulta (alados) en sandía sola (control), sandía con bordes de sorgo y sandía intercalada con sorgo 7 días después del trasplante en Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 1). Datos transformados a raíz cuadrada. Dentro de los días después del trasplante, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de acuerdo con la prueba de diferencias mínimas significativas: NS= no significativa.....	71
Figura 14. Número promedio de plantas de sandía por parcelas (n=4) con síntomas de la marchitez súbita en parcelas con sandía solamente (control), sandía con sorgo como borde y sandía intercalada con sorgo evaluadas de los 38 a los 60 días después del trasplante en Juana Díaz, Puerto Rico enero y febrero del 2010. Dentro de los días después del trasplante, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de acuerdo con la prueba de diferencias mínimas significativas: NS= no significativa.....	74
Figura 15. Promedios por trampas (n=4) de mosca blanca en etapa adulta en sandía sola (control), sandía con bordes de sorgo y sandía intercalada con sorgo 7 días después del trasplante en Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 2). Datos transformados a ln (días después del trasplante + 1). Dentro del día después del trasplante, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de acuerdo con la prueba de diferencias mínimas significativas: NS= no significativa.....	76
Figura 16. Promedios por trampas (n=4) de áfidos en etapa adulta (alados) en sandía sola (control), sandía con bordes de sorgo y sandía intercalada con sorgo 7 días después del trasplante en Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 2). Dentro del día después del trasplante, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de acuerdo con la prueba de diferencias mínimas significativas: NS=no significativa.....	76
Figura 17. Fragmentos amplificados para <i>Squash vein yellowing virus</i> por RT-PCR y Nested-PCR en muestras del experimento 2 de los tratamientos sandía solamente (C) y sandía intercalada con sorgo (I) analizadas en un gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de 100 pares de bases. Carril 2 (C): Muestra del tratamiento sandía solamente la cual amplificó para el virus	

SqVYV con un tamaño de banda de 591 bp. Carril 3 y 4: Muestra del tratamiento de sandía intercalada con sorgo la cual no amplificó bandas para el SqVYV. Carril 5: Control positivo para SqVYV la cual amplificó banda de tamaño de 591 bp.....79

Introducción

La sandía (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum. & Nakai) es un cultivo de importancia agrícola en Puerto Rico y a nivel mundial. Para el año 2009-2010 la Oficina de Estadísticas del Departamento de Agricultura de Puerto Rico, informó una ganancia de \$2,100,000 para una cosecha de 87,994 quintales de sandías (Departamento de Agricultura, 2011). El área de mayor producción de sandía en la isla esta localizada en la zona Suroeste en los Municipios de Juana Díaz, Salinas, Santa Isabel y Guánica. Esta zona corresponde a un clima de trópico seco con temperaturas promedios de 25 °C en los meses de sequía y en la época lluviosa de 26 a 37 °C. La precipitación en la época de seca es de 38 milímetros en un año mientras que en la época lluviosa es de 101 a 177 milímetros (National Weather Service Weather Forecast Office, 2009). El área suroeste de Puerto Rico es una región hortícola importante donde mayormente se cultivan cucurbitáceas las que comúnmente están afectadas por enfermedades virales. Adicionalmente, el monocultivo de sandía es generalizado en algunas fincas lo que ha provocado un aumento considerable en la población de mosca blanca, áfidos y trípodos, vectores importantes de virus.

El incremento en la incidencia y severidad de las enfermedades virales en dicha zona ha sido alarmante. La presencia de una nueva enfermedad conocida como el marchitamiento súbito de la sandía ha afectado a la mayor parte de las áreas de siembra de la sandía (Estévez de Jensen et al., 2008). Como resultado los productores han aumentado la frecuencia de las aplicaciones de insecticidas sin tener resultados en el control de las virosis ni de los vectores. En siembras de sandía, melón, calabacín y calabaza se determinó la presencia de tres virus pertenecientes a la familia de los *Potyvirus* (Rodrigues et al., 2009). Posteriormente en la misma zona se realizó una determinación de los principales virus presentes en diversas malezas y se encontró que especies como *Cucumis angurias*, *Cucumis dipsaceus*, *Cucumis verticellata*, *Ipomea ochracea*, *Ipomea*

trifolia y *Merremia umbellata* son hospederos de *Papaya ringspot virus*, *Zucchini yellow mosaic virus* y un *Potyvirus* aún no identificado en Puerto Rico (Polanco-Florián, 2009).

Diferentes virus han sido asociados a la sandía en la zona Suroeste de la Isla los cuales corresponden a *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV) y un *Potyvirus* diferente a los antes mencionados, el cual esta comúnmente presente en plantas con síntomas de marchitez (Polanco-Florián, 2009). Estos virus se han identificado a través de pruebas serológicas en plantas de sandía obtenidas de fincas comerciales. La frecuencia ZYMV y PRSV varían y los que se han asociado a la presencia del marchitamiento súbito de la sandía son el *Potyvirus* y el PRSV. Esta enfermedad fue observada por primera vez en 2004 en Santa Isabel afectando la variedad '*Royal Sweet*' (Estévez de Jensen et al., 2006). Un *Potyvirus* fue asociado al marchitamiento súbito de la sandía causando pérdidas superiores al 50% en la producción (Estevez de Jensen et al., 2008). Las pérdidas ocasionadas por la enfermedad pueden llegar al cien por ciento del total de la producción. En fincas comerciales de la zona de Santa Isabel la siembras escalonadas son muy comunes: en el 2007 más de 100 acres de sandía colapsaron en diferentes etapas de crecimiento del cultivo (Estévez de Jensen, 2008).

Los síntomas que presenta dicha enfermedad son necrosis en los entrenudos, enrollamiento de hojas, mosaicos, necrosis en los brotes nuevos, marchitez de ramas, pérdida de vigor, deformación y cese de crecimiento de los frutos y muerte de la planta. Lo importante de esta enfermedad es que los síntomas de marchitamiento se observan posteriores a la floración y se acentúan durante la etapa de formación y llenado del fruto. Esta situación provoca que las prácticas de control no se puedan llevar de una forma eficiente. Adicionalmente, los productores al no asociar los síntomas a una infección viral utilizan aplicaciones semanales de fungicidas.

En el estado de la Florida para el año 2004 se reportaron pérdidas de \$60 a \$70 millones a causa de esta enfermedad (Kousik et al., 2009). Estudios indican que el vector de la enfermedad es la mosca blanca (*Bemisia tabaci* (*Gennadius*)) (Webb et al., 2006). Esta enfermedad también esta presente en los estados de Indiana y Carolina del Sur (Kousik et al, 2009). En el estado de Indiana para el 2006 se observaron síntomas moderados la marchitez súbita de la sandía (vine decline) los cuales incluyen colapso de las venas, marchitamiento, pudrición de la raíz y ausencia de síntomas en frutos (Egel y Adkins, 2007). La identificación del *Squash vein yellowing virus* fue realizada en el laboratorio del USDA utilizando RT-PCR con cebador degenerativo y pruebas serológicas DAS-ELISA (Agdia), para la identificación del *Papaya ringspot virus*. A pesar de los resultados los investigadores indican que el SqVYV no aparenta estar relacionado con la ocurrencia esporádica de la temprana marchitez súbita que sufre la sandía (Egel y Adkins, 2007).

Debido a las pérdidas ocasionadas por el marchitamiento súbito de la sandía en Puerto Rico, es importante identificar el virus o los virus que se encuentran asociados con dicha enfermedad. Por la presencia de PRSV y ZYMV en la sandía es imprescindible determinar su efecto y conocer las diversas interacciones que se dan en la planta cuando estos virus se encuentran solos o en infecciones mixtas. Estas determinaciones ayudarán a establecer alternativas de control y manejo de los vectores. En el estado de la Florida se identificó al SqVYV como el agente causal del marchitamiento súbito de la sandía (Adkins et al., 2007). Las muestras originales de este virus afectando a la Florida fueron colectadas en Octubre del 2003 de *Cucurbita pepo*, la cual mostraba síntomas de amarillamiento en las venas. Este virus esta clasificado dentro de la familia *Potyviridae* del género *Ipomovirus* (Adkins et al, 2008). En Puerto Rico aun no se ha identificado y caracterizado a este virus y se desconoce la importancia de infecciones mixtas en la sandía. Por otro lado la identificación de virus en las diversas

cucurbitáceas que se producen en la zona y su importancia como hospederos del agente causal de la enfermedad ayudaría a la planificación de métodos culturales de control. Es importante que las áreas de producción de sandía en la zona suroeste de la isla se reestablezcan y se logre un manejo integrado y costo efectivo de los vectores y del cultivo.

Esta investigación fue realizada bajo los siguientes objetivos:

1. Identificar los virus prevalentes en la sandía en la zona Suroeste de la Isla.
2. Determinar la presencia del SqVYV en plantas afectadas con la marchitez súbita de la sandía.
3. Estudiar la interacción del agente causal de la marchitez súbita de la sandía con ZYMV y PRSV.
4. Evaluar la efectividad del sorgo (*Sorghum bicolor* L.) intercalado o como borde para el manejo de ZYMV, PRSV y la marchitez súbita de la sandía.

Capítulo 1

Identificación de los virus prevalentes en la sandía en la zona sur-oeste de la isla e identificación del agente causal de la enfermedad conocida como la Marchitez Súbita de la Sandía

1.1 Revisión de Literatura

La sandía *Citrillus lanatus* ((Thumb) Matsum & Nakai) es un cultivo sembrado en todo el mundo, el cual ocupa 2.5 millones de hectáreas las cuales producen 47.6 millones de toneladas (Marato et al., 2002). De acuerdo a su taxonomía esta hortaliza anual es una dicotiledónea de la familia de la *Curcubitaceae* y del género *Citrullus* (USDA, 2010). El crecimiento y desarrollo de los frutos esta favorecido por altas temperaturas y abundante luz solar (Mohr, 1986).

Este cultivo es nativo del África donde se produce 3.3 millones de toneladas de las cuales la mitad, 1.65 millones de toneladas, se siembran en Egipto y la otra parte en Argelia (400,000 T), Túnez (300,000 T), Marruecos, Libia, Senegal y Sudán principalmente (Maroto et al, 2002). Por otro lado en América del Norte y Centro América la superficie de cultivo es de 118,000 hectáreas teniendo un total de 2.5 millones de toneladas, de las cuales la mayoría corresponden a los Estados Unidos de América con 1.8 millones y México con 500,000 toneladas. En cuanto América del Sur la extensión sembrada de sandía corresponde a 150,000 hectáreas con una producción total de 1.5 millones de toneladas siendo el principal productor Brasil con 765,000 toneladas. En el Asia se cultivan 1.7 millones de hectáreas y la producción es de 36.3 millones de toneladas, mientras que en Europa hay 333,000 ha cultivadas con una producción total de 3.9 millones de toneladas. En Puerto Rico la sandía es una hortaliza de gran importancia agrícola en la zona sur del país (Departamento de Agricultura, 2011). De acuerdo al Departamento de Agricultura del Estado Libre Asociado de Puerto Rico, para el año 2009-10 preliminarmente se vendieron cerca de 87,994 quintales con un valor de 2,100 millones de dólares.

La sandía como otras cucurbitáceas es afectada por una gama de enfermedades virales las cuales afectan el nivel de producción de estos cultivos. Paz Carrasco y Wessel-Beaver (2002), reportaron la presencia de los potyvirus *ZYMV*, *PRSV*, *Squash mosaic virus* y *Watermelon*

mosaic virus-2 en Puerto Rico afectando diversas cucurbitáceas entre ellas la sandía. ZYMV y PRSV fueron los virus más comunes detectados en su estudio. En experimentos realizados en la Estación Experimental de Juana Díaz se identificó la presencia de los virus ZYMV, PRSV y un potyvirus no identificado afectando el cultivo de la sandía (Polanco, 2009). A continuación se describe algunas de las principales enfermedades virales que afecta a dicha hortaliza.

1.1.1 Papaya ringspot virus (PRSV)

Anteriormente conocido como *Watermelon mosaic virus 1* es predominante en la zona de los trópicos especialmente en sitios donde cultivos de cucurbitáceas están presentes todo el año (Lecoq et al., 1998). Tennant et al. (2005) informan que en 1949 Jensen realizó el primer reporte de esta enfermedad en papaya en la zona del Caribe y Smith en 1929 reconoció esta enfermedad como la razón principal para no cultivar este fruto a grandes escalas en Jamaica. Este virus pertenece al género *Potyvirus* y a la familia *Potiviridae*. El virión contiene una molécula lineal de hebra sencilla positiva de RNA y su genoma esta compuesto de 11400 nucleótidos (ICTVdB, 2006). El mismo se divide en dos tipos; PRSV-P el cual infecta a el cultivo de la papaya y el tipo PRSV-W que infecta otros cultivos distinto a la papaya (You et al., 2005). Los síntomas producidos por este agente infeccioso incluye mosaicos, deformaciones foliares severas, anillos en el fruto y grandes ampollitas. Este virus es transmitido por áfidos de manera no persistente (Lecoq et al., 1998).

1.1.2 Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)

Este virus también perteneciente a la familia *Potiviridae* fue encontrado en Puerto Rico por vez primera en el 1982 en el cultivo de melón “honeydew” (Escudero et al., 1992). A nivel mundial fue descrito por primera vez en el norte de Italia a mediados de 1970. El genoma es de una sola partícula lineal compuesta de una hebra sencilla de RNA en sentido positivo. Dicho

genoma esta compuesto de 9000 nucleótidos los cuales están parcialmente secuenciados (ICTVdB, 2006). Los síntomas de este virus son clorosis, mosaicos y deformaciones en hojas y frutos. Los vectores responsables de la transmisión viral son los áfidos y lo realizan de forma no persistente (Lecoq et al., 1998). Dentro de los hospederos se encuentran *Cucurbita pepo*, *Cucumis melon*, *Cucumis sativa* y *Citrullus lanatus* (ICTVdB, 2006).

1.1.3 Watermelon mosaic virus (WMV)

Este agente infeccioso fue reportado para los años 40 en diferentes partes del mundo (Lecoq et al., 1998). Su sintomatología es una de las más variadas en cuanto a la especie o cultivar que utiliza como hospedero. Dentro de su sintomatología se encuentra severos amarillamiento en las venas, mosaicos de color verde, deformaciones y retraso en el crecimiento de la planta. Este virus es prevaeciente en el Mediterráneo y en regiones templadas y raramente es detectado en las áreas tropicales (Lecoq et al., 1998). Es un virus de RNA de hebra sencilla de sentido positivo y esta constituido por una sola partícula. Histológicamente este virus puede ser detectado en el mesófilo y la epidermis y los viriones pueden ser encontrados en el citoplasma. Su transmisor son áfidos y por lo menos 29 especies de estos insectos transmiten el WMV. Dentro de los hospederos se encuentra *Cucurbita pepo*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Citrillus lanatus* y algunas leguminosas (ICTVdB, 2006).

1.1.4 Cucumber mosaic virus (CMV)

Este virus reportado por primera vez en Estados Unidos de América en el siglo veinte con partículas morfológicas isométricas pequeñas divididas en tres hebras sencillas de RNA. Es transmitido de manera no persistente por más de 60 especies de áfidos. El rango de hospederos infectados son más de 775 diferentes especies y más de 86 diferentes familias. Dicho virus se divide en subgrupos nombrados tipo I y tipo II y son diferenciados por su serología y

propiedades moleculares. Las cepas producen síntomas como clorosis, mosaicos blancos o amarillos, retraso en el desarrollo de la planta, tamaño reducido y distorsión de la hoja. En el fruto se produce decoloración y deformación. Sus hospederos más comunes son *Cucumis sativus*, *Lycopersicon esculentum* y *Spinacia oleracea* (ICTVdB, 2006).

1.1.5 Squash vein yellowing virus (SqVYV)

El SqVYV es un virus que se identificó a nivel molecular y biológico en el año 2006, mediante una investigación realizada durante los años 2000 al 2003 en el estado de la Florida (Adkins et al., 2007). Dicho agente infeccioso es responsable de causar unas pérdidas de más de 60 millones de dólares en el estado de la Florida (Kousik et al., 2009). Este patógeno de hebra sencilla y positiva de RNA fue clasificado dentro de la familia de los *Potyviridae* y del género *Ipomovirus*. Su vector es la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) biotipo “B”. Los síntomas de esta enfermedad es marchitamiento súbito de la planta el que se produce semanas antes de la cosecha, deformación de frutos, clorosis intervenal, quemazón en los brotes nuevos y dentro del fruto se observa un anillo de color marrón rodeando toda la pulpa del fruto. Adkins y colaboradores (2008), reportaron dos malezas como hospederos del SqVYV en el estado de la Florida. Las malezas reportadas corresponden a la familia de las *Cucurbitaceas*. Estas se identificaron como *Momordica charantia* L. y *Melonthria pendula* L., las cuales son hospederas del PRSV W. Aunque el PRSV-W es transmitido por áfidos es común observar que plantas infectadas por el SqVYV son frecuentemente infectadas con PRSV-W (Egel y Adkins, 2007). En estudios realizados en la Florida sobre el manejo de SqVYV observaron que aplicaciones de insecticidas con ingrediente activo imidacloprid en el transplante y luego aplicaciones semanales de pimetrozina redujeron el número de mosca blanca y como consecuencia la incidencia en el marchitamiento súbito de la sandía (Roberts et al., 2007). Síntomas característicos del SqVYV

como clorosis intervenal en hojas y marchitez de la planta han sido observados en siembras de cucurbitáceas en Puerto Rico, pero hasta el momento no se ha identificado a este virus como el causante de estos síntomas. También es importante indicar que los estudios de esta enfermedad en Puerto Rico deben ir acompañado de la identificación de todos los hospederos y a observar si la presencia de ZYMV y PRSV produce un sinergismo el cual produce la alteración o disminución de la enfermedad. De acuerdo a la importancia económica de la enfermedad en la Isla se realizó este estudio con la finalidad de:

1. Identificar los virus prevalentes en la sandía en la zona Suroeste de la Isla.
2. Determinar la presencia del SqVYV en plantas afectadas con la marchitez súbita de la sandía.

1.2 Materiales y Métodos

1.2.1 *Recolección de plantas con síntomas virales y muestreo de vectores.*

Se realizó una recolección de muestras de plantas de la familia Cucurbitaceae las cuales presentaban síntomas de virus que incluían marchitez, clorosis de venas, clorosis intervenal, arrugamiento de hojas y mosaicos. Durante los meses de octubre a diciembre 2010, se colectaron muestras en cinco fincas productoras de sandía en la zona Suroeste en diferentes etapas de desarrollo del cultivo. También se recolectaron muestras de plantas como el zucchini (*Cucurbita pepo* L.), calabaza (*Cucurbita moschata* (Duchesne) y pepinillos (*Cucumis sativus* L.) las cuales mostraron diversos síntomas virales. En cada finca se realizaron 3 a 6 muestreos en plantaciones que varían en cuanto a la etapa fenológica del cultivo. Se evaluó la incidencia de síntomas virales en 10 a 20 plantas en la mitad del predio. Por cada hilera se tomaron dos muestras las cuales se eligieron dependiendo de la etapa de desarrollo de la planta. En etapa antes de la floración sólo se tomaron muestras de las hojas. A los cuarenta y cinco días después del transplante se tomaron muestras de hojas y corona del tallo. Estas muestras se colocaron en fundas plásticas identificadas con fecha, lugar de muestreo, nombre de la planta y síntomas. Las muestras se trasladaron a la Clínica de Diagnóstico de la Estación Experimental de Juana Díaz en donde fueron almacenadas en 4 °C y luego se realizaron pruebas serológicas “Doble Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA)” para la identificación de PRSV y ZYMV y ELISA indirecto para potyvirus en general. Dentro de dos surcos de 6.1 m de largo establecidos en las fincas comerciales de sandía se colocaron 2 trampas cromáticas amarillas para la evaluación del número de adultos de mosca blanca y áfidos durante el período de muestreo que se tuvo en cada finca.

Tabla 1. Fincas comerciales muestreadas en la zona suroeste de Puerto Rico (desde octubre del 2009 a noviembre 2010) en diferentes etapas fenológicas del cultivo.

Finca	Municipio	Fecha	Semanas muestreadas	Etapas fenológicas del cultivo
Agro-Hortalizas (A)	Guánica	20/10/2009	3	Producción de frutos
Agro-Hortalizas (B)	Guánica	20/10/2009	3	Producción de frutos
Agro-Hortalizas (C)	Guánica	20/10/2009	3	Desarrollo foliar y floración
Agro-Hortalizas (D)	Guánica	20/10/2009	3	Desarrollo foliar y floración
Finca El Huerto	Santa Isabel	18/9/ 2009	3	Producción de frutos
MS Farm	Santa Isabel	18/9/2009	3	Producción de frutos
Ic.o.y Farm	Santa Isabel	9 /11/2010	5	Producción de fruto
Odito Farm	Santa Isabel	9 /11/2010	6	Desarrollo foliar y floración

1.2.2 Identificación de virus por técnicas serológicas

Para la identificación de los virus presentes en las muestras recolectadas se realizaron pruebas ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay): DAS-ELISA y ELISA Indirecto. El DAS-ELISA se utilizó para la identificación de PRSV y ZYMV. El ELISA Indirecto se utilizó como prueba de detección de potyvirus en muestras negativas para los virus PRSV y ZYMV.

Para ZYMV y PRSV se utilizó un “Pathoscreen Kit de ELISA de Agdia (Elkhart, Indiana). Estos kits consistieron de una microplaca plástica de polietileno que contiene 96 fosas que están sensibilizadas con el anticuerpo del virus correspondiente. Cada muestra analizada correspondió a hojas (1g) las cuales fueron maceradas con un amortiguador de extracción general, en una concentración final de 1:10. Del producto de la maceración se colocó 100µl a cada fosa y 100 µl

de un control positivo (AGDIA) y negativo (amortiguador). La placa con las muestras se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). Se realizó un lavado con el amortiguador de fosfato (PBS) y se añadió 100 μl del conjugado enzimático a una concentración de 1:100 para posteriormente incubar por 2 horas a temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). Al final se lavó la placa con el amortiguador de fosfato y se le colocó un sustrato de p-nitrofenil de fosfato (PNP), el cual al reaccionar con el conjugado desarrolla un color amarillo en aquellas muestras que fueron positivas para el virus examinado. Después de haber incubado la placa por 1 hora se colocó en un lector de microplacas (DYNATECH, MR5000, Dynex Technologies, Chantilly, VA) para leer la absorbancia a 405 nm.

Para la detección de partículas virales pertenecientes a los virus de la familia *Potyviridae* se utilizó un kit de Agdia (Elkhart, Indiana) que utiliza un ELISA indirecto. Se obtuvo una sección del tejido foliar y tallo y se colocó en una funda conteniendo amortiguador de extracción y se maceró. Se añadió 100 μl del macerado en las fosas de la micro placa plástica de polietileno y dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). Luego la micro placa fue lavada con un amortiguador de fosfato y se colocó 100 μl del anticuerpo a una concentración de 1:100 y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). Después la micro placa fue lavada con el amortiguador de fosfato y se añadió 100 μl del conjugado enzimático a una concentración de 1:100. Esto se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavó con el amortiguador de fosfato. Por último se añadió 100 μl del sustrato de p-nitrofenil de fosfato, se incubó por 1 hora. La lectura se realizó mediante el lector, DYNATECH, MR5000 (Dynex Technologies, Chantilly, VA) calibrado a una longitud de onda de 405nanómetros.

1.2.3 Identificación del SqVYV mediante RT-PCR

La identificación del SqVYV se realizó en plantas que resultaron positivas luego de ELISA indirecta y negativas en las pruebas DAS-ELISA para ZYMV y PRSV. A estas muestras se les realizaron extracciones de RNA seguida de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR, para sus siglas en inglés).

1.2.3. A Extracción de RNA

Para las extracciones de RNA se utilizó el “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen, Valencia, California) donde primeramente se maceró 0.1 gramos de tejido proveniente de tallos y hojas de muestras de sandía y calabaza con un 1ml de amortiguador de fosfato de potasio 0.02M con un pH de 7. Del producto de la maceración se colocó 1 ml en un tubo (ependorf) de 2 ml. Luego se le añadió un amortiguador RLT (RNeasy Lysis Buffer) para romper la pared celular. Se procedió a incubar por 3 minutos a 56 °C para ayudar a romper la pared celular del tejido de la planta. El producto de la lisis fue transferido a una columna violeta que se colocó dentro de un tubo de 2 ml y el mismo fue centrifugado por 2 minutos a una velocidad máxima de 15,000 rpm. Después de la centrifugación, en un tubo de 2 ml se transfirió 450 µl del supernadante, se le añadió 250 µl de etanol (96-100%), se transfirió 650 µl de este producto en la columna rosada la cual tiene un tubo de colección de 2 ml y se centrifugó por 15 segundos a una velocidad de 10,000 rpm. Luego de descartar el producto del tubo de colección, se añadió 700 µl del amortiguador RW1, se centrifugo por 15 segundos a una velocidad de 10,000 rpm y el producto del tubo de colección fue descartado. A la columna se añadió 500 µl del amortiguador RPE (amortiguador para lavar membrana donde se encuentra el RNA), se centrifugó por 15 segundos a una velocidad de 10,000 rpm y se descartó el producto del tubo de colección. Nuevamente se añadió a la columna la misma cantidad de RPE y se centrifugó por 2 minutos a una velocidad de

10,000 rpm. Por último la columna se colocó dentro de un tubo de colección de 1.5 ml y dentro de la columna se añadió 40 µl de agua libre de RNasa y se centrifugó por 1 minuto a 10,000 rpm.

1.2.3. B RT-PCR

Con el producto de la extracción de RNA se procedió a realizar un RT-PCR para obtener copias del ADN utilizando una enzima conocida como transcriptasa al revés M-MLV (Promega®, Wisconsin, USA) y un cebador conocido como hexómero al azar (random hexamer primer) (Bioline®) con una secuencia de 5'-d(NNNNNN)-3' donde N es igual a G,A,T o C. Para este cebador se utilizó un ciclo en el termociclador (Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler) de 60 minutos a 37°C, 5 minutos a 99°C y 4°C infinito (*Promega Protocol*). Por otro lado se utilizó otro cebador conocido como oligonucleótido donde se utilizó un ciclo en el termociclador de 45°C por 30 minutos, 99°C por 5 minutos y 4°C infinito (*Promega Protocol*). Estos productos mencionados anteriormente se utilizaron en una mezcla de 7.25µl de agua libre de nucleasas, 4µl del amortiguador 5x M-MLV, 4µl de cloruro de magnesio a 25Mm, 2µl de d-NTP a 10µM, 1 µl de uno de los dos cebadores (hexómero ó oligonucleótido), 0.50µl de inhibidor de RNasa (Promega®), 0.25µl de la transcriptasa al revés y 2µl de c-DNA antes de colocarse en el termociclador (Promega Protocol). El producto final fue almacenado a una temperatura de -20°C.

1.2.3. C. Protocolo para la reacción en cadena de polimerasa (PCR)

El PCR se realizó utilizando c-DNA total genómico obtenido del RT-PCR. En el PCR se utilizó una reacción de 12.5µl “ Promega PCR Master Mix”, 5.5µl de agua libre de nucleasas, 2.5µl del cebador 5'CCCTCGGAGAACTTGATATGGAAGCAC-3' a 25 µMol, 2.5 µl del cebador 5'CGCGTCCTTCCTCTCCAGGCGCT G-3' (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) a 25µMol. Se utilizó un termociclador (Applied Biosystem 2720 Thermal

Cycler). Los ciclos y tiempo de amplificación utilizados fueron de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos para la desnaturalización, 63°C por 45 segundos para la unión de los cebadores “annealing” y 72 °C por 45 segundos para la extensión de DNA (*Adkins et al., 2008*). El volumen total de la reacción de PCR fue de 20 µl conteniendo las primeras concentraciones de DNA del SqVYV. Los productos de la amplificación del PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido de bromuro de etidio. Se realizó una electroforesis a 100V durante 45 minutos, utilizando el amortiguador Tris EDTA 1X (Sigma®, St. Louis, MO). Para la observación de bandas en el gel, se utilizó un visualizador de rayos ultravioletas (GelDoc-It® Imaging System). El tamaño de las bandas fue comparado con una escalera de peso molecular de 1kb y 100 bp (Sigma, St. Louis, USA). Los productos del PCR fueron almacenados a -20°C para ser utilizados en el Nested-PCR.

1.2.3. D. *Nested-PCR*

Para realizar el Nested-PCR se utilizó el producto obtenido del primer PCR (paso descrito anteriormente). Este producto fue utilizado en dos diferentes diluciones 1:10 y 1:100. Dichas diluciones se realizaron colocando 1µl del producto del PCR y 9µl de agua libre de nucleasas para obtener la dilución 1:10. Mientras que para la dilución 1:100 se colocó 1µl del producto del primer PCR y 99µl de agua libre de nucleasas. Para la reacción en el termociclador se utilizó 12.5µl “Promega PCR Master Mix”, 5.5µl de agua libre de nucleasas, 2.5µl del cebador 5’GCGGGTGAGAAAACCAAGAAGAGACCG-3’ a una concentración de 25µMol, 2.5µl del cebador 5’-CTTCCTCATGGTTGGGAGAGCATG-3’ (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) a una concentración de 25µMol y 2µl del producto del primer PCR teniendo al final un volumen total de 25µl. El programa del termociclador fue de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos para la desnaturalización de la doble hebra de DNA molde, 63°C por 30 segundos para

la unión de los cebadores a la región específica del DNA molde y 72 °C por 30 segundos para la extensión o síntesis de DNA (Adkins et al., 2008). Los productos del PCR se visualizaron utilizando bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1% en un iluminador de rayos ultravioletas (GelDoc-It® Imager, Ultra-Violet Products, Upland, California). El producto de las amplificaciones fueron purificadas utilizando el estuche “Gel Extraction Kit, Quiaquick®”. La purificación de los productos del PCR y la secuenciación de la capa proteica del virus se realizó en las facilidades de Secuenciación y Genotipificación de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Río Piedras (Sequencing and Genotyping facility, University of Puerto Rico–Río Piedras). Para la secuenciación se utilizaron los cebadores del Nested-PCR. Las secuencias se alinearon utilizando el programa Sequencher, versión 4.5 (www.genecodes.com). Una vez alineadas se compararon sus homologías con otras especies a través de la base de datos existente en el Centro Nacional para Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information). El programa utilizado para dicha comparación fue BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

1.2.4 *Mantenimiento de plantas infectadas con ZYMV, PRSV y SqVYV*

Se germinaron semillas de sandía de la variedad ‘Crimson Sweet’ y de calabaza ‘Waltham’. Las plantas fueron germinadas en los invernaderos del Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales del Recinto Universitario de Mayagüez. Para la germinación se utilizó un sustrato estéril a base de turba “Premier Pro-Mix, BX” (Premier Hort Inc., Quakertown, PA) con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (radiación solar). Las plantas fueron regadas con agua diariamente y cada tres semanas las mismas fueron abonadas con un fertilizante con formulación 20-20-20. Desde su germinación las plantas fueron cubiertas por una malla para evitar la entrada de insectos. Las mismas se inocularon a los 21 días luego de la

germinación en los cotiledones y la primera hoja verdadera con tejido previamente infectado con ZYMV, PRSV y SqVYV obtenida de los muestreos (usado para el SqVYV) o material de hojas liofilizadas (usado para PRSV y ZYMV) procedente del Laboratorio de Virología del Recinto de Río Piedras. Para la inoculación mecánica con el SqVYV se utilizó un amortiguador de fosfato de sodio con un pH de 7. Al mismo se le añadió 0.1% de sulfato de sodio y 1% de Celite (*Adkins et al., 2008*). Para las inoculaciones con ZYMV y PRSV se utilizó un amortiguador de fosfato a 0.02M con un pH de 7. En el momento de realizar dichas inoculaciones se usó un abrasivo conocido como carborúndum, el cual contiene partículas pequeñas de carbón. Este fue colocado en la superficie de la hoja para producir micro heridas y así facilitar la entrada de las partículas virales contenidas en el amortiguador (*Mahgoub et al., 2003*).

1.3 Resultados

1.3.1 *Recolección de muestras en fincas productoras de cucurbitáceas*

Los síntomas de la marchitez súbita de la sandía fueron observados en plántulas jóvenes (desarrollo foliar y floración) y adultas (desarrollo de frutos) (Tabla 2). En plantaciones con 11 y 15 días luego del transplante (Agro-Hortaliza predio D y Odito Farm) no se observó la marchitez súbita de la sandía en las plantas muestreadas. En siembras con 18 a 35 días luego del transplante (Agro-Hortaliza B y C, Odito Farm y MS Farm) la incidencia de esta enfermedad fluctuó entre 20% a 40% de las plantas muestreadas. Por otro lado en predios con 30 a 60 días luego del transplante (Io.c.y Farm predio A y B y Finca El Huerto) la incidencia fue de 70 a 80% en las plantas muestreadas.

El tiempo en que un predio alcanzó una incidencia de 100% de marchitez fue variable. En “Odito Farm” el tiempo fue de 29 días luego del transplante, 41 días luego del transplante en Agro-Hortaliza predio A, 37 días luego del transplante en Io.c.y Farm y 75 días luego del transplante en “Finca El Huerto” (Tabla 2).

Síntomas observados en las fincas comerciales y los resultados de las pruebas serológicas variaron de acuerdo a la etapa del cultivo (Tablas 3 y 4). En “Agro-Hortalizas” ubicada en Guánica, plantas a los 11 y 18 días luego del transplante presentaron síntomas de clorosis foliar y hojas erectas. Las pruebas ELISA realizadas en plantas de sandía con 11 días luego del transplante fueron negativas para los virus de ZYMV y PRSV, pero el 100% de estas fueron positivas a la prueba de ELISA Indirecto para potyvirus. El 100% de las plantas con 18 días luego del transplante resultaron positivas para PRSV y potyvirus y negativas para ZYMV. Para plantas a los 35 días luego del transplante los síntomas observados fueron reducción del área

Tabla 2. Muestras de sandía recolectadas con síntomas de la marchitez súbita de la sandía en fincas comerciales de la zona suroeste de Puerto Rico (octubre 2009 a noviembre 2010).

Finca	Días luego del trasplante	Porcentaje de muestras de sandía con síntomas de marchitez súbita
Agro-Hortalizas (Predio D)	11	0
Odito Farm (Predio A)	15	0
	22	40
	29	100
Odito Farm (Predio B)	15	0
	22	30
	29	100
Agro-Hortalizas (Predio C)	18	20
MS Farm	30	30
Io.c.y Farm (Predio A)	30	70
	37	100
Io.c.y Farm (Predio B)	30	80
	37	100
Agro-Hortalizas (Predio B)	35	30
Agro-Hortalizas (Predio A)	41	100
El Huerto	60	80
	75	100

Tabla 3. Síntomas observados en diferentes cucurbitáceas en fincas comerciales de la zona suroeste de Puerto Rico (octubre 2009 a noviembre 2010).

Finca	Especie de cucurbitácea	Síntomas
Agro-Hortalizas	Sandía	Clorosis intervenal Necrosis en brotes florales jóvenes Hojas nuevas y viejas enraizadas Deformación de frutos Mancha necrótica en el tallos
Finca El Huerto	Sandía	Clorosis intervenal Marchitez Hojas nuevas y viejas enraizadas Deformación de frutos
“MS” Farm	Sandía Pepinillo Zucchini Calabaza	Hojas nuevas y viejas enraizadas Clorosis general Clorosis intervenal Ampollas verdes en las hojas Enanismo Deformación de frutos Marchitez
Io.c.y Farm	Sandía	Hojas nuevas y viejas enraizadas Manchas cloróticas en el borde de la hoja Clorosis intervenal Marchitez
Odito Farm	Sandía	Mosaico Clorosis intervenal Marchitez

Tabla 4. Porcentaje de muestras de sandía con una reacción positiva en las pruebas ELISA para *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV) y *Potyvirus* (POTY) de fincas comerciales de la zona suroeste de Puerto Rico (octubre del 2009 a noviembre del 2010).

Finca	Días luego del transplante	ZYMV	PRSV	POTY
Agro-Hortalizas (Predio D)	11	0%	0%	100%
Odito Farm	15	29%	0%	100%
Agro-Hortalizas (Predio C)	18	0%	100%	100%
MS Farm	30	0%	75%	100%
Io.c.y Farm	30	12%	50%	100%
Agro-Hortalizas (Predio B)	35	50%	100%	100%
Agro-Hortalizas (Predio A)	41	100%	100%	100%
El Huerto	60	11%	75%	100%

foliar, clorosis intervenal y brotes nuevos de crecimientos necróticos. Los resultados de las pruebas ELISA en el total de muestras examinadas fue de 100% positivas para PRSV y 50% para ZYMV. Todas las muestras fueron positivas para potyvirus. Se observó clorosis intervenal, brotes nuevos de crecimiento necróticos y reducción en el tamaño del fruto en plantas a los 41 días luego del trasplante. Las pruebas serológicas DAS-ELISA y ELISA indirecto en las muestras recolectadas (41 días luego del trasplante) resultaron 100% positivas para PRSV, ZYMV y potyvirus.

En la finca “MS Farm” en Santa Isabel plantas de 30 días luego del trasplante presentaron síntomas de hojas cloróticas y erectas. Para la segunda evaluación (37 días luego del trasplante) los síntomas observados fueron clorosis intervenal y deformación de frutos. En el último muestreo (44 días luego del trasplante) se observaron los mismos síntomas además de brotes nuevos de crecimiento necróticos y manchas necróticas en el tallo. En cuanto a los resultados de las pruebas DAS-ELISA se obtuvo que 75% de las muestras fueron positivas a PRSV, mientras que en las mismas no se detectó ZYMV. También 100% de estas fueron positivas a *Potyvirus*. Por otro lado muestras de calabaza colectadas en la finca “MS Farm” fueron negativas para ZYMV y PRSV a pesar de mostrar síntomas de ampollas verdes. Estas mismas resultaron positivas a la prueba de *Potyvirus*. Los mismos resultados fueron obtenidos en muestra de hojas de zucchini con síntoma de clorosis intervenal y muestra de hojas de pepinillo con síntoma de clorosis.

En la finca “El Huerto” síntomas de hojas cloróticas, hojas erectas y marchitez de la planta fueron observados desde la primera evaluación a los 60 días luego del trasplante. Las pruebas serológicas realizadas a las plantas recolectadas fueron positivas a PRSV en un 75%, positivas a ZYMV en un 11% y 100% positivas a la prueba de potyvirus. Por otro lado las

plantas recolectadas en la finca “Io.c.y Farm” (30 días luego del trasplante) mostraron desde la primera evaluación síntomas de clorosis intervenal, hojas erectas, manchas cloróticas en los bordes de las hojas y marchitez de la planta. Los resultados de las pruebas serológicas de las muestras recolectadas para ambos predios resultaron en 50% positivos para PRSV, 12% positivas para ZYMV y 100% positivas para potyvirus. Plantas recolectadas en la finca “Odito Farm” (15 días luego del trasplante) no mostraron síntomas virales en la primera evaluación. Sin embargo de la segunda hasta la quinta semana de evaluación se observaron síntomas de hojas erectas, ampollas verdes y clorosis en las puntas de las hojas. Para la última semana de evaluación (57 días luego del trasplante) se observaron síntomas de clorosis intervenal y marchitez. Los resultados de las pruebas serológicas del total de muestras colectadas en ambos predios indicaron que 29% de las muestras fueron positivas a ZYMV. Todas las muestras fueron negativas a PRSV y positivas a potyvirus.

1.3.2 Evaluación de las poblaciones de vectores

Las poblaciones de mosca blanca fluctuaron de manera diferente en los predios muestreados de la finca “Agro-Hortalizas” durante las tres semanas de muestreo (Fig. 1). El número de adultos de moscas blancas por trampa de los predios A (plantas de 4 días luego del trasplante) y B (plantas de 12 días luego del trasplante) fue similar durante el período de muestreo. Durante la primera semana se registraron 5 a 13 adultos por trampa. El número de adultos disminuyó en la segunda semana y luego subió de nuevo en la tercera semana de muestreo. Por otro lado, el predio C con plantas de 29 días luego del trasplante tuvo 11 mosca blanca en la primera semana, 39 en la segunda semana (39 adultos por trampa) y 9 en la tercera semana. En el predio D (plantas con 34 días luego del trasplante) se observó que las poblaciones de mosca blanca tuvieron un comportamiento muy diferente a los demás predios.

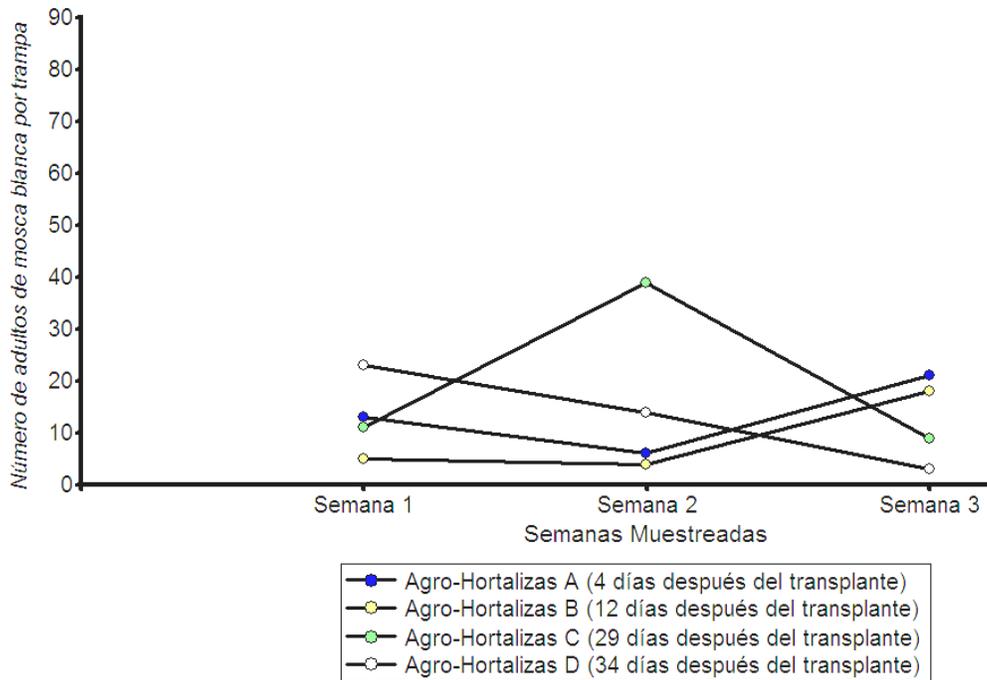


Figura 1. Número de adultos de mosca blanca por trampa en cuatro predios de sandía (A a D) de la finca comercial “Agro-Hortalizas” en tres semanas de muestreos (octubre, 2009).

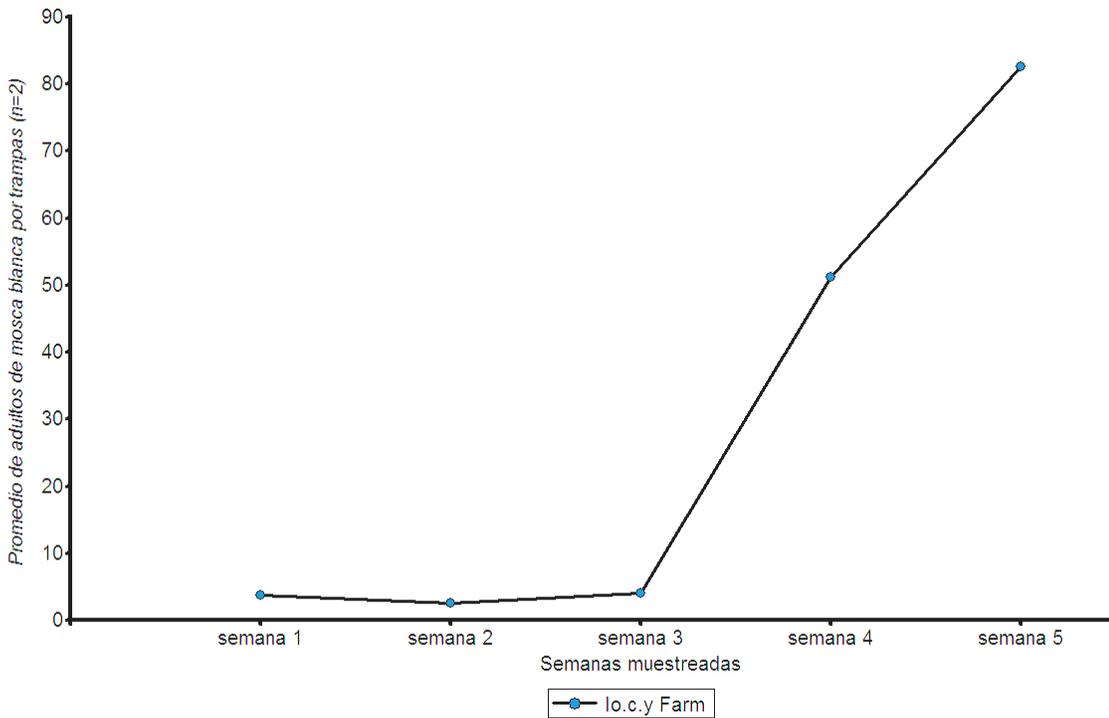


Figura 2. Número promedio de adultos de áfidos por trampas (n=2) en dos predios de sandía de la finca comercial “Io.c.y Farm” en cinco semanas de muestreos (noviembre, 2010).

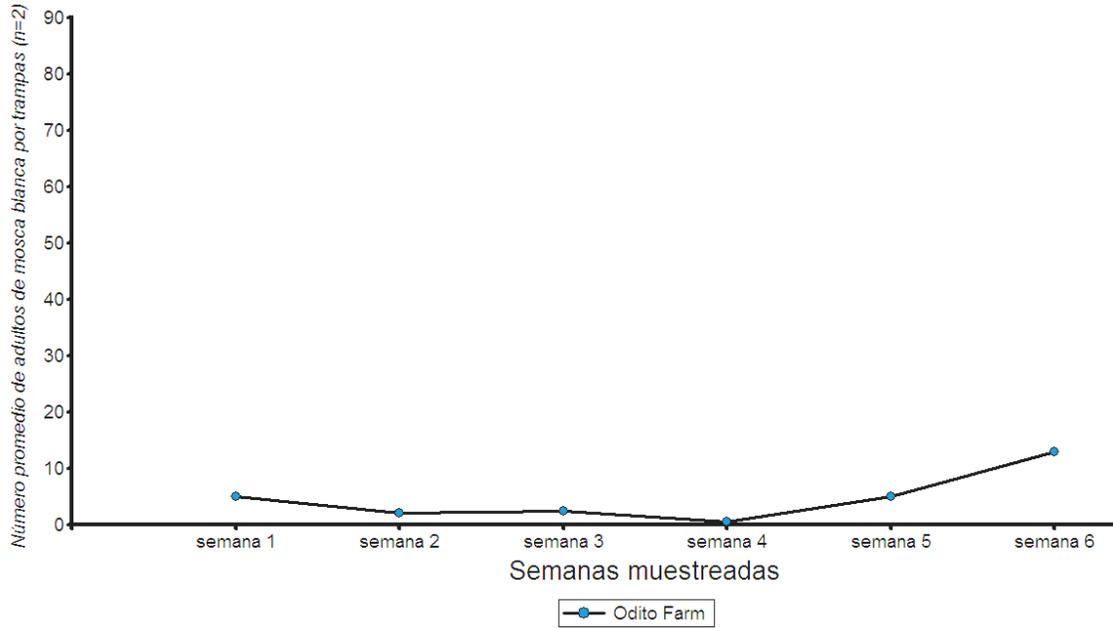


Figura 3. Número promedio de adultos por trampas (n=2) de mosca blanca en dos predios de sandía de la finca comercial “Odito Farm” en seis semanas de muestreos (noviembre, 2010).

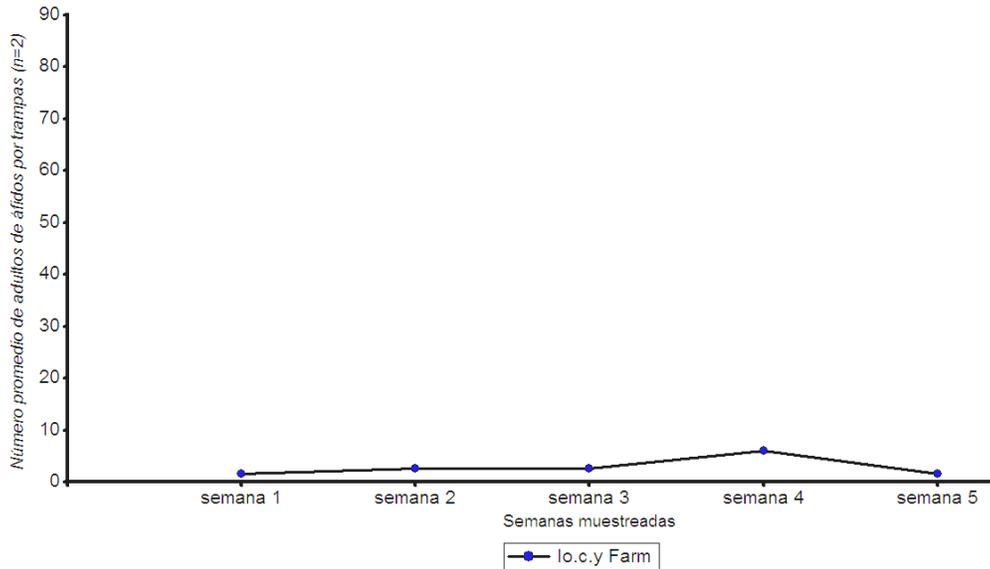


Figura 4. Número promedio de adultos por trampa (n=2) de áfidos (alados) en dos predios de sandía de la finca comercial “Io.c.y. Farm” en cinco semanas de muestreos (noviembre, 2010).

La población disminuyó según transcurrieron las semanas. En la primera semana hubo un total de 23 adultos por trampa; a la tercera semana hubo solamente 3 adultos por trampa.

En Io.c.y Farm las poblaciones de adultos de mosca blanca se mantuvieron constantes durante las primeras tres semanas (Fig. 2). En estas tres primeras semanas se observó la menor población de mosca blanca con promedios de 3.7 la primera, 2.5 la segunda y 4 la tercera semana. Para la cuarta y quinta semana se observó un aumento de 51.1 en la cuarta semana y 82.5 en la quinta semana.

El número promedio de adultos de mosca blanca por trampa en la finca “Odito Farm” con plantas de 15 días después del transplante fue variable (Fig.3) En la primera semana hubo un promedio de 5 adultos. Durante la segunda semana el número de adultos disminuyó, pero luego aumentaron en la tercera semana. La cuarta semana presentó las poblaciones más bajas con 0.5 adultos. En la quinta y sexta semana las poblaciones aumentaron de 5 a 13 adultos, respectivamente.

Las poblaciones de áfidos alados por trampa en la finca “Io.c.y Farm” mostraron tendencia a aumentar con el tiempo. Esta tendencia la hubo de la primera a la cuarta semana con poblaciones que comenzaron en 1.5 y aumentaron a 6 áfidos alados. El número de áfidos alados en la quinta semana se redujo a la misma cantidad de la primera semana.

Por otro lado el número promedio de áfidos alados por trampa en la finca “Odito Farm” aumentó de 2 a 5.5 de la primera a la segunda semana de muestreo. En la tercera semana el número promedio de áfidos alados disminuyó y luego aumento en la cuarta semana a 5.5. Las últimas dos semanas las poblaciones de áfidos alados por trampa disminuyeron hasta 2.5.

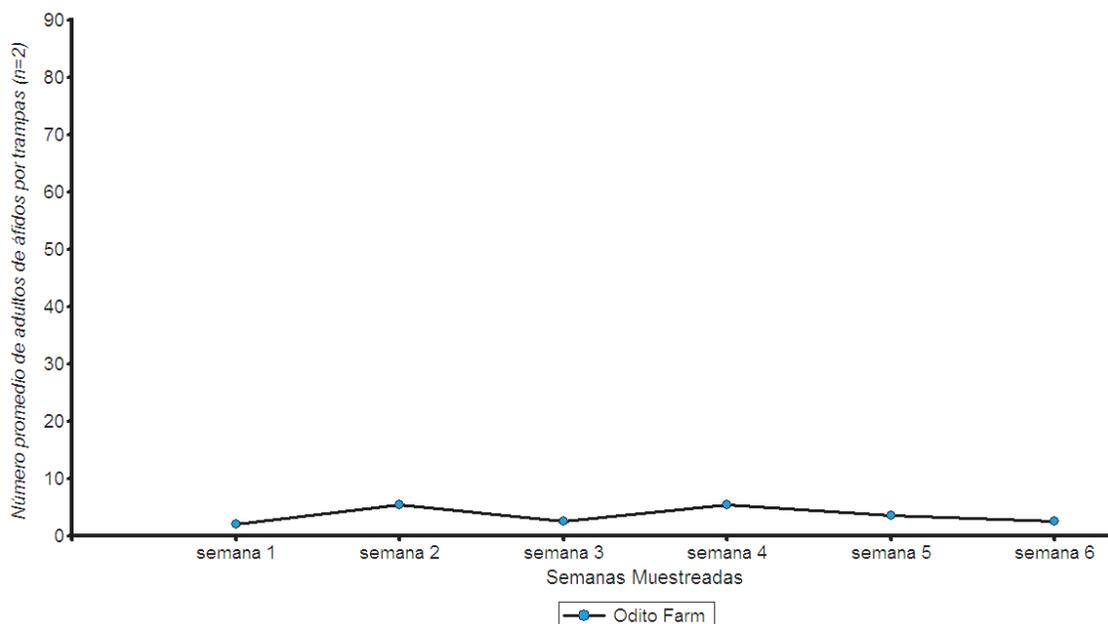


Figura 5. Número promedio de adultos de áfidos (alados) por trampas (n=2) en dos predios de sandía de la finca comercial “Odito Farm” en seis semanas de muestreos (noviembre, 2010).

1.3.3 Identificación del SqVYV

El procedimiento del Nested-PCR utilizando cebadores específicos amplificó bandas de 591 pares de bases para el SqVYV (Fig 6 y 7). Las muestras que amplificaron fueron de muestreos en las fincas Odito Farm en Santa Isabel y Agro-Hortalizas, en Guánica y en Mayagüez. Estos resultados fueron posibles utilizando cebadores específicos de SqVYV en el Nested PCR. Las diluciones 1:10 realizadas con el primer producto del PCR utilizadas como plantilla para el Nested-PCR fueron las que amplificaron bandas positivas para el SqVYV. Al secuenciar los productos del RT-PCR se obtuvo 99.9% de similitud con el SqVYV (Genbank, 2011), confirmando así la presencia del SqVYV como agente causal de la marchitez súbita de la sandía en Puerto Rico.

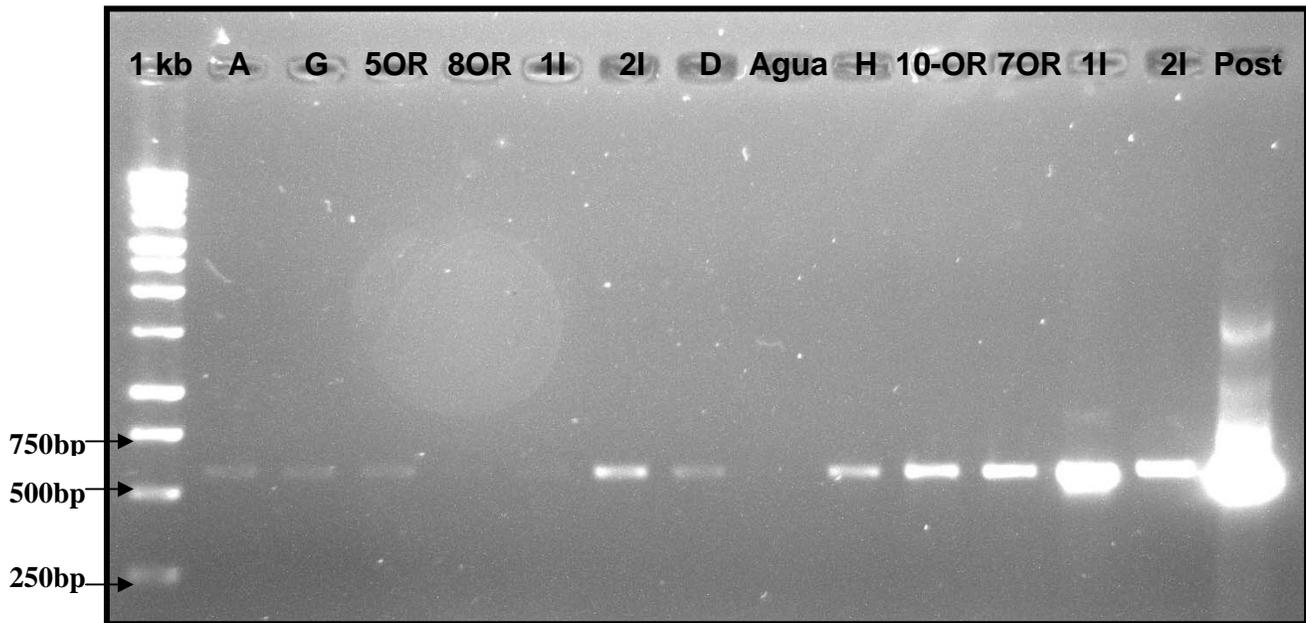


Figura 6. Fragmentos amplificados para *Squash vein yellowing virus* (SqVYV) utilizando RT-PCR y Nested-PCR en muestras recolectadas en Mayagüez (A, G, D y H), Santa Isabel (5OR, 8OR, 10-OR y 7OR) y muestras de malezas positivas a *Papaya ringspot virus* y *Zucchini yellow mosaic virus* recolectadas por la estudiante Isis López (1I y 2I). Control positivo para SqVYV colocado en el último carril. Se utilizó RNA total como molde para la amplificación con cebadores basados en la secuencia de la cápsula proteica del virus y analizada en un gel de agarosa al 1%. Marcador 1kb en el primer carril. Bandas con tamaño de 591bp corresponden a SqVYV.

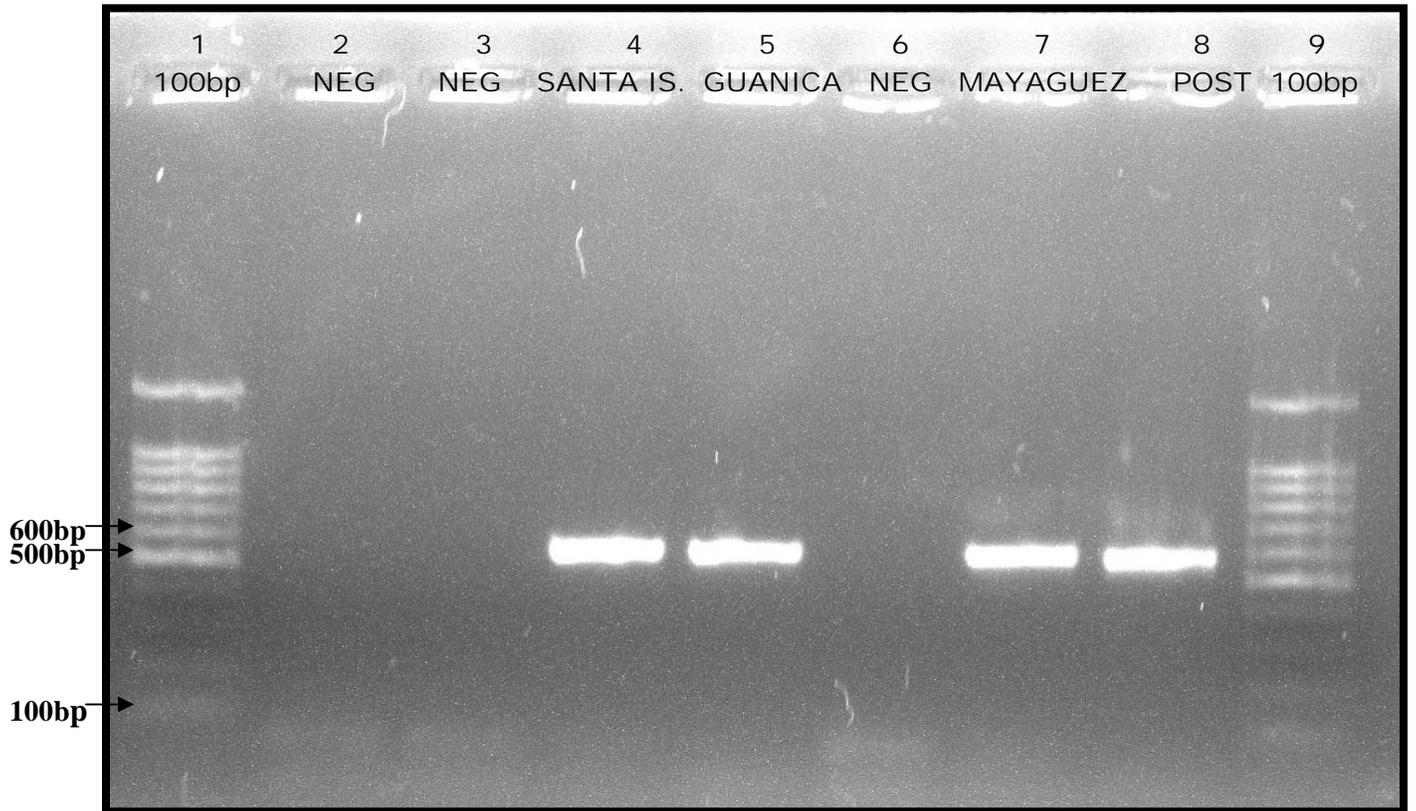


Figura 7. Fragmentos amplificados para *Squash vein yellowing virus* (SqVYV) utilizando RT-PCR y Nested-PCR en muestras recolectadas de Santa Isabel, Guánica y Mayagüez analizadas en un gel de agarosa al 1%. Carril 1 y 9: Marcador con un tamaño de 100bp. Carril 2, 3 y 6: Muestras donde el SqVYV no fue detectado. Carril 4, 5 y 7: Muestras con resultados positivos al SqVYV con bandas de 591bp. Carril 8: Control positivo para SqVYV.

1.4 Discusión

El estudio de la etiología de la marchitez súbita de la sandía presentó limitaciones debido a la presencia de otros virus infectando al cultivo. Los síntomas característicos de la enfermedad fueron la marchitez y muerte repentina de las plantas durante la época de llenado de frutos. En este estudio se identificó al SqVYV luego de la secuenciación del producto del Nested-PCR obtenido de muestras de sandía con marchitez súbita. El análisis con Blast mostró una homología del 99% con SqVYV aislado “WM 2008c Ha polyprotein gene, parcial cds”. La presencia del SqVYV se detectó en plantas de sandía variedad ‘Star Bright’ en fincas productoras como “Odito Farm” en Santa Isabel y Agro-Hortalizas en Guánica. En “Odito Farm” los síntomas de marchitez se observaron desde los 22 días luego del transplante. Sin embargo la detección del virus se realizó en plantas de 57 días del transplante. Estas plantas mostraron síntomas de clorosis intervenal, hojas erectas y amarillamiento limitado a los bordes de las hojas. La presencia de la mosca blanca es común en siembras de cucurbitáceas en esta zona. Reportes de la enfermedad en estados como Florida, Indiana y Carolina del Sur asocian al SqVYV con síntomas de clorosis intervenal y marchitez (Adkins et al., 2010). Por otro lado este virus fue identificado en calabaza “Waltham” en invernaderos de Mayagüez donde los síntomas fueron aclaramiento de las venas y clorosis intervenal. Donde la presencia del vector es común por la siembra de cucurbitáceas en esta zona.

La existencia de hospederos alternos como malezas puede resultar en reservorios para el virus en ausencia del cultivo. Resultados obtenidos en el estado de la Florida detectaron el SqVYV en plantas de cucurbitáceas dentro de los géneros de *Cucurbita*, *Luffa*, *Cucumis* y *Citrullus* (Adkins et al., 2008).

En los muestreos realizados en las fincas comerciales de sandía también se detectó la presencia de ZYMV y PRSV los cuales también pertenecen a la familia de los *Potyviridae* al igual que el SqVYV. La presencia de estos dos virus (ZYMV y PRSV) en las fincas comerciales visitadas fue variable, ya que en mucha de las muestras no siempre que PRSV estaba presente ZYMV se detectó y viceversa. Para el 2007, se reportaron que un 90% de muestras recolectadas en la zona sur de Puerto Rico tuvieron resultados positivos para potyvirus incluyendo PRSV, ZYMV y un virus no identificado perteneciente a este mismo género (Rodrigues et al., 2007). En este estudio síntomas como mosaicos, ampollas verdes y clorosis en el borde de la hoja fueron prevalecientes en muestras positivas a PRSV y ZYMV.

Los resultados de las pruebas serológicas como la de los muestreos de mosca blanca y áfido sugieren la posibilidad de que estos vectores sean los transmisores de SqVYV, PRSV y ZYMV. Esto debido a que desde la primera semana de muestreo se observaron dichos vectores en etapa adulta.

De acuerdo a los resultados de las pruebas DAS-ELISA se encontró que plantas recolectadas en las fincas visitadas tuvieron presencia de ZYMV o PRSV y mediante RT-PCR y Nested-PCR se confirmó la presencia de SqVYV. En el estado de la Florida donde fue identificado por primera vez el SqVYV se encontraron con frecuencia infecciones mixta del SqVYV con PRSV, y otros dos virus transmitidos por mosca blanca *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV) y *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) (Kousik et al., 2010).

1.5 Conclusiones

1. Los resultados de las secuenciaciones del producto de Nested-PCR indican que el SqVYV se detectó en muestras de sandía recolectadas en fincas comerciales localizadas en la zona sur (Santa Isabel) y suroeste (Guánica) de Puerto Rico. Además el SqVYV fue identificado en muestras de calabaza recolectadas en Mayagüez.
2. Los síntomas de clorosis intervenal y marchitez súbita fueron comúnmente observados en las muestras donde se identificó el SqVYV.
3. Técnicas moleculares como el RT-PCR, Nested PCR y secuenciación del producto final del Nested-PCR fueron efectivas para la identificación del SqVYV.
4. Los resultados de serología indican que la presencia de los virus ZYMV y PRSV son comúnmente encontrados afectando las siembras de sandía a nivel comercial.

1.6 Recomendaciones

1. Realizar muestreos en la zona norte de Puerto Rico específicamente en siembras de cucurbitáceas como sandía y calabaza para evaluar la incidencia de PRSV, ZYMV y SqVYV.
2. En las mismas zonas donde se identificó el SqVYV realizar muestreos con el fin de detectar otros virus del género *Ipomovirus* como *Cucurbit vein yellowing virus*, los cuales son transmitidos por mosca blanca y que aún no se han reportado en Puerto Rico.
3. Establecer un plan en conjunto con los agricultores para monitorear y controlar hospederos alternos como lo son las malezas, ya que se ha reportado la presencia de los virus reportados en este estudio infectando diversidad de estas.
4. Educar a los agricultores para que puedan mejorar sus técnicas de control de plagas para evitar el desarrollo de resistencia de los vectores a los insecticidas y aumentar las poblaciones de enemigos naturales.

Capítulo 2

*Efecto de las interacciones entre Squash vein yellowin virus, Zucchini
yellow mosaic virus y Papaya ringspot virus*

2.1 Revisión de Literatura

Las infecciones mixtas de virus de plantas, relacionadas o no relacionadas son comunes y estas frecuentemente resultan en una mayor severidad de la enfermedad (Wang et al., 2009). Cuando la planta es infectada simultáneamente por distintos virus o por diferentes cepas de un mismo virus en un mismo hospedero se conoce como una co-infección viral (Untiveros et al., 2007). De ocurrir una co-infección en la planta los virus no necesariamente tienen que interactuar. La no interacción o neutralismo permite a los virus su replicación, acumulación y su transmisión sin influir en los demás virus. Pero una co-infección viral puede interactuar de una manera antagonista o sinergista. Dichas reacciones son encontradas frecuentemente en la naturaleza con consecuencias patológicas impredecibles (García-Cano et al., 2006). Si la infección o acumulación de uno de los virus involucrados es completa o parcialmente reducida, el antagonismo toma nombre de protección cruzada. Esto ocurre con cepas del mismo virus o con virus estrechamente relacionados (Untiveros et al., 2007).

Se ha reportado que las interacciones sinérgicas resultan de infecciones mixtas con dos o más virus. En muchos casos esto resulta en un aumento de las concentraciones de uno o de todos los virus y los síntomas pueden aumentar (García-Cano et al., 2006). El sinergismo que surge entre virus puede afectar varios parámetros de crecimiento como la altura de la planta, peso y rendimiento y puede ser expresado por los grados de severidad en los síntomas. En casos extremos estas reacciones sinérgicas pueden producir la muerte de la planta. El mecanismo ha sido ampliamente estudiado en diferentes sistemas de patógeno-hospedero (Untiveros et al., 2007). Al presente diversas investigaciones han probado que ciertas proteínas son consideradas las responsables de que ocurra sinergismo, ya que son capaces de suprimir los genes de silenciamiento postranscripcionales (PTGS) a diferentes niveles. El mejor ejemplo sobre estudio

de sinergismos en infecciones virales mixtas es de los potyvirus *Potato virus Y* (PVY) el cual aumenta la replicación de *Potato virus X* (PVX) (Wang et al., 2009; Vance et al., 1995). Trabajos de investigación demostraron que la actividad del supresor del silenciamiento del potyvirus codificado aumento la concentración de PVX adicional a la producción de la proteína HC-Pro envuelta en el movimiento de célula a célula del virus la cual fue suficiente para producir estos efectos (Wang et al., 2009; Anandalakshmi et al., 1998). Otro ejemplo muy importante son las interacciones sinérgicas que ocurren entre el virus *Sweet potato chlorotic stunt virus* del género *Crinivirus* y *Sweet potato feathery mottle virus* del género *Potyvirus*, siendo esta interacción una de las más importantes que afectan al cultivo de la batata a nivel mundial (Untiveros et al., 2007). En el estado de la Florida en plantas de sandía sea identificado la presencia simultanea del *Squash vein yellowing virus* junto con *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLrCrV) y *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) los cuales son transmitidos por mosca blanca (Adkins et al., 2010; Akad et al., 2008; Polston et al., 2008). Estos virus que son transmitidos por mosca blanca son frecuentemente encontrados en infecciones mixtas con virus transmitidos por áfidos como el *Papaya ringspot virus* (PRSV-W) (Kousik et al., 2010). Por otro lado un estudio realizado en Puerto Rico en el 2002, determinó que un 75% de las muestras de cucurbitáceas examinadas tuvieron infecciones mixtas coexistiendo hasta cinco virus en la misma muestra (Paz-Carrasco y Wessel-Beaver, 2002). En este estudio *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) y *Papaya ringspot virus* (PRSV) fueron los que se encontraron con mayor frecuencia en muestras con infecciones mixtas. *Tomato spotted wilt virus* y un geminivirus, se detectaron solamente en infecciones mixtas con ZYMV, PRSV, SqMV y WMV-2. En una investigación realizada en la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz se determinó que infecciones mixtas de ZYMV, PRSV y un potyvirus no identificado fueron comúnmente

observadas en muestras recolectadas de diversos cultivares de sandía (*Polanco-Florián, 2009*). Resultados de esta investigación indican que infecciones mixtas de dos o más virus en etapa temprana de desarrollo de la sandía influyeron en la severidad del marchitamiento súbito de la sandía. La presente investigación se realizó con la finalidad de determinar el efecto de ZYMV, PRSV y SqVYV en infecciones simples o mixtas en plantas de sandía y calabaza. Los resultados de este estudio ayudarán a comprender si las inoculaciones mixtas entre ZYMV, PRSV y SqVYV pueden resultar en una reacción sinérgica induciendo un incremento de la enfermedad o produciendo un efecto de protección cruzada. Esta información será de importancia para mejorar las recomendaciones del manejo de la enfermedad de la marchitez súbita de la sandía en Puerto Rico.

2.2 Materiales y Métodos

Este experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología de la Estación Experimental Agrícola de Río Piedras ubicada en el Jardín Botánico del Recinto Universitario de Puerto Rico, durante los meses de diciembre de 2011 y enero 2012. Para este experimento se utilizaron plantas de sandía de la variedad ‘Crimson Sweet’ y plantas de calabaza *Cucurbita moschata* de la variedad ‘Waltham’. Estas dos especies de plantas se seleccionaron para determinar diferencias en expresión de síntomas luego de realizar las inoculaciones mecánicas con ZYMV, PRSV y SqVYV de formas simples y mixtas.

2.2.1 Siembra y mantenimiento de plantas

La germinación de las semillas se realizó en el invernadero del Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales del Recinto Universitario de Mayagüez durante el período del 6 al 9 de diciembre 2011. Para la germinación se utilizó bandejas de germinación con un sustrato estéril a base de turba “Premier Pro-Mix, BX” (Premier Hort Inc., Quakertown, PA). Aproximadamente a los diez días luego de la germinación las plantas fueron trasladadas al Laboratorio de Virología de la Estación Experimental Agrícola de Río Piedras, donde fueron inoculadas y mantenidas por un período de catorce días en una cámara de crecimiento con condiciones controladas descritas más adelante. Las plantas fueron fertilizadas cuatro días luego de las inoculaciones y se efectuó el riego cada dos días. Las plantas recibieron ninguna aplicación de insecticida o fungicida durante el período experimental.

2.2.2 Procedencia de los inóculos utilizado en los tratamientos

El inóculo (tejido de hojas) utilizado para las infecciones con PRSV y ZYMV fue obtenido de plantas de calabaza ‘Waltham’ inoculadas en el Laboratorio de Fitomejoramiento de Mayagüez, a las cuales se les realizó las pruebas serológicas DAS-ELISA para confirmar la

presencia de ambos virus. El inóculo de SqVYV se obtuvo de la corona del tallo de muestras de sandía con cincuenta y siete días luego del transplante recolectadas en la finca “Odito Farm” localizada en Santa Isabel (Latitud:17.992104; Longitud:-66.368076). Estas muestras presentaron síntomas de enfermedad como clorosis intervenal y marchitez. A las mismas se les realizó RT-PCR (método descrito más adelante) con los cebadores específicos del SqVYV para confirmar la presencia de este virus en el inóculo.

2.2.3 Inoculaciones mecánicas

Se inocularon 24 plantas de sandía ‘Crimson Sweet’ y 24 plantas de calabaza ‘Waltham’ con ocho diferentes inoculaciones repetidas tres veces en un Diseño Completamente Aleatorizado. Las infecciones realizadas con: a) ZYMV, b) PRSV, c) SqVYV, d) ZYMV + PRSV, e) ZYMV + SqVYV, f) PRSV + SqVYV, g) ZYMV + PRSV + SqVYV y h) testigo o control (plantas inoculadas sólo con amortiguador de fosfato).

Para las maceraciones con tejido ZYMV y PRSV se utilizó un amortiguador de fosfato con una concentración de 0.02M y un pH de 7 (Mcphail-Medina, 2010). La proporción utilizada fue de un gramo de tejido fresco (hojas) en diez mililitros de amortiguador. Para realizar la maceración con tejido infectado con SqVYV se utilizó un amortiguador de fosfato de sodio al 0.1% (Adkins et al., 2008) en una proporción de un gramo de tejido congelado (corona del tallo) en diez mililitros de amortiguador. Para realizar las inoculaciones simples se tomó 1 ml de la savia a utilizarse y con una mota de algodón se frotaron los cotiledones los cuales previamente se les espolvoreo carborúndum. En cuanto a las inoculaciones mixtas se utilizaron vasos de precipitación esterilizados donde se mezcló en proporciones de 1:1 (un mililitro) cada savia a combinarse de acuerdo al tratamiento. Se utilizó 1 ml del amortiguador de fosfato de potasio para inocular las plantas control y el mismo fue aplicado a los cotiledones luego de espolvorearle

carborúndum. Estas plantas fueron colocadas en una cámara de crecimiento (Versatile Environmental Test Chamber modelo MLR-351H, Sanyo®). Las condiciones de esta cámara fueron de 30 ciclos con un fotoperíodo de 3:50 h a 25 °C, y 4 LS (rango de iluminación), 3:50 h a 25 °C y 2 LS y 6:00 h a 23 °C con 0 LS, con una humedad relativa de 75%.

2.2.4 Evaluaciones de síntomas y pruebas serológicas

Se realizaron dos evaluaciones (23 y 28 de diciembre de 2011) para observar si las infecciones produjeron síntoma de marchitez. En estas evaluaciones se utilizó una escala de severidad 0-2, donde 0 = plantas asintomáticas, 1 = plantas con cotiledones necróticos y con un poco de vigor y 2 = plantas completamente marchitas o muertas. Luego de la segunda evaluación el tejido de todas las plantas inoculadas fue liofilizado con el propósito de utilizar una muestra compuesta de toda la planta para realizarle las pruebas tanto serológicas como moleculares. Las pruebas serológicas realizadas fueron DAS-ELISA (Doble Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para ZYMV y PRSV y la prueba de ELISA indirecto para la identificación de potyvirus. En plantas inoculadas con el SqVYV se realizó RT-PCR y Nested-PCR. Adicional a los datos de marchitez se tomaron datos de síntomas foliares producidos por las inoculaciones.

2.2.4.A Prueba Serológica DAS-ELISA y ELISA Indirecto

Las pruebas serológicas DAS-ELISA para ZYMV y PRSV se realizaron a los 14 días pos-inoculación en plantas inoculadas de manera simple con estos dos virus y en plantas con infecciones mixtas donde estos dos virus estuvieran inoculados. En plantas inoculadas con SqVYV se realizó la prueba de ELISA indirecto para la identificación de partículas virales de potyvirus.

Para ZYMV y PRSV se utilizó un Pathoscreen kit de ELISA (AGDIA, Elkhart, Indiana). Estas pruebas consistieron de una micro placa plástica de polietileno que contiene 96 fosas que están sensibilizadas con el anticuerpo del virus correspondiente (ZYMV y PRSV). Cada muestra (1g) fue macerada con un amortiguador de extracción general, en una concentración final de 1:10. Del producto de la maceración se colocó 100µl a cada fosa y 100 µl de un control positivos (AGDIA) y negativos (amortiguador). La placa con las muestras se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). Se realizó un lavado con el amortiguador de fosfato (PBS) y se añadió 100µl del conjugado enzimático a una concentración de 1:100 para posteriormente incubar por 2 horas a temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). Al final se lavó la placa con el amortiguador de fosfato y se le colocó un sustrato de p-nitrofenil de fosfato (PNP), el cual al reaccionar con el conjugado desarrolla un color amarillo en aquellas muestras que fueron positivas para el virus examinado. Después de haber incubado la placa por 1 hora se colocó en un lector de ELISA (ELx 800 Absorbance Microplate Reader, BioTek Instruments, Inc, Vermont, USA) a 405nanómetros (A 405nm).

Para la prueba ELISA Indirecto AGDIA (Agdia, Elkhart, IN) se tomó una porción del tejido liofilizado (~0.5 gramos) de plantas inoculadas con SqVYV de manera simple y mixta. Esta porción se colocó en una funda conteniendo amortiguador de extracción y se maceró. Se añadió 100µl del macerado en las fosas de la micro placa plástica de polietileno y dejar incubar por 1 hora a temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). Luego la micro placa fue lavada con un amortiguador de fosfato y se colocó 100µl del anticuerpo a una concentración de 1:100 y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). Después la micro placa fue lavada con el amortiguador de fosfato y se añadió 100µl del conjugado enzimático a una concentración de 1:100. Esto se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavó con el amortiguador de fosfato. Por

último se le añadió 100µl del sustrato de p-nitrofenil de fosfato, se incubó por 1 hora. La lectura se realizó en un lector de ELISA (ELx 800 Absorbance Microplate Reader, BioTek Instruments, Inc, Vermont, USA) a 405 nanómetros (A 405nm).

2.2.4.B Detección del Squash vein yellowing virus mediante RT-PCR

El RT-PCR se realizó a las infecciones simples y mixtos con SqVYV, ya que los mismos dieron positivos a la prueba serológica ELISA indirecto.

2.2.4 B.a Extracción de RNA

Para las extracciones de RNA se utilizó el “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen, Valencia, California) donde primeramente se maceró 0.1 gramos de tejido proveniente de tallos y hojas liofilizados de las infecciones realizadas en sandía y calabaza con un 1ml de amortiguador de fosfato de potasio 0.02M con un pH de 7. El producto de la maceración aproximadamente 1 ml fue colocado en un tubo (ependorf) de 2 ml. Luego se le añadió un amortiguador RLT (RNeasy Lysis Buffer) para romper la pared celular. Se procedió a incubar por 3 minutos a 56 °C para ayudar a romper la pared celular del tejido de la planta. El producto de la lisis fue transferido a una columna violeta que se colocó dentro de un tubo de 2 ml y el mismo fue centrifugado por 2 minutos a una velocidad máxima de 15,000 rpm. Después de la centrifugación, en un tubo de 2 ml se transfirió 450 µl del supernadante, se le añadió 250 µl de etanol (96-100%), se transfirió 650 µl de este producto en la columna rosada la cual tiene un tubo de colección de 2 ml y se centrifugó por 15 segundos a una velocidad de 10,000 rpm. Luego de descartar el producto del tubo de colección, se añadió 700 µl del amortiguador RW1, se centrifugó por 15 segundos a una velocidad de 10,000 rpm y el producto del tubo de colección fue descartado. A la columna se añadió 500 µl del amortiguador RPE (amortiguador para lavar membrana donde se encuentra el RNA), se centrifugó por 15 segundos a una velocidad de 10,000 rpm y se descartó el producto

del tubo de colección. Nuevamente se añadió a la columna la misma cantidad de RPE y se centrifugó por 2 minutos a una velocidad de 10,000 rpm. Por último la columna se colocó dentro de un tubo de colección de 1.5 ml y dentro de la columna se añadió 40 µl de agua libre de RNasa y se centrifugó por 1 minuto a 10,000 rpm.

2.2.4.B.b RT-PCR

Con el producto de la extracción de RNA se procedió a realizar un RT-PCR para obtener copias del ADN utilizando una enzima conocida como transcriptasa al revés M-MLV (Promega®, Wisconsin, USA) y un cebador conocido como hexómero al azar (random hexamer primer) (Bioline®) con una secuencia de 5'-d(NNNNNN)-3' donde N es igual a G,A,T o C. Para este cebador se utilizó un ciclo en el termociclador (Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler) de 60 minutos a 37°C, 99°C por 5 minutos y 4°C infinito (*Promega Protocol*). Estos productos se utilizaron en una mezcla de 7.25µl de agua libre de nucleasas, 4µl del amortiguador 5x M-MLV, 4µl de cloruro de magnesio a 25Mm, 2µl de d-NTP a 10µM, 1 µl del cebador hexómero al azar, 0.50µl de inhibidor de RNasa (Promega®), 0.25µl de la transcriptasa al revés y 2µl de c-DNA. El producto final obtenido del RT-PCR fue almacenado a una temperatura de -20°C.

2.2.4.B.c Protocolo para la reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction: PCR) se realizó utilizando c-DNA total genómico. En el PCR se utilizó una reacción de 12.5µl “ Promega PCR Master Mix”, 5.5µl de agua libre de nucleasas, 2.5µl del cebador 5'CCCTCGGAGAACTTGAT ATGG AAGCAC-3' a 25µMol, 2.5 µl del cebador 5'CGCGTCCTTCCTCTCCAGGCGCT G-3' (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) a 25µMol. Se utilizó un termociclador (Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler) con ciclos y tiempo de amplificación de 35 ciclos a

94 °C por 30 segundos para la desnaturalización, 63°C por 45 segundos para la unión de los cebadores “annealing” y 72 °C por 45 segundos para la extensión de DNA (Adkins et al., 2008). El volumen total de la reacción de PCR fue de 20 µl conteniendo las primeras concentraciones de DNA del SqVYV. Este producto se almacenó a una temperatura de -20 °C.

2.2.4.B.d Nested-PCR

Para realizar el Nested-PCR se utilizó el producto obtenido del primer PCR. Este producto fue utilizado en dos diferentes diluciones 1:10 y 1:100. Dichas diluciones se realizaron colocando 1µl del producto del PCR y 9µl de agua libre de nucleasas para obtener la dilución 1:10. Mientras que para la dilución 1:100 se colocó 1µl del producto del primer PCR y 99 µl de agua libre de nucleasas. Para la reacción en el termociclador se utilizó 12.5µl “Promega PCR Master Mix”, 5.5µl de agua libre de nucleasas, 2.5µl del cebador 5’GCGGGTGAGAAAACCAAGAAGAGACCG-3’ a una concentración de 25µMol, 2.5µl del cebador 5’-CTTCCTCATGGTTGGG AGAGCATG-3’ (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) a una concentración de 25µMol y 2µl del producto del primer PCR teniendo al final un volumen total de 25µl. El programa del termociclador fue de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos para la desnaturalización de la doble hebra de DNA molde, 63°C por 30 segundos para la unión de los cebadores a la región específica del DNA molde y 72 °C por 30 segundos para la extensión o síntesis de DNA (Adkins et al., 2008). Los productos del PCR se visualizaron utilizando bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1% en un iluminador de rayos ultravioletas (GelDoc-It® Imager, Ultra-Violet Products, Upland, California).

2.2.5 Análisis Estadísticos

Los datos de este experimento fueron analizados utilizando el programa de InfoStat® (2011). Se utilizó la prueba de Tukey para identificar diferencias significativas entre las medias

de las evaluaciones de los síntomas de la marchitez súbita de la sandía y de las absorbancias de las pruebas serológicas DAS-ELISA y ELISA indirecto utilizando una significancia de $p < 0.05$.

2.3 Resultados

2.3.1 Síntomas foliares producidos por las inoculaciones simples y mixtas

La figura 8 muestra los síntomas de las inoculaciones simples y mixtas realizadas en plantas de calabaza ‘Waltham’ luego de 14 días de inoculadas. En plantas inoculadas de forma simple con SqVYV se observó que un 100% de estas presentaron una severa clorosis intervenal en las hojas (Fig. 8A). Un 100% de las plantas infectadas con PRSV produjeron aclaramiento de las venas y bordes de hojas rizadas (Fig. 8B). El 100% de las plantas infectadas con ZYMV presentaron deformación de hojas y aclaramiento de venas (Fig. 8C). Por otro lado las inoculaciones mixtas resultaron en diversos síntomas. En 67% de las plantas inoculadas con ZYMV + PRSV-W se observó síntomas de deformación de hojas, clorosis en las venas y presencia de ampollas verdes (Fig. 8D). Un 67% de las plantas inoculadas con ZYMV + SqVYV produjeron síntomas de deformación de hojas, clorosis intervenal y aclaramiento de las venas (Fig. 8E). En 100% de las plantas infectadas con PRSV-W y SqVYV se observó síntomas de aclaramiento de venas, puntos de color verde más fuerte que el de la hoja en general, bordes de las hojas rizados y clorosis intervenal (Fig. 8F). Las inoculaciones triples produjeron aclaramiento de venas, clorosis intervenal y erizamiento en los bordes de la hoja en un 100% de las plantas inoculadas (Fig. 8G). Por otro lado, plantas de sandía inoculadas de manera simple y mixta se observó que sólo se desarrolló la primera hoja verdadera la cual no presentó síntomas virales como ocurrió en las hojas de calabaza. Las inoculaciones simples y mixtas excepto la inoculación con ZYMV realizadas en las plantas de sandía produjeron síntomas de marchitez antes de que las estas desarrollaran su primera hoja adulta (Fig. 8I).

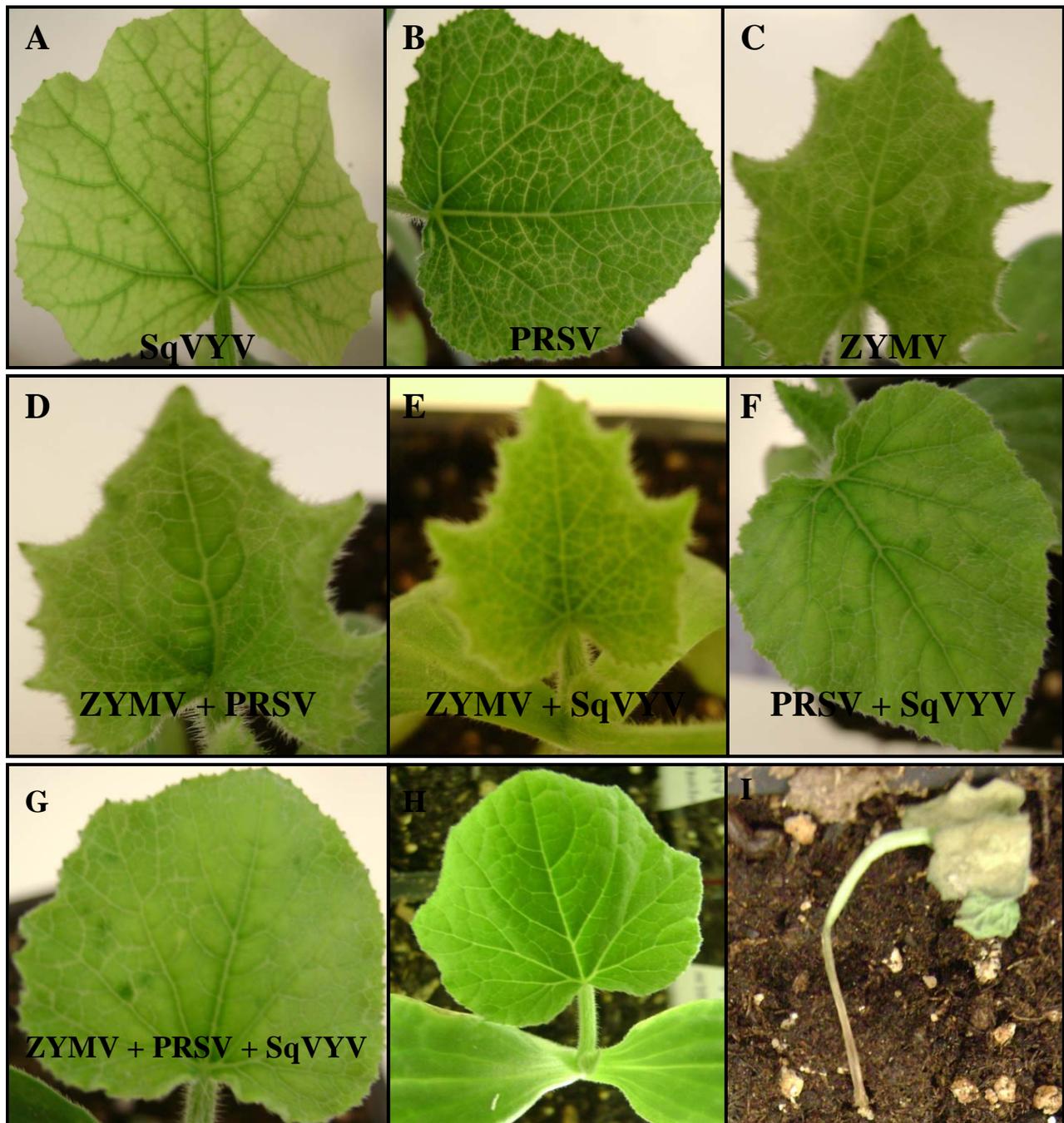


Figura 8. Síntomas observados en las hojas de calabaza y sandía luego de las inoculaciones simples y mixtas con SqVYV, ZYMV y PRSV. A. Inoculación simple con SqVYV, B. Inoculación simple con PRSV-W, C. Inoculación simple con ZYMV, D. Inoculación doble con ZYMV y PRSV-W, E. Inoculación doble con ZYMV y SqVYV, F. Inoculación doble con PRSV-W y SqVYV, G. Inoculación triple con ZYMV, PRSV-W y SqVYV y H. Hoja de calabaza asintomática. I. Síntoma típicos producido por inoculaciones simples, dobles y triples en sandía.

2.3.2 Evaluación de las inoculaciones mecánicas en la producción del síntoma de marchitez en sandía y calabaza.

En la primera evaluación de la severidad de los síntomas de marchitez (8 días pos-inoculación) en plantas de sandía se observó que la infección simple de ZYMV, la infección doble de ZYMV + SqVYV y el control tuvieron valores promedio de 0 a 0.3 en la escala de severidad (Tabla 5). Esto indica que las plantas no tuvieron síntomas a pesar de la infección. Por otro lado en las infecciones simples de SqVYV, PRSV-W y en las infecciones dobles de PRSV + SqVYV se observaron síntomas de necrosis en los cotiledones y pérdida de vigor, donde los promedios obtenidos en la escala de severidad fluctuaron de 0.6 a 1.3. Las infecciones que produjeron síntomas de marchitez y como consecuencia la muerte de la planta fueron la infección doble de PRSV + ZYMV y la infección triple de PRSV + ZYMV + SqVYV donde los promedios obtenidos fueron de 1.6 a 2.0, respectivamente. En esta evaluación solamente se encontró que la infección simple con ZYMV fue significativamente diferente a la infección triple.

Para la segunda evaluación (14 días pos-inoculación) de la severidad de los síntomas de marchitez en plantas de sandía se observó que en la infección doble de ZYMV + SqVYV y en el control la severidad progresó a 1, por lo que estas plantas mostraron necrosis en los cotiledones y pérdida de vigor (Tabla 5). También se observó un aumento de 1.7 en la escala de severidad en la infección simple con PRSV-W y en la infección doble con PRSV-W + SqVYV, produciendo la muerte de la planta. En esta evaluación no se encontró diferencias significativas entre los tipos de infección.

Los resultados de las inoculaciones en plantas de calabaza fueron muy diferentes a los obtenidos en las plantas de sandía (Tabla 6). Todos los tipos de infecciones luego de los 8 días pos-inoculación tuvieron un valor promedio de 0 en la escala de severidad. Esto indica que las

plantas para este tiempo no mostraron síntomas de marchitez. Para la segunda evaluación (14 pos inoculación) la inoculación doble con PRSV + ZYMV mostró un aumento significativo de 1.3 en la severidad de los síntomas, pero este aumento no fue significativamente diferente al aumento que hubo en la infección doble ZYMV + SqVYV de 0.3.

Tabla 5. Severidad de los síntomas de marchitez en plantas de sandía ‘Crimson Sweet’ inoculadas de forma simples y combinadas con *Squash vein yellowing virus* (SqVYV), *Papaya ringspot virus* (PRSV-W) y *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), a los 8 y 14 días después de la inoculación.

Virus Inoculado	Síntomas de marchitez observados	
	Primera evaluación ¹ *	Segunda evaluación ¹ *
	(8 días pos-inoculación)	(14 pos-inoculación)
SqVYV	0.6 ab	0.7 a
PRSV-W	0.6 ab	1.7 a
ZYMV	0.0 b	0.0 a
PRSV-W + ZYMV	1.6 ab	1.7 a
PRSV-W + SqVYV	1.3 ab	1.7 a
ZYMV + SqVYV	0.3 ab	1.0 a
PRSV-W + ZYMV + SqVYV	2.0 a	2.0 a
Control (sin patógeno)	0.3 ab	1.0 a

¹Tukey DMS (0.05) = 1.7311

²Tukey DMS (0.05) = 2.0804

¹Tukey DMS (0.05) = el valor de la diferencia mínima significativa de Tukey al nivel de probabilidad de 0.05 en la primera evaluación.

²Tukey DMS (0.05) = el valor de la diferencia mínima significativa de Tukey al nivel de probabilidad de 0.05 en la segunda evaluación.

¹= Escala de severidad de los síntomas de marchitez (0 = plantas asintomáticas; 1= plantas con cotiledones necróticos y pérdida de vigor; 2 = planta marchita o muerta).

*= Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<0.05).

Tabla 6. Severidad de los síntomas de marchitez en plantas de calabaza ‘Waltham’ inoculadas de forma simples y combinadas con *Squash vein yellowing virus* (SqVYV), *Papaya ringspot virus* (PRSV-W) y *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) a los 8 y 14 días después de la inoculación.

Virus Inoculado	Síntomas de marchitez observados	
	Primera evaluación ^{1*} (8 días pos-inoculación)	Segunda evaluación ^{1*} (14 días pos-inoculación)
SqVYV	0	0 b
PRSV-W	0	0 b
ZYMV	0	0 b
PRSV-W + ZYMV	0	1.3 a
PRSV-W+ SqVYV	0	0 b
ZYMV + SqVYV	0	0.3 ab
PRSV-W + ZYMV + SqVYV	0	0 b
Control (sin patógeno)	0	0 b

Tukey DMS (0.05) = 1.2903

Tukey DMS (0.05) = el valor de la diferencia mínima significativa de Tukey al nivel de probabilidad de 0.05 en la segunda evaluación.

¹= Escala de severidad de los síntomas de marchitez (0 = plantas asintomáticas; 1= plantas con cotiledones necróticos y pérdida de vigor; 2 = planta marchita o muerta).

*= Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<0.05)

2.3.3 Pruebas serológicas a tejido obtenido de las inoculaciones simples y mixtas de sandía y calabaza

En la sandía inoculada con ZYMV simple y en combinación con PRSV-W o SqVYV el valor promedio de absorbancia para ZYMV en la infección simple (1.2567) fue significativamente diferente a las infecciones dobles (0.3767 en ZYMV+SqVYV y 0.2503 en ZYMV+PRSV) e infección triple (0.4767) (Tabla 7). Por otro lado no se encontró diferencias significativas entre los valores de absorbancia para infecciones dobles y triples. En sandía inoculada con PRSV-W simple y mixta con ZYMV o SqVYV se observó que ninguna infección tuvo una absorbancia diferente uno del otro (Tabla 8). En sandía inoculada con SqVYV simple y mixta con PRSV-W o SqVYV y probada con el ELISA indirecto para *Potyvirus* no hubo

diferencia significativa entre la infección simple (1.1590) e infecciones doble (0.7263 en SqVYV+ZYMV y 0.2340 en SqVYV+PRSV) (Tabla 9). La infección simple (1.1590) fue significativamente diferente a la infección triple (0.1997) y al tratamiento testigo (0.1260). La absorbancia en las infección triple y testigo no fueron diferentes. En las dos inoculaciones compuestas de infecciones dobles los valores de absorbancia no fueron diferentes.

Tabla 7. Valores promedios de absorbancia de la prueba serológica DAS-ELISA realizada para detectar *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) en sandía ‘Crimson Sweet’ inoculadas con ZYMV de forma simple y mixta.

Tipos de Infecciones	Virus Inoculado	Absorbancia Promedio DAS-ELISA
Infección Simple	ZYMV	1.2567 a
Infección doble	ZYMV + SqVYV	0.3767 b
Infección doble	ZYMV + PRSV-W	0.2503 b
Infección Triple	ZYMV + PRSV-W + SqVYV	0.4767 b

Tukey DMS (0.05) = 0.7607

ZYMV= *Zucchini yellow mosaic virus*

PRSV= *Papaya ringspot virus*

SqVYV= *Squash vein yellowing virus*

Tukey DMS (0.05) = el valor de la diferencia mínima significativa de Tukey al nivel de probabilidad de 0.05.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<0.05)

Tabla 8. Valores promedios de absorbancia de la prueba serológica DAS-ELISA para detectar *Papaya ringspot virus* (PRSV) en sandía ‘Crimson Sweet’ inoculadas con PRSV de forma simple y mixta.

Tipos de Infecciones	Virus Inoculado	Absorbancia Promedio DAS-ELISA
Infección Simple	PRSV-W	0.2570 a
Infección Doble	PRSV-W + ZYMV	0.2280 a
Infección Doble	PRSV-W + SqVYV	0.2110 a
Infección Triple	PRSV-W+ ZYMV + SqVYV	0.1967 a

Tukey DMS (0.05)=0.1126

ZYMV= *Zucchini yellow mosaic virus*

PRSV= *Papaya ringspot virus-W*

SqVYV= *Squash vein yellowing virus*

Tukey DMS (0.05) = el valor de la diferencia mínima significativa de Tukey al nivel de probabilidad de 0.05.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabla 9. Valores promedios de absorbancia de la prueba serológica ELISA Indirecto para detectar partículas de potyvirus en sandía ‘Crimson Sweet’ inoculadas de forma simple y mixta con *Squash vein yellowing virus*.

Tipos de Infecciones	Virus inoculado	Absorbancia Promedio ELISA Indirecto
Infección Simple	SqVYV	1.1590 a
Infección Doble	SqVYV + ZYMV	0.7263 a b
Infección Doble	SqVYV + PRSV-W	0.2340 a b
Infección Triple	SqVYV + PRSV-W + ZYMV	0.1997 b
Testigo o Control	Sólo amortiguador	0.1260 b

Tukey DMS (0.05) = 0.9275

ZYMV= *Zucchini yellow mosaic virus*

PRSV= *Papaya ringspot virus-W*

SqVYV= *Squash vein yellowing virus*

Tukey DMS (0.05) = el valor de la diferencia mínima significativa de Tukey al nivel de probabilidad de 0.05.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabla 10. Valores promedios de absorbancia de la prueba serológica DAS-ELISA para detectar *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) en calabaza ‘Waltham’ inoculadas con ZYMV de forma simple y mixta.

Tipos de Infecciones	Virus Inoculado	Absorbancia Promedio DAS-ELISA
Infección Simple	ZYMV	0.8560 a b
Infección Doble	ZYMV + SqVYV	1.0777 a
Infección Doble	ZYMV + PRSV-W	1.2693 a
Infección Triple	ZYMV + PRSV-W + SqVYV	0.4417 b

Tukey DMS (0.05) = 0.6071

ZYMV= *Zucchini yellow mosaic virus*

PRSV= *Papaya ringspot virus-W*

SqVYV= *Squash vein yellowing virus*

Tukey DMS (0.05) = el valor de la diferencia mínima significativa de Tukey al nivel de probabilidad de 0.05.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Tabla 11. Valores promedios de absorbancia de la pruebas serológicas DAS-ELISA para detectar *Papaya ringspot virus* (PRSV) en calabaza ‘Waltham’ inoculadas con PRSV de forma simple y mixta.

Tipos de Infecciones	Virus Inoculado	Absorbancia Promedio DAS-ELISA
Infección Simple	PRSV-W	1.0087 a
Infección Doble	PRSV-W + SqVYV	0.6407 b
Infección Doble	PRSV-W + ZYMV	0.3350 c
Infección Triple	PRSV-W + ZYMV + SqVYV	0.2283 c

Tukey DMS (0.05) = 0.1372

ZYMV= *Zucchini yellow mosaic virus*

PRSV-W= *Papaya ringspot virus-W*

SqVYV= *Squash vein yellowing virus*

Tukey DMS (0.05) = el valor de la diferencia mínima significativa de Tukey al nivel de probabilidad de 0.05.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

En calabaza inoculada con ZYMV simples y mixtas con PRSV-W o SqVYV el valor de absorbancia para ZYMV no fue diferente en la infección simple (0.8560) e infección doble (1.0777 ZYMV+SqVYV y 1.2693 ZYMV+PRSV-W) (Tabla 10). La absorbancia de las infecciones dobles (1.0777 ZYMV+SqVYV y 1.2693 ZYMV+PRSV-W) fueron significativas diferentes a la infección triple (0.4417). El valor de absorbancia en la infección simple no fue significativamente diferente a la infección triple. En calabaza inoculadas con PRSV-W simple y combinada con ZYMV o SqVYV se observó que el valor promedio de absorbancia para PRSV en plantas inoculadas en infección simple (1.0087) fue significativamente diferente a las inoculadas en infección doble con PRSV-W+SqVYV (0.6407) (Tabla 11). La absorbancia para PRSV-W en la infección simple (1.0087) e infección triple (0.2283) fue significativamente diferente, mientras que en la infección triple y la infección doble con PRSV-W+ZYMV no hubo diferencia. En calabaza inoculada con SqVYV simple y mixta con PRSV-W o SqVYV y probada con el ELISA indirecto para *Potyvirus* se encontró diferencias en los valores de absorbancia entre la infección simple (0.5467) e infección doble con ZYMV+SqVYV (4.2797) (Tabla 12). La infección doble con ZYMV+SqVYV (4.2797) fue diferente a la infección doble con PRSV-W+SqVYV (0.5467), a la infección simple (0.5467) y al testigo (0.1873). En la infección simple, doble con PRSV-W+SqVYV, triple y el testigo no se observó diferencias.

Tabla 12. Valores promedios de absorbancia de la prueba serológica ELISA Indirecto para detectar partículas de potyvirus en calabaza ‘Waltham’ inoculadas de forma simples y mixtas con *Squash vein yellowing virus*.

Tipos de Infecciones	Virus Inoculado	Absorbancia Promedio ELISA Indirecto
Infección Simple	SqVYV	0.5467 b
Infección Doble	SqVYV + ZYMV	4.2797 a
Infección Doble	SqVYV + PRSV-W	0.5467 b
Infección Triple	SqVYV + PRSV-W + ZYMV	1.6813 a b
Testigo o Control	Sólo amortiguador	0.1873 b

Tukey DMS (0.05)=2.7826

ZYMV= *Zucchini yellow mosaic virus*

PRSV= *Papaya ringspot virus-W*

SqVYV= *Squash vein yellowing virus*

Tukey DMS (0.05)= el valor de la diferencia mínima significativa de la prueba de Tukey al nivel de probabilidad de 0.05.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

2.3.4 Pruebas moleculares para la detección de SqVYV

La técnica molecular del Nested-PCR no amplificó bandas para el SqVYV en ninguna de las inoculaciones. Esto a pesar de haber obtenidos resultados positivos en la prueba de ELISA indirecto para potyvirus.

2.4 Discusión

La variedad de sandía ‘Crimson Sweet’ mostró ser más susceptible que la variedad de calabaza ‘Waltham’ a las infecciones virales de PRSV-W y SqVYV tanto en infecciones simples como en mixtas. Las plantas de calabaza ‘Waltham’ mostraron mayor resistencia a los virus inoculados teniendo más desarrollo vegetativo que las plantas de sandía. Por otro lado los valores de absorbancia de las pruebas serológicas confirmaron que los síntomas observados en las inoculaciones simples fueron producidos por los virus correspondiente a cada infección simple. Los síntomas de PRSV-W y ZYMV como deformación de hoja, ampollas verdes y deformación de hojas son reportados afectando cucurbitáceas (Lecoq et al., 1998). El síntoma de clorosis o aclaramiento de venas producidos por ZYMV y PRSV-W, fue reportado afectando cultivares tropicales de *Cucurbita moschata* como ‘Soler’, ‘Taína Dorada’ y ‘Verde Luz’ infectadas con PRSV-W (Mcphail-Medina, 2010). Inoculaciones con SqVYV produjeron síntomas reportados por Adkins et al. (2007) en el estado de la Florida como clorosis intervenal y marchitez severa. En infecciones mixtas los síntomas producidos fueron similares a los síntomas que los virus produjeron cuando fueron inoculados de forma simple. La infección con PRSV-W + SqVYV presentó clorosis intervenal característico de SqVYV, además aclaramiento de venas y bordes de las hojas rizadas síntoma producidos luego de la inoculación con PRSV-W. Las pruebas serológicas realizadas en sandía indican que las concentraciones de las partículas virales de ambos patógenos PRSV-W y SqVYV fueron similares. La infección con ZYMV + SqVYV produjo aclaramiento de venas y deformación de hojas los síntomas presentados en la infección con ZYMV y una leve clorosis intervenal característico de SqVYV. Para la infección con ZYMV + PRSV-W los síntomas de ampollas verdes, deformación de hoja y aclaramiento de venas fueron observados en ambos tratamientos en infecciones simple. La infección con ZYMV

+ PRSV-W + SqVYV produjo síntomas característicos de los tres virus; aclaramiento de venas y borde de las hojas rizadas producidos por las infecciones simples de ZYMV y PRSV-W y clorosis intervenal producido en la infección simple con SqVYV.

De acuerdo a los resultados de absorbancia para ZYMV en sandía podemos determinar que las concentraciones de este virus se reducen al estar coexistiendo con PRSV-W y SqVYV. Con PRSV las concentraciones de partículas virales de este virus no mostraron ningún cambio significativo al estar coexistiendo con los otros dos virus. La prueba para la detección de potyvirus determinó que la presencia de SqVYV no aumentó significativamente las concentraciones de potyvirus en ninguno de las infecciones realizadas en la sandía. Pero esta prueba mostró una reducción significativa en la concentración de partículas virales de potyvirus cuando los tres virus coexistieron juntos en la misma planta. Estos resultados mostrados en la infección triple podrían estar indicando que cuando SqVYV esta presente junto con PRSV y ZYMV, la planta estar produciendo reacción de protección cruzada. Se ha reportado que la protección cruzada ocurre cuando la acumulación de uno de los virus asociados en la infección es completamente o parcialmente reducida (Untiveros et al., 2007). A pesar de estos resultados es importante destacar que con la infección triple así como en las infecciones doble de PRSV-W + ZYMV y PRSV-W + SqVYV se produjo la muerte de las plantas. Los síntomas obtenidos concuerdan con un estudio realizado por Ramos et al. (2003) donde los efectos en la sintomatología de infecciones dobles revelaron la existencia de una interacción entre PRSV, ZYMV y WMV. Sin embargo los resultados de absorbancia en las pruebas serológicas en infecciones dobles indicaron que los virus coexisten individualmente sin producirse ningún tipo de interacción entre ellos. Esto concuerda con los resultados de Untiveros et al. (2007) los cuales

indican que la no interacción o neutralización de un virus con otro permite la replicación, acumulación y la transmisión del mismo sin influir en los demás.

En las plantas de calabaza se determinó que en ninguna de las infecciones se produjo síntomas de marchitez los cuales causaran la muerte de la planta. Sólo las plantas con inoculaciones de PRSV-W + ZYMV fueron afectadas por marchitez aunque estas no perdieron su vigor. Las pruebas serológicas sugieren que posiblemente este síntoma no responde a una reacción sinérgica por parte de PRSV-W ó ZYMV y que las concentraciones de ambos virus no aumentaron significativamente comparado con los inoculados de forma simple. La prueba serológica de ELISA indirecto determinó que las partículas virales de potyvirus aumentaron significativamente cuando SqVYV coexistió junto con PRSV-W y ZYMV. Pero no fue significativamente diferente cuando SqVYV estuvo coexistiendo con ZYMV a pesar de tener una mayor concentración.

En este experimento el SqVYV no pudo ser amplificado por métodos moleculares, sin embargo la prueba serológica detectó la presencia de potyvirus. En el caso de las plantas de sandía debido a la presencia de marchitez no se logró obtener tejido para realizar la extracción de RNA. A diferencia de las plantas de calabaza las cuales no fueron afectadas por los síntomas de marchitez, pero sí presentaron desarrollo vegetativo deficiente como consecuencia de las inoculaciones. Adkins et al. (2007), encontraron por medio de microscopia de luz que las inclusiones virales del SqVYV afectan las células parenquimales y acompañantes las que se encuentran en el tejido del floema. Debido a que la detección por medio de pruebas moleculares no fue eficiente en muestra de sandía ya que la mayoría del tejido del floema se marchitó. En cuanto a las plantas de calabaza se puede indicar que el pobre desarrollo vegetativo posiblemente redujo la posibilidad de tener más tejido del floema en la muestra para la extracción de RNA. En

la practica se espera que el PCR permita la detección de bajas concentraciones de partículas del virus en la muestra, lo cual elude la detección convencional de los métodos como ELISA y “dot-blot hybridizations (Hadidi et al., 1995).

2.5 Conclusiones

1. Los síntomas de marchitez observados en las plantas de sandía variedad ‘Crimson Sweet’ sugieren que estas son más susceptible a las infecciones virales producidas por PRSV y SqVYV que la variedad de calabaza ‘Waltham’.
2. Los síntomas observados en las plantas de sandía sugieren que la coexistencia de virus en una misma planta puede causar efectos sinérgicos los cuales tienen como resultado un aumento en los síntomas.
3. Las pruebas serológicas mostraron que no hubo interacción como protección cruzada por parte de PRSV, ZYMV y SqVYV cuando los mismos se encontraban en infecciones mixtas.

2.6 Recomendaciones

1. Realizar inoculaciones simples y mixtas con PRSV, ZYMV y SqVYV en plantas sembradas en el campo para observar si los síntomas y resultados serológicos y moleculares difieren de los encontrados en este estudio.
2. Determinar el efecto de inoculaciones de PRSV, ZYMV y SqVYV en otras cucurbitáceas de importancia económica.

Capítulo 3

La efectividad del sorgo (Sorghum bicolor L.) como cultivo intercalado o borde en el control de las infecciones virales con Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), Papaya ringspot virus (PRSV) y la Marchitez Súbita de la Sandía

3.1 Revisión de Literatura

A nivel agrícola las enfermedades causadas por los virus se controlan utilizando insecticida para el control de los vectores, ya que comercialmente no existen productos que controlen directamente las partículas virales (Agrios, 2005). Para que estas aplicaciones de insecticida sean efectivas se deben considerar si el virus que afecta a la planta es no persistente, semi-persistente o persistente. En estudios realizados se encontró que los vectores que transmiten virus de manera semi-persistente y persistente, expuestos a una dosis letal y aún tiempo suficiente de insecticida tuvieron alteraciones en su comportamiento que interrumpió la transmisión del virus (Perring et al., 1999). Los virus transmitidos de manera no persistentes el exponer al vector a una dosis letal de un insecticida no es eficiente, ya que el periodo de transmisión es de segundos a minutos. Otro aspecto a tomar en consideración es si el virus que infecta las plantas es proveniente de un inóculo primario o de uno secundario (Perring et al., 1999; Broadbent et al., 1969). Cuando el inóculo es primario los insecticidas aplicados al cultivo raras veces son efectivos especialmente si algún insecto virulífero entra a la zona del cultivo (Perring et al., 1999). El control en este caso es posible si se realiza fuera del lugar de siembra en plantas hospederas del vector o del virus pero esto raras veces es factible. Por otro lado las aplicaciones de insecticida a lugar de siembra cuando el inóculo es secundario son mas efectivas, ya que cuando el vector coloniza una planta es poco probable que vuele a colonizar otra planta lo cual retrasa el que se convierta en parte de la fauna aérea responsable de transmisión del virus (Perring et al., 1999; Pirone et al., 1988). Para el control de virus semipersistente y persistente se ha encontrado que los insecticidas sistémicos son más efectivos, ya que los vectores pueden morir antes de adquirir las partículas virales del floema de la planta (Perring et al., 1999; Powell G, 1992). Por otro lado esto no es así para los vectores que adquieren los virus de

manera no persistente, ya que se ha encontrado que los insecticidas que se utilizan para estos casos deben ser uno que elimine rápidamente el vector, que repela al vector o que modifique cierto comportamiento del vector. Por que dicho vector se alimenta de las células epidérmicas de la planta (Perring et al., 1999; Raccach., 1980). Para el control de estos virus transmitidos de manera no persistente son comúnmente usados los insecticidas a base de piretroides sintéticos, ya que tienen un efecto llamado de “knockdown” eliminar el vector (Perring et al., 1999; Lowery y Boiteau., 1988). También son utilizados los insecticidas a base de aceites, ya que interfieren con la respiración del vector (Perring et al., 1999; Hesler y Plapp, 1986).

Es importante indicar que el uso de insecticidas sintéticos ha producido que mucha de estas plagas adquieran resistencia a dichos productos (Agrios, 2005). Por esta razón las investigaciones sobre el control de virus se han movido a buscar controles alternos, como el uso de plantas resistentes, uso de plásticos reflectivos, practicas de sistemas de cultivos intercalados o cultivos como barreras entre otros (Agrios, 2005).

En el estado de la Florida, primer lugar en reportarse la enfermedad del marchitamiento súbito de la sandía se llevan a cabo diversas estrategias de control como la destrucción de malezas hospederas de la familia de las Cucurbitaceae incluyendo plantas cucurbitáceas voluntarias, el manejo de la mosca blanca utilizando aplicaciones de insecticida y el uso de plástico reflectivo de color plateado (Kousik et al., 2009). Kousik et al. (2010) reportaron que la combinación de plástico reflectivo plateado y la aplicación de insecticida (Admire con ingrediente activo imidacloprid) en el manejo de la mosca blanca resultó en una reducción significativa de los síntomas de marchitamiento súbito de la sandía en las plantas y frutos comparado con plantas que no tuvieron ningún de estos dos tratamientos. Ellos concluyeron que el manejo de las poblaciones de mosca blanca puede ayudar en la prevención de esta enfermedad

causada por *Squash vein yellowing virus* (SqVYV). Kousik et al. (2009), evaluaron el uso de cultivares de sandía resistentes al virus dentro de la colección de germoplasma (core collection of U.S plant introductions “PIs”) como otra herramienta de control de esta enfermedad. Ellos evaluaron 218 PIs (Plant Introductions) donde encontraron que las plantas de *Citrullus lanatus* var. *lanatus* y *Citrullus lanatus* var. *citroides* originarias del continente africano fueron las que mostraron una reducción en el progreso de la enfermedad comparadas con los controles susceptibles. Por lo que ellos indican que estos cultivares pueden ser fácilmente cruzados con variedades susceptibles que a su vez son comerciales como ‘Mickey Lee’ y ‘Crimson Sweet’ para obtener algunas variedades con genes de resistencia a esta enfermedad que sean de tipo comercial.

Durante los años 1996 al 1998 en el estado de Oklahoma, se realizó un estudio para observar la efectividad de diversos cultivos utilizados como bordes e intercalados en siembras de cucurbitáceas para el control de virus transmitidos de manera no persistente. Como cultivos bordes e intercalados utilizaron maní, maíz, soya y sorgo. De acuerdo a los resultados obtenidos ellos indican que los mejores tratamientos fueron el sorgo cultivado de manera intercalada y borde. En dichos tratamientos hubo menos incidencia de virus transmitido de manera no persistente (Damicone y Edelsonet., 2007).

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Temperatura y precipitación

Se obtuvieron las temperaturas máximas, mínimas y promedio y la precipitación de la Estación Experimental de Juana Díaz para los meses de diciembre del 2009 a agosto del 2010.

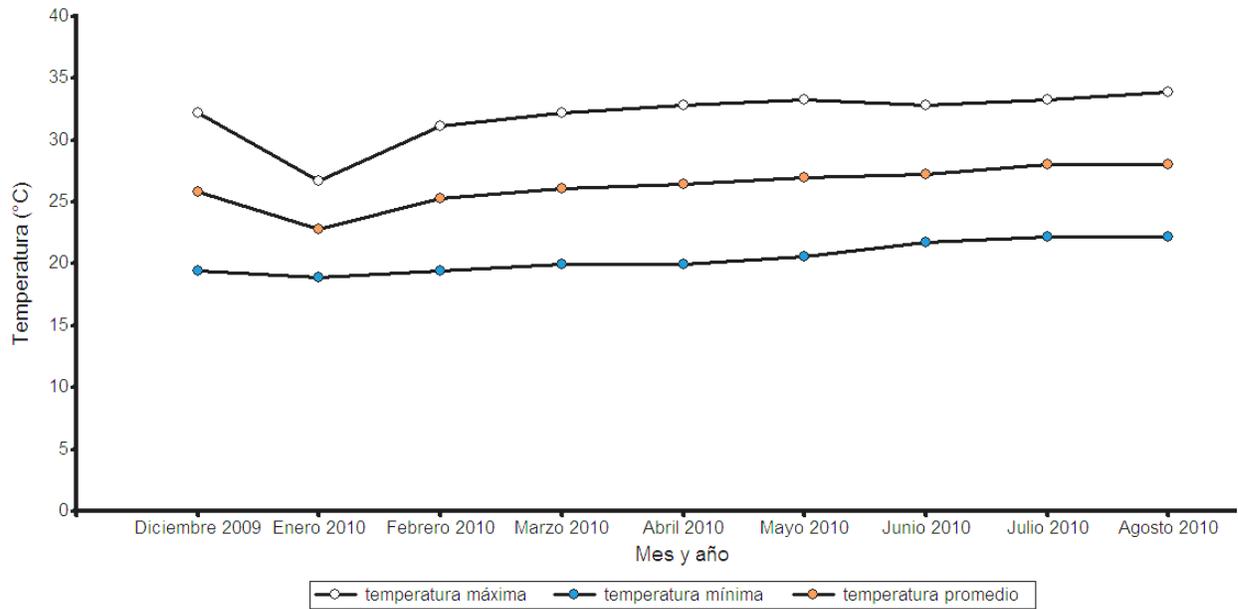


Figura 9. Temperatura (°C) máxima, mínima y promedio en la Estación Experimental de Juana Díaz, Puerto Rico para los meses de diciembre del 2009 a agosto del 2010.

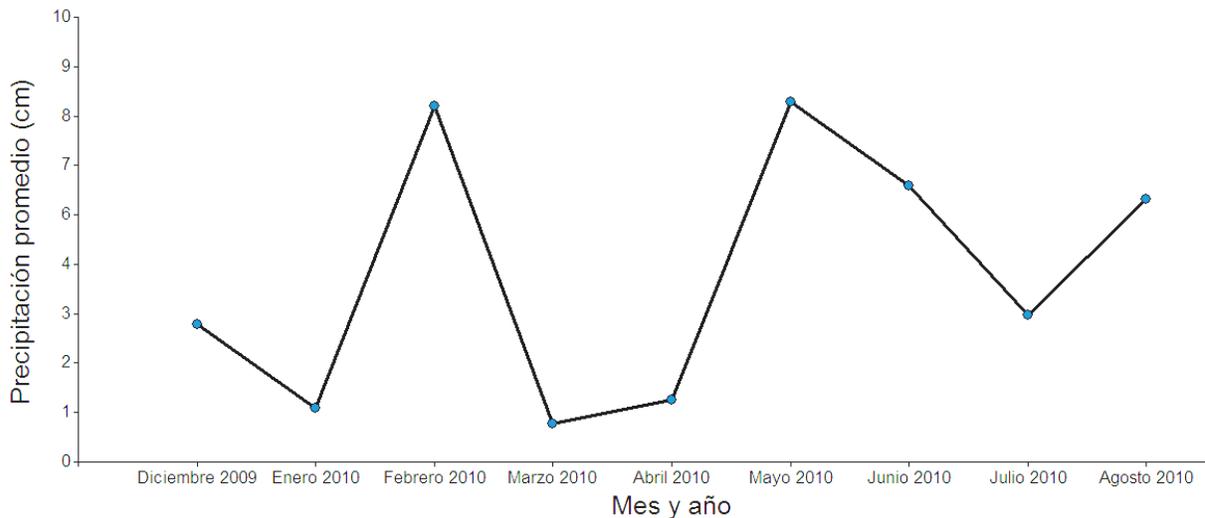


Figura 10. Total de precipitación (cm) en la Estación Experimental de Juana Díaz, Puerto Rico para los meses de diciembre 2009 a agosto del 2010.

3.2.2 Primer experimento de campo

El 3 de diciembre del 2009 en la Estación Experimental de Juana Díaz se estableció un experimento que comprendió un área de 42.7 metros de largo por 43.3 metros de ancho dividido en doce parcelas. Se aplicaron tres tratamientos a las parcelas al azar (Diseño Completamente Aleatorizado) en cuatro repeticiones: 1) control (sin sorgo), 2) parcelas con bordes de sorgo y 3) parcelas intercaladas con sorgo. Entre cada tratamiento se dejó un espacio de 6.1 x 6.1 metros. Un mes antes de la siembra de sandía se establecieron por siembra directa las barreras con sorgo. Los tratamientos de borde e intercalados consistieron de 4 hileras de sandía mientras que el control consistió de 6 hileras de sandía, pero de estas 6 solamente se tomaron datos de 4 (Fig 11). Todas las hileras fueron cubiertas con plástico de color gris. La siembra de sandía fue realizada por medio de transplante y se obtuvieron plántulas de una finca comercial en el municipio de Santa Isabel. Antes de la siembra, al suelo se le aplicó fungicida (metalaxyl) para prevenir la infección de *Pytium*. La cosecha se realizó en el 10 de febrero del 2010 y se evaluó el rendimiento comercial (kg/parcela) y el número de frutos comerciales por parcela.



Figura 11. Ilustración de los tratamientos con sandía como cultivo principal y sorgo como cultivo borde e intercalado. A. Parcela con sandía e intercalado con sorgo, B. Parcela con sandía con borde de sorgo y C. Parcela control (sandía solamente).

3.2.3 Evaluación de la población de vectores

Al día siguiente de la siembra de sandía (4 de diciembre del 2009) se colocaron trampas cromáticas de color amarillas 12 x 7.5cm (Olson Product) pegadas a una paleta de madera colocadas a una distancia aproximada de 18 cm del suelo. Estas se utilizaron para el conteo de adultos de mosca blanca y áfidos. Se colocó una trampa en la hilera 2 y otra en la hilera 3 de cada parcela. Las mismas fueron cambiadas semanalmente durante la segunda a la sexta semana después del transplante. Se contó el número de adultos de mosca blanca y áfidos alados utilizando un estereoscopio.

3.2.4 Incidencia de infecciones virales

Luego de dos semanas de realizarse el transplante se evaluó la presencia de síntomas y la incidencia de los mismos. Los síntomas a observarse fueron marchitamiento, mosaicos, amarillamiento intervenal, hojas erectas, deformación de hojas y frutos y brotes quemados. Se tomaron muestras de plantas con síntomas de las hileras del medio durante cinco semanas. Estas muestras fueron colocadas en bolsas plásticas y almacenadas a -20° C para realizarles pruebas serológicas para la detección de *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (DAS-ELISA), *Papaya ringspot virus* (PRSV) (DAS-ELISA) y *Potyvirus* (ELISA Indirecto) (Pruebas descritas en el capítulo 1). Se realizó una evaluación sobre las plantas que mostraban síntomas de marchitez súbita para observar el progreso de la enfermedad del marchitamiento súbito de la sandía.

3.2.5 Segundo experimento de campo

Un segundo experimento fue realizado en mayo del 2010 utilizando las mismas parcelas del primer experimento. En esta ocasión para la evaluación de los vectores se colocó una trampa cromáticas amarilla por tratamiento. La prueba de serología ELISA Indirecto se realizó durante la tercera semana después del transplante para determinar si las plantas estaban infectadas con

virus de la familia *Potyviridae*. En la cuarta y quinta semana se realizaron las pruebas de DAS-ELISA para las infecciones de ZYMV y PRSV. En este experimento no se evaluó la incidencia de los síntomas de la marchitez súbita de la sandía. Para este experimento se realizaron pruebas moleculares (descritas en el capítulo 1) a plantas obtenidas de los tres tratamientos para la identificación del SqVYV. En este experimento la cosecha se realizó en agosto del 2010 y se tomaron datos de rendimiento comercial (kg/parcela) y número de frutos comerciales.

3.2.6 Análisis Estadísticos

Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos se realizaron pruebas de ANOVA y diferencias mínimas significativas (DMS) en InfoStat® (2011). El número de mosca blanca y áfidos en etapa adulta fueron transformados a raíz cuadrada en el primer experimento y para el segundo experimento se utilizó la fórmula $\log+1$ para los datos de mosca blanca. Para poder cumplir con los supuestos de distribución normal de errores y homogeneidad de varianza.

3.2.7 Identificación del Squash vein yellowing virus (SqVYV)

En el experimento 2 se tomó muestras de la parte de la corona de la planta de sandía con síntomas de la marchitez súbita de la sandía en los tres tratamientos. A estas muestras se les extrajo el RNA el cual se almacenó a -80°C hasta diciembre del 2011 y posteriormente se analizó el RNA total de las muestras utilizando la técnica del RT-PCR descrita en el capítulo 1.

3.3 Resultados

3.3.1 Experimento 1 (diciembre del 2009 a febrero del 2010)

3.3.1.1 Evaluación de las poblaciones de mosca blanca y áfidos

En cuanto a la dinámica poblacional de mosca blanca se observó que un crecimiento ascendente durante el transcurso de las semanas en todos los tratamientos (Fig. 12) De la primera (7 días después del trasplante) a la quinta semana (35 días después del trasplante) no hubo diferencias en el número de adultos de mosca blanca en los tratamientos. En la semana 6 (42 días después del trasplante) se observó diferencia significativa entre el tratamiento sandía con borde de sorgo y sandía intercalada con sorgo con un promedio de 10.9 y 5.9 adultos, respectivamente.

Las poblaciones de áfidos alados fueron muy diferentes a las de mosca blanca (Fig.13). De la primera (7 días después del trasplante) a la tercera (21 días después del trasplante) semana hubo un aumento en la población de áfidos alados en todos los tratamientos, seguido por una disminución en la cuarta semana (28 días después del trasplante). La primera semana hubo diferencia en el tratamiento sandía con borde de sorgo el cual tuvo una media de 5.4 comparado con los tratamientos control y sandía intercalada con sorgo con medias de 2.9 y 3.4, respectivamente. Los tratamientos control y sandía intercalada con sorgo no fueron significativamente diferentes una a la otra. En la segunda semana se observó diferencias significativas entre el tratamiento control y sandía con borde de sorgo con 5.10 y 8.3 áfidos alados, respectivamente. Durante esta segunda semana los tratamientos control y sandía intercalada con sorgo no fueron diferentes entre ellas. En la tercera y cuarta no se observó diferencia entre los tratamientos, mientras que en la quinta semana hubo diferencias significativas entre el tratamiento control y el tratamiento sandía intercalada con sorgo con

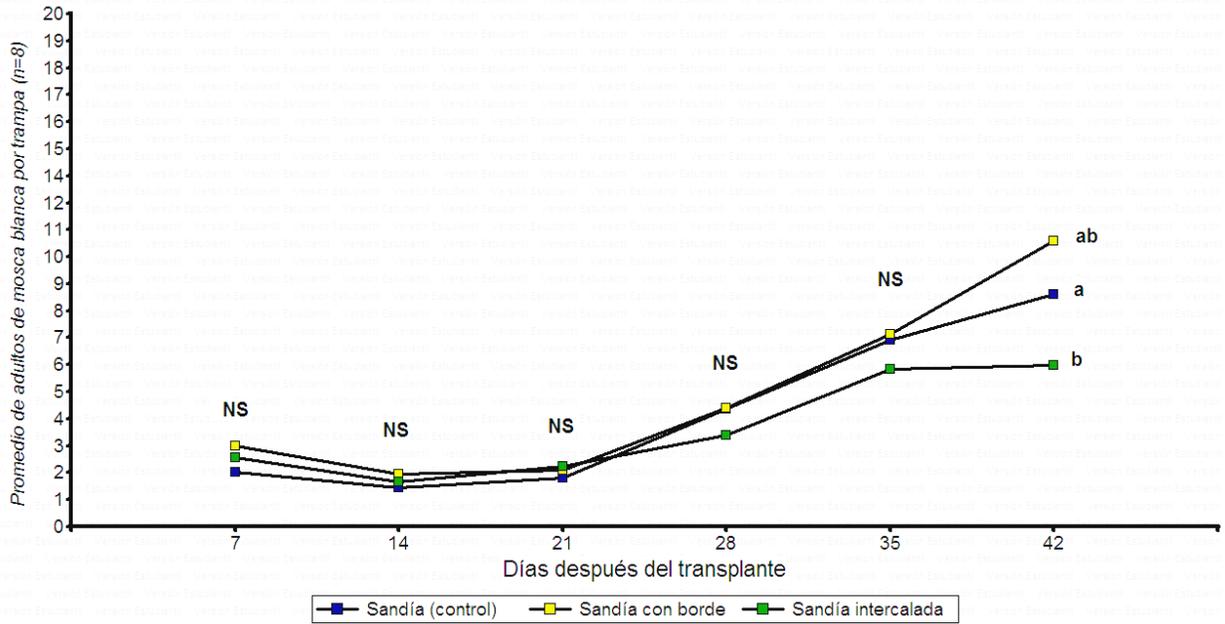


Figura 12. Promedios por trampas (n=8) de mosca blanca en etapa adulta en sandía (control), sandía con bordes de sorgo y sandía intercalada con sorgo 7 días después del transplante en Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 1). Datos transformados a raíz cuadrada. Dentro de los días después del transplante, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de acuerdo con la prueba de diferencias mínimas significativas: NS= no significativa.

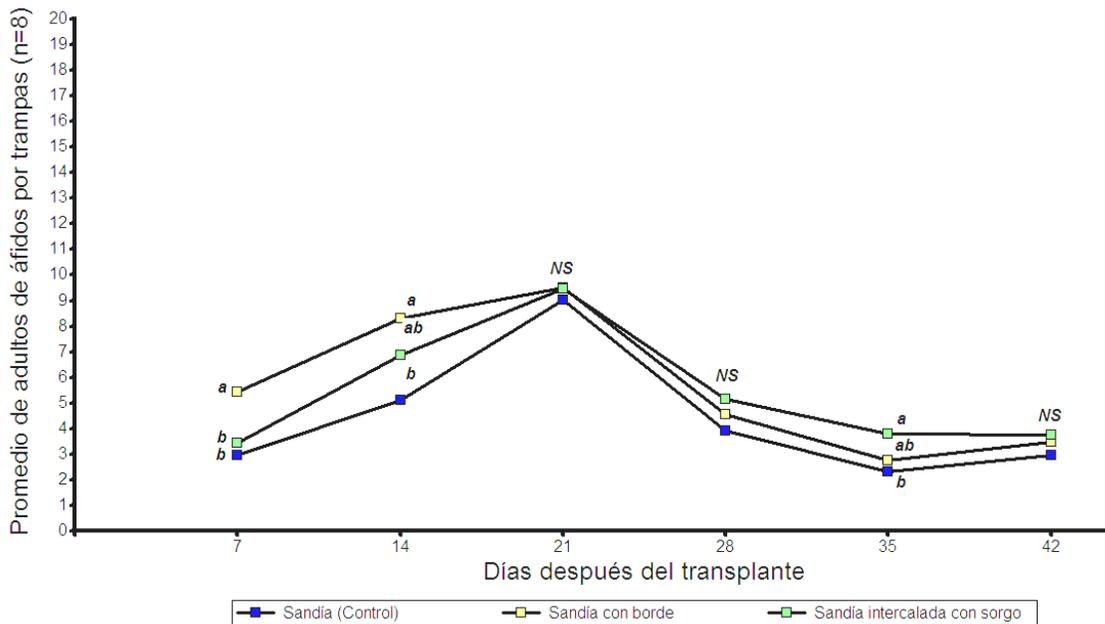


Figura 13. Promedios por trampas (n=8) de áfidos en etapa adulta (alados) en sandía (control), sandía con bordes de sorgo y sandía intercalada con sorgo a los 7 días después del transplante en Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 1). Datos transformados a raíz cuadrada. Dentro de los días después del transplante, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de acuerdo con la prueba de diferencias mínimas significativas: NS= no significativa.

con media de 2.30 y 3.77 de áfidos alados, respectivamente. Para esta misma semana el tratamiento sandía con borde de sorgo no mostró diferencia significativa con los otros tratamientos. La sexta semana no presentó diferencias en ninguno de los tratamientos.

3.3.1.2 Incidencias de virus y pruebas serológicas

En el experimento 1 los síntomas virales característicos de ZYMV y PRSV fueron observados desde la segunda semana de muestreo (21 días luego del trasplante) en todos los tratamientos (Tabla 13). Para la sexta semana (42 días luego del trasplante) la mayoría de las plantas en los tratamientos mostraban síntomas característicos de PRSV y ZYMV. Los síntomas de marchitez súbita comenzaron a observarse a los 38 días después del trasplante y ya a los 60 días después del trasplante la mayoría de las plantas en todos los tratamientos mostraban este síntoma (Fig. 14). Solamente a los 45 días después del trasplante el tratamiento sandía con borde de sorgo fue donde mayor número de plantas con marchitez se observó siendo significativamente diferente al control, pero no diferente a la sandía intercalada con sorgo. Por otro lado, síntomas como enrizamiento de los bordes de la hoja, clorosis intervenal, mosaicos, ampollas verdes, brotes nuevos necróticos fueron observados afectando la parte foliar de las plantas de sandía (datos no ilustrados).

3.3.1.3 Resultado de los rendimientos

Parcelas sembradas con sandía con sorgo como borde tuvieron significativamente menor rendimiento y número de frutas comerciales que aquellas sembradas con sandía solamente (control) o sandía intercalada con sorgo (Tabla 14).

Tabla 13. Porcentaje de muestras de sandía (n=8) positivas para *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) y *Potyvirus* en sandía con sorgo intercalado (Intercalado), sandía con borde de sorgo (Borde) y sandía solamente (Control) a los 14 días después del transplante (diciembre de 2009 a enero 2010), Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 1).

Tratamientos	Pruebas Serológicas	Semana 2 ¹ (14 *)	Semana 3 ¹ (21*)	Semana 4 ¹ (28*)	Semana 5 ¹ (35*)	Semana 6 ¹ (42*)
Intercalado	PRSV	25	100	100	88	88
Intercalado	ZYMV	0	75	63	50	50
Intercalado	Potyvirus	0	100	100	100	100
Borde	PRSV	38	100	100	100	100
Borde	ZYMV	13	100	100	88	100
Borde	Potyvirus	0	100	100	100	100
Control	PRSV	25	100	100	100	100
Control	ZYMV	0	100	88	75	50
Control	Potyvirus	0	100	100	100	100

¹= porcentaje de muestras con resultados positivos en las pruebas serológicas.

*= días después del transplante

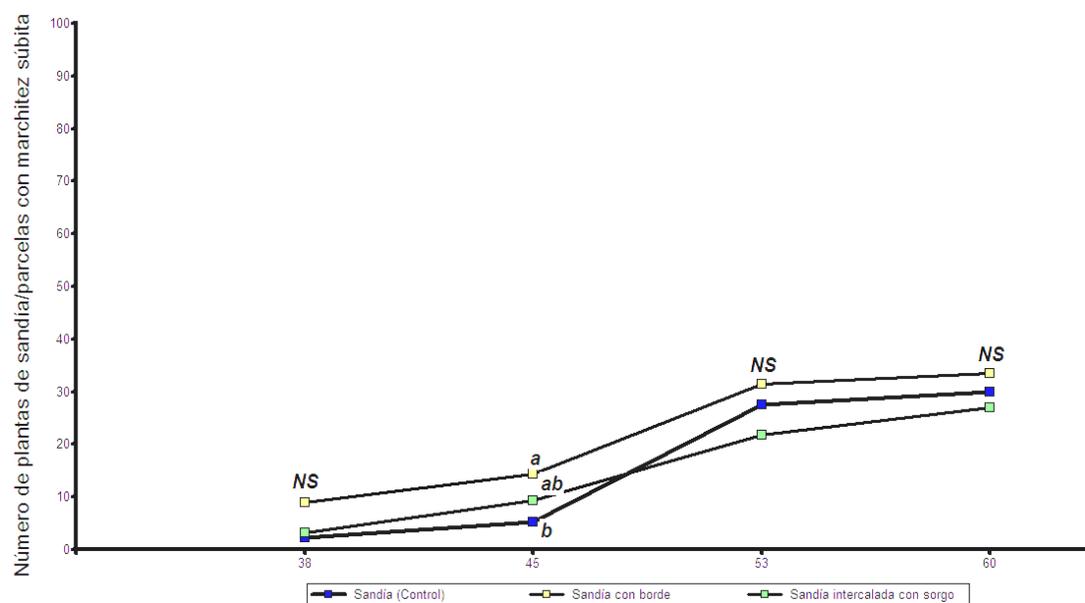


Figura 14. Número promedio de plantas de sandía por parcelas (n=4) con síntomas de la marchitez súbita en parcelas con sandía solamente (control), sandía con sorgo como borde y sandía intercalada con sorgo evaluadas de los 38 a los 60 días después del trasplante en Juana Díaz, Puerto Rico durante enero y febrero del 2010. Dentro de los días después del trasplante, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de acuerdo con la prueba de diferencias mínimas significativas: NS= no significativa.

Tabla 14. Promedio del rendimiento comercial (kg/parcela) y número de frutos comerciales por parcela (n=4) en plantas de sandía en sandía solamente (control), sandía intercalada con sorgo y sandía con sorgo como borde (diciembre, 2009), Juana Díaz, Puerto Rico Experimento 1.

Tratamientos	Rendimiento comercial (kg/parcela)	Número de frutos comerciales (por parcela)
Sandía (control)	215 a	34 a
Sandía intercalada con sorgo	212 a	35 a
Sandía con sorgo como borde	99 b	21b

En la misma columna medias seguidas por una letra en común no son significativamente diferente ($\alpha=0.05$)

3.3.2 Experimento 2 (de mayo a agosto del 2010)

3.3.2.1 Evaluación de las poblaciones de mosca blanca y áfidos

En el experimento 2 hubo un aumento general de las poblaciones de adultos de mosca blanca entre semana 1 (7 días después del trasplante) y semana 5 (35 días después del trasplante), pero los aumentos no fueron como en el experimento 1 (Fig. 15). La única semana que presentó diferencias significativas en adultos de mosca blanca por trampa fue la segunda semana (14 días después del trasplante). En esta semana el número de adultos de mosca blanca en el tratamiento sandía con borde de sorgo fue significativamente diferente (1.72) a los tratamientos control (2.71) y sandía intercalada con sorgo (3.02), mientras que el tratamiento control y sandía intercalada no fueron diferentes uno del otro.

El número de áfidos alados por trampa en el experimento 2 mostró un desarrollo semanal muy distinto al del experimento 1 (Fig. 16). No hubo un patrón consistente, pero en general no hubo muchos cambios en el número de áfidos entre semana 1 (7 días después del trasplante) y semana 5 (35 días después del trasplante). En las semanas 1, 3 y 5 no se observó diferencias significativas entre tratamientos. Para la semana 2 (14 días después del trasplante) hubo diferencias significativas en las poblaciones de áfidos alados de los tratamientos sandía (control) y sandía con sorgo como borde. En la semana 4 (28 días después del trasplante) el tratamiento sandía con borde de sorgo fue significativamente diferente a los otros dos tratamientos, pero entre estos dos tratamientos [sandía (control) y sandía intercalada con sorgo] no hubo diferencias significativas. El tratamiento de sandía con sorgo como borde tuvo a más áfidos alados que los otros dos tratamientos durante la semana 2 y 4.

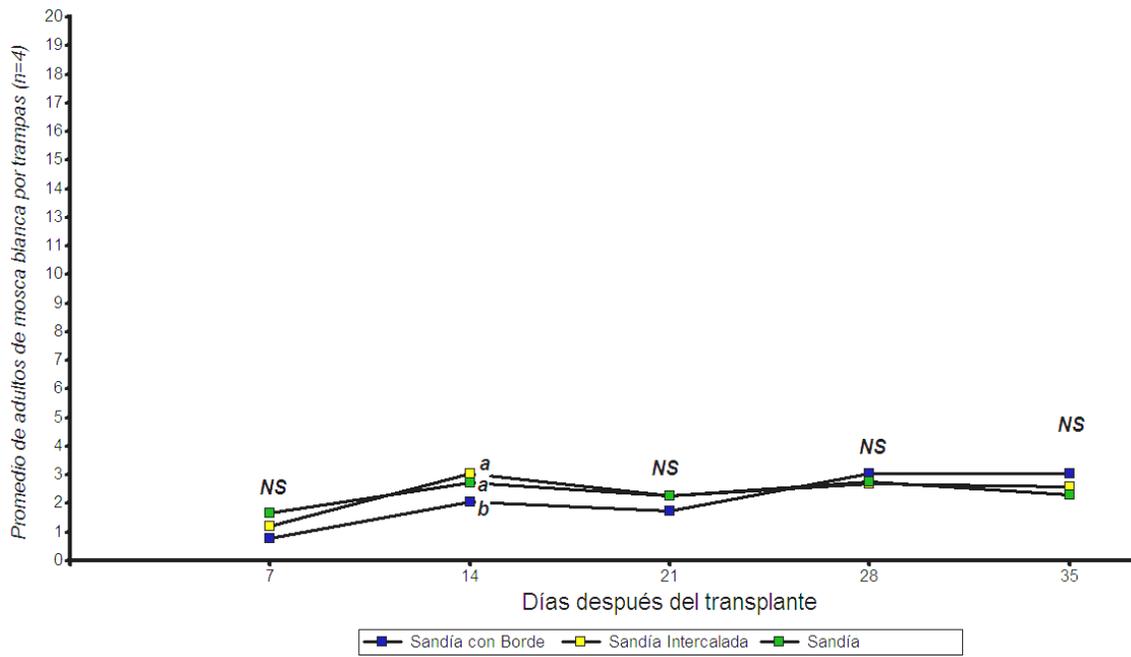


Figura 15. Promedios por trampas (n=4) de mosca blanca en etapa adulta en sandía sola (control), sandía con bordes de sorgo y sandía intercalada 7 días después del transplante en Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 2). Datos transformados ln (días después del transplante + 1). Dentro del día después del transplante, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de acuerdo con la prueba de diferencias mínimas significativas: NS= no significativa.

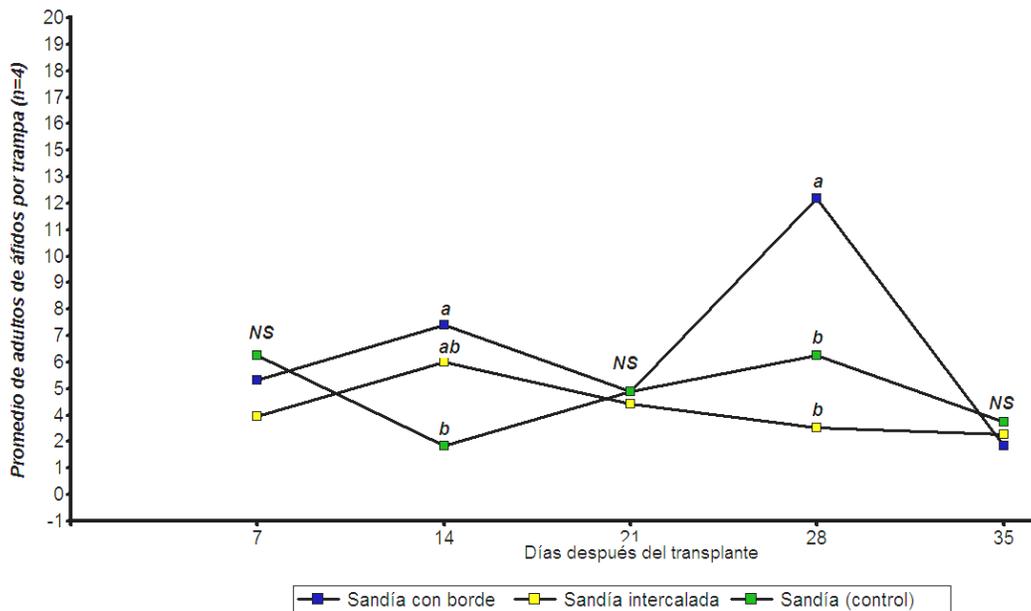


Figura 16. Promedios por trampas (n=4) de áfidos en etapa adulta (alados) en sandía sola (control), sandía con bordes de sorgo y sandía intercalada con sorgo 7 días después del transplante en Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 2). Dentro del día después del transplante, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de acuerdo con la prueba de diferencias mínimas significativas: NS= no significativa.

Tabla 15. Porcentaje de muestras de sandía (n=8) positivas para *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) y *Potyvirus* en sandía con sorgo intercalado (Intercalado), sandía con borde de sorgo (Borde) y sandía solamente (Control) 21 días después del trasplante (mayo a junio, 2010) , Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 2).

Tratamiento	Pruebas Serológicas	Semana 3 ¹ (21*)	Semana 4 ¹ (28*)	Semana 5 ¹ (35*)
Intercalado	PRSV	-	0	0
Intercalado	ZYMV	-	0	0
Intercalado	Potyvirus	75	0	0
Borde	PRSV	-	0	-
Borde	ZYMV	-	0	0
Borde	Potyvirus	100	-	-
Control	PRSV	-	0	0
Control	ZYMV	-	0	25
Control	Potyvirus	100	-	-

¹= porcentaje de muestras con resultados positivos en las pruebas serológicas.

*= días después del trasplante

- = datos no disponibles

3.3.2.2 Incidencia de virus y pruebas serológicas

La prevalencia de los virus ZYMV y PRSV fue mayor en el experimento 1 que en el experimento 2 (Tabla 13 y 15). La tercera semana de muestreo del experimento 2 todas las plantas muestreadas en todos los tratamientos fueron positivas para *Potyvirus* con porcentos que fluctuaron de 75 a 100%. En la semana 4 y 5 no se detectó PRSV en ninguno de los tratamientos. La prueba de ZYMV resultó positiva en un 25% de las muestras del tratamiento control, mientras que en los demás tratamientos las muestras resultaron negativas a este virus.

3.3.2.3 Resultado de los rendimientos

Los rendimientos fueron mayores en el experimento 2 comparado con el experimento 1, pero el comportamiento relativo de los tratamientos fue muy parecido en ambos experimentos (Tabla 14 y 16). El tratamiento control en el experimento 2 fue significativamente mayor en rendimiento comercial y en el número de frutos comerciales que los demás tratamientos.

Tabla 16. Promedio del rendimiento comercial (kg/parcela) y número de frutos comerciales por parcela (n=4) en plantas de sandía en los tratamientos sandía sola (control), sandía intercalada con sorgo y sandía con sorgo como borde (mayo del 2010), Juana Díaz, Puerto Rico (Experimento 2).

Tratamientos	Rendimiento comercial (kg/parcela)	Número de frutos comerciales (por parcela)
Sandía (control)	448 a	50 a
Sandía intercalada con sorgo	236 b	20 b
Sandía con sorgo como borde	102 b	14 b

En la misma columna medias seguidas por una letra en común no son significativamente diferente ($\alpha=0.05$)

3.3.3 Identificación del SqVYV

Los resultados del RT-PCR y Nested-PCR (Fig.17) indican que una muestra recolectada del tratamiento control del experimento 2 resultó positiva al SqVYV. En todas las muestra se observó el síntoma de marchitez el cuál es característico de la enfermedad de la marchitez súbita de la sandía.

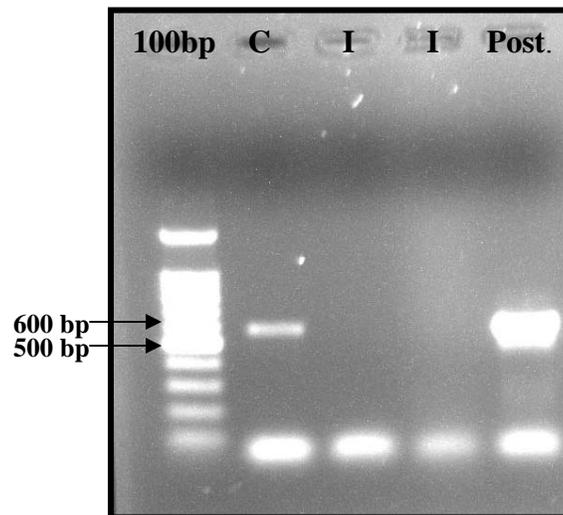


Figura 17. Fragmentos amplificados para *Squash vein yellowing virus* por RT-PCR y Nested-PCR en muestras del experimento 2 de sandía sola (C) y sandía intercalada con sorgo (I) analizadas en un gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de 100 pares de bases. Carril 2 (C): Amplificación para el virus SqVYV con un tamaño de banda de 591 bp en una muestra del tratamiento sandía sola. Carril 3 y 4: Muestra del tratamiento de sandía intercalada con sorgo la cual no amplificó bandas para el SqVYV. Carril 5: Control positivo para SqVYV la cual amplificó banda de tamaño de 591 bp.

3.4 Discusión

Los resultados indican que la incidencia de los virus estudiados y la dinámica poblacional de mosca blanca y de áfidos fue diferente en ambos experimentos. Uno de los factores involucrados en estas diferencias podría ser la precipitación durante el experimento. Se observó que en el primer experimento las poblaciones de mosca blanca fueron mayores que en el segundo experimento. A la misma vez que la precipitación fue menor en el primer experimento con un promedio de 10.2 cm de lluvia durante los cuatro meses del experimento, mientras que en el segundo experimento durante los cuatro meses del experimento se obtuvieron 15.2 cm de lluvia. Esto concuerda con lo encontrado por Fishpool et al. (1995), donde reportaron que la lluvia tuvo una correlación negativa en las poblaciones de mosca blanca concluyendo que posiblemente la oviposición se reducía luego de la lluvia. Dicho comportamiento fue observado también por Dubón (2006), donde en plantaciones de melones las poblaciones de adultos de mosca blanca disminuyeron en los meses de mayor precipitación. En cuanto a la dinámica poblacional de áfidos, se observó que el número de adultos no varió, sin embargo en el segundo experimento disminuyó. Estos factores fueron importantes en la incidencia de virus encontrados, ya que en el primer ensayo fue en donde se determinó mayor incidencia de ZYMV y PRSV y donde se presentó una mayor población de vectores. Por otro lado es importante destacar que en el segundo experimento aunque las poblaciones de mosca blanca fueron menores la infección en plantas por causa del potyvirus fueron de un 100%. En este experimento una de las muestras tomadas del tratamiento control resultó positiva a SqVYV, lo que indica que la prevalencia de este virus infectando plantas de sandía en este experimento pudo ser mayor comparado a los resultados de ZYMV y PRSV. Esto no tuvo un impacto negativo en el rendimiento del cultivo, ya que el peso total de los frutos por hectárea fue mayor en el segundo que en el primer

experimento. Se puede indicar que los bajos rendimientos obtenidos en el primer experimento, posiblemente fueron causados por la infección de ZYMV, PRSV y de un potyvirus, los cuales se presentaron 21 días luego del trasplante. En este experimento la mayoría de las plantas independientemente del tratamiento fueron afectadas con los síntomas de marchitez, los cuales fueron observados a los 38 días luego del trasplante. Como consecuencia se produjo un lento desarrollo de las plantas, lo cual se reflejó en bajos rendimientos. Al contrario del segundo experimento donde los síntomas de marchitez no afectaron severamente a las plantas de sandía en los diferentes tratamientos. Estos resultados concuerdan con los reportados en el estado de la Florida, donde una o dos semanas antes de la cosecha síntomas típicos de la marchitez súbita de la sandía fueron observados afectando severamente el desarrollo del fruto (Kousik et al., 2010).

Los experimentos realizados indican que el uso del sorgo como barrera o intercalado no tiene un impacto significativo en cuanto a utilizarlo como una estrategia para el manejo de infecciones virales. Un estudio previo encontró que la alteración de cultivos de cucurbitáceas en donde se utilizó cultivos borde e intercalado con sorgo fue efectivo en reducir las enfermedades causadas por virus no persistentes (Damicone et al., 2007). En este estudio esto se pudo observar sólo en el segundo experimento donde sólo se observó un 25% de infección por parte de ZYMV en la quinta semana de muestreo. Por otro lado en ambos experimentos el tratamiento control fue el que mayor rendimiento obtuvo y en donde se observaron menos poblaciones de vectores. Esto contrasta con lo reportado por Damicone et al. (2007), donde observaron que los cultivos borde e intercalado tuvieron un efecto negativo particularmente en el rendimiento cuando el sorgo fue sembrado antes de la calabaza esto debido al factor de competencia entre cultivo. Estos investigadores indicaron que la efectividad de un cultivo borde en alterar el comportamiento de áfidos alados en cucurbitáceas quizás es menos que en la de los cultivos sembrados en hileras

más juntas. Por otro lado el efecto de sombra producido por el sorgo como borde e intercalado tuvo un efecto en el rendimiento, ya que la reducción en fotosíntesis tiene un efecto en la producción de frutos. Buttrose y Sedgley (1978), reportaron que el efecto de días cortos o una baja intensidad de luz en el cultivo de la sandía produjeron más cantidad de frutos pero con un tamaño pequeño. Otros estudios han reportado sólo modestos niveles de control de enfermedades con el uso de cultivos bordes (Damicone et al., 2007).

3.5 Conclusiones

1. Los tratamientos con sorgo intercalado y como borde mostraron una reducción en la incidencia de ZYMV y PRSV en el segundo experimento.
2. En el segundo experimento una muestra tomada del tratamiento control amplificó fragmentos del SqVYV sugiriendo que este virus afectó el cultivo de la sandía en la Estación Experimental de Juana Díaz.
3. En los experimentos la precipitación puede tener un efecto en la población de adultos de la mosca blanca.
4. El sorgo como cultivo intercalado o borde no tuvo efecto en la incidencia de la marchitez súbita de la sandía.

3.6 Recomendaciones

1. Estudiar otro género de planta como cultivo borde e intercalado para estudiar el efecto en la incidencia de PRSV, ZYMV y SqVYV.
2. Determinar el efecto del sorgo en parcelas más grandes para evitar el efecto de sombra.
3. Registrar las poblaciones de los diversos vectores de PRSV, ZYMV y SqVYV en el cultivo borde e intercalado.

Literaturas Citadas

Adkins, S., S. E. Webb, D. Achor, D., P. D. Roberts y C. A. Baker. 2007. Identification and characterization of a novel whitefly-transmitted member of the family *Potyviridae* isolated from cucurbits in Florida. *Phytopathology* 97: 145-154.

Adkins, S., S. E. Webb, C. A. Baker y C. S. Kousik. 2008. *Squash vein yellowing virus* detection using nested polymerase chain reaction demonstrates that the cucurbit weed *Momordica charantia* is a reservoir host. *Plant Disease*. 92:1119-1123.

Adkins, S., C. G. Webster, T. G. McCollum, J. P. Albano, W. W. Turechek, P. D. Roberts, S. E. Webb, C. A. Baker y C. S. Kousik. 2010. Physiological effects induced by *Squash vein yellowing virus*, causal agent of viral watermelon vine decline in Florida. Cucurbitaceae Conference 2010, Charleston, South Carolina. Pp. 194-195.

Akad, F., S. Webb, T. W. Nyoike, O. E. Liburd, W. Turechek, S. Adkins y J. E. Polston. 2008. Detection of *Cucurbit leaf crumple virus* in Florida cucurbits. *Plant Disease*. 92:68.

Agrios, N. G. 2005. *Plant Pathology*. 5ta ed. Academic Press Inc. Publication, San Diego, California. 922 pp.

Anandalakshmi, R., G. J., Pruss, X. Ge, R. Marathe, A. C. Mallory, T. H. Smith y V. B. Vance. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:13079-13084.

Broadbent, L. 1969. Disease control through vector control. En: *Virus, vectors and Vegetation.*, ed K Maramorosch, Interscience, New York. pp. 593-630.

Buttrose M. S. y M. Sedgley. 1978. Some effects of light intensity, daylength and temperature on growth of fruiting and non-fruiting watermelon (*Citrullus lanatus*). *Annals of Botany*. 42 (3): 559-608.

Cohen, S., J. E. Duffus, R. C. Larsen, H. Y. Liu y R. A. Flock. 1983. Purification, serology, and vector relationships of squash leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology* 73: 1669-1673.

Damicone, J. P. y J. V. Edelson. 2007. Effect of border crops and intercrops on control of cucurbit virus diseases. *Plant Disease* 91:509-516.

Di Rienzo, J.A., F. Casanova, M. G. Balzarini, L. Gonzalez, L. Tablada y C. W. Robledo. Infostat versión 2011. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

- Departamento de Agricultura de Puerto Rico. 2011. Tabla de Ingreso Bruto de la Agricultura de Puerto Rico cifras revisadas 2008/09 y preliminares 2009/10.
<http://www2.pr.gov/agencias/Agricultura/estad%C3%ADsticas/Documents/Estad%C3%ADsticas/Ingreso%20Bruto%20Agricola%202009-2010.pdf>
- Dubón-Obregón, R. E. 2006. Principales plagas del cultivo del melón y sus enemigos naturales.
<http://www.slideshare.net/redubon/principales-plagas-del-cultivo-de-melon-y-sus-enemigos-naturales>
- Egel, D.S. y S. Adkins. 2007. Squash vein yellowing virus identified in watermelon (*Citrullus lanatus*) in Indiana. *Plant Disease*.91(8): 1056.
- Escudero, J. 1992. Situación de los virus que afectan a la cucurbitáceas en la costa sur de Puerto Rico. P.p. 44-51, En: El cultivo de Cucurbitáceas: Memorias del foro técnico 26 de junio de 1992, Lajas, Puerto Rico, Recinto Univ. Mayaguez, Estación Experimental Agrícola.
- Estevez de Jensen, C., E. Rosa, G. Fornaris, R. Morales y W. Mercado. 2006. Enfermedades prevaletentes en la sandía en el área sur de Puerto Rico. Conferencia anual de Caribbean Food Crop Society. 42:209-213.
- Estévez de Jensen, C., J. C. V. Rodrigues y L. Polanco. 2008. Watermelon vine decline in Puerto Rico. *Phytopathology*. 96:S164. June (Supplement).
- Fishpool L. D. C., C. Fauquet, D. Fargette, J.-C. Thourenel, C. Burdan y J. Colvin. 1995. The phenology of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations of cassava in southern Côte d'Ivoire. *Bulletin of Entomological Research*. 85: 197-207.
- García-Cano, E., R. O. Resende, R. Fernández-Muñoz y E. Moriones. 2006. Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in tomato. *The American Phytopathological Society*. 96(11): 1263-1269.
- Hadidi, A., L. Levy y E. V. Podleckis. 1995. Polymerase Chain Reaction Technology En: Singh, R. P. y U. S. Singh (Primera Edición). *Molecular Methods in Plant Pathology*. p.p. 167-187. Lewis Publishers de CRC Press Inc, Boca Raton, Florida 33431.
- Hesler, Ls., F. W. Jr. Plapp. 1986. Use of oil in insect control. *Southwest Entomology Supplies*. 11:1-8.
- ICTVdB-The Universal Virus Database*, version 4. 2006
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>
- Jossey, S y M. Babadoost. 2008. Occurrence and Distribution of Pumpkin and Squash Viruses in Illinois. *Plant Disease*. 92:61- 68.

- Kousik, C., S. Adkins, W. W. Turechek y P. D. Roberts. 2009. Sources of resistance in U.S. plant introductions to watermelon vine decline caused by SqVYV. *HortScience* 44(2): 256-262.
- Kousik, C., S. Adkins, C. G. Webster, W. W. Turechek, P. Stansly y P. D. Roberts. 2010. Effect of reflective mulch and insecticidal treatments on development of watermelon vine decline caused by SqVYV. *Cucurbitaceae Conference 2010*, Charleston, South Carolina. Pp. 237-239.
- Leqoc, H., G. Wisler y M. Pitrat. 1998. Cucurbit viruses: the classics and the emerging. En: *Cucurbitaceae Conference 1998* (J.D. McCreight 9ed): Evaluation and enhancement of cucurbit germplasm. ASH Press, Alexandria, V.A. Pp. 126-142.
- Lowery, D. T. y G. Boteau. 1988. Effects of five insecticidas on the probing, walking and settling behavior of the green peach aphid and buckthorn aphid (Homoptera: Aphididae) on potato. *Journal Economy Entomology* 81: 208-14.
- Mahgoub, H. A., C. Desbiez, C. Wipf-scheibel, G. Dafalla y H. Lecoq. 2003. Characterization and ocurrente of Zucchini yellow mosaic virus in Sudan. *Plant Pathology* 46:800-805.
- Maroto Borrego, J.V, A. M. Gómez y F. Pomares García, 2002. El Cultivo de la Sandía. Edición Ilustrada. Publicado por Mundi-Prensa Libros. Pp 23.
www.google.com.pr/booksid=3dfmqbzr600c&printsec=frontcover&dq=sandia#PPA23,M1.
- McPhail-Medina, R. 2010. Herencia de la resistencia de Papaya ringspot virus-W en cultivares tropicales de calabaza (*Cucurbita moschata*). Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, PR, 62 pp.
- Mohr, H. C., 1986. *Watermelon Breeding*. En: *Breeding Vegetable Crops*. pp. 38. The AVI publishing company, Inc. Westport, Connecticut.
- National Weather Service Weather Forecast Office. 2009. Temperaturas y Precipitaciones normales para Puerto Rico. http://www.srh.noaa.gov/sju/?n=climo_ponce
- Paz Carrasco, L. y L. Wessel-Beaver. 2002. Survey of cucúrbita viruses in Puerto Rico. *Cucurbitaceae Conference: Phytopathology Poster*, Naples, Florida. Pp. 259-264.
- Perring, T. M. N. M. Gruenhagen y Ch. A. Farrar. 1999. Management of plant viral disease through chemical control of insect vectors. *Annual Review Entomology* 44:457-481.
- Pirone, T. P., B. Raccach y L. V. Madden. 1988. Suppression of aphid colonization by insecticidas: effect on the incidente of potyvirus in tobacco. *Plant Disease* 72:350-53.
- Polanco-Florián, L. 2009. El marchitamiento súbito de la sandía [*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum & Nakai]. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, PR, 97pp.

Polston, J. E., L. L. Hladky, F. Akad y W. M. Wintermantel. 2008. First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in cucurbits in Florida. *Plant Disease*. 92:1251.

Powell, G. 1992. The effect of mineral oil on stylet activities and potato virus Y transmission by aphids. *Entomol. Ex. Appl.* 63:237-42.

Raccach, B. 1986. Nonpersistent viruses: epidemiology and control. En: *Advances in virus research*, ed K Maramorosch, FA Murphy, AJ Shatkin, pp. 387-429.

Ramos, N. F., J. A. A. Lima, y M. F. B. Gonçalves. 2003. Symptoms of potyvirus interactions on melon varieties and zucchini. *Fitopatologia Brasileira* 28:199-203.

Roberts, P., P. Stansly, S.T. Adkins, B. D. Bruton, R. Muchovej y C. S. Kousik. 2007. Management of watermelon vine decline in Florida. *American Phytopathology Society*.
http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=213705

Rodriguez, J. C.V., L. Wessel-Beaver y C. Estevez-Jensen. 2009. Wild cucurbit species as reservoirs for Potyviridae in Puerto Rico. *APS Annual Meeting*, Portland, Oregon.
http://esa.confex.com/esa/2007/techprogram/paper_31539.htm.

Tennant, P., M. H. Ahmad y D. Gonsalves. 2005 Field resistance of coat protein transgenic papaya to *Papaya ringspot virus* in Jamaica. *Plant Disease* 89: 841-847.

Untiveros, M., S. Fuentes y L. F. Salazar. 2007. Synergistic interaction of *Sweet potato chlorotic stunt virus* (Crinivirus) with Carla-, Cucumo-, Ipomo-, and Potyvirus infecting sweet potato. *Plant Disease* 91:669-676.

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resource Information Network-(GRIN) (Online Database). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland.
[http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?314923\(08March2010\)](http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?314923(08March2010))

Vance, V. B., P. H. Berger, J. C. Carrington, A. G. Hunt y X. M. Shi. 1995. 5' proximal potyviral sequence mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* (206):583-590.

Wang, J., M. Turina, V. Medina y B. W. Falk. 2009. Synergistic interaction between the Potyvirus, *Turnip mosaic virus* and the Crinivirus, *Lettuce infections yellow virus* in plants and protoplasts. *Virus Research* 144:163-170.

Webb, S. E., S. Adkins y C. A. Baker. 2006. Whitefly transmission of a new virus infecting cucurbits in Florida. *Cucurbitaceae Proceedings 2006*, September 17-21 en Asheville, NC USA. Pp 309-315.

You, B. J., Chiang, C. H., Chen, L. F., Su, W. C., Yeh, S. D. 2005. Engineered mild strains of *Papaya ringspot virus* for broader cross protection in cucurbits. *Phytopathology* 95: 533-540.