

HOSPEDANTES DE CEPAS DEL VIRUS DE LA MANCHA ANILLADA DE LA LECHOSA EN VENEZUELA

Alex González¹, Gustavo Trujillo², Ariadne Vegas³ y Mario José Garrido²

¹Laboratorio de Fitopatología, Fundación DANAC, Apartado 182, San Felipe, Edo. Yaracuy; ²Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Apartado 4579, Maracay 2101; ³INIA, CENIAP, Laboratorio de Biotecnología, Apartado 588, Maracay 2101.

Parte de la Tesis presentada por el primer autor para optar al título de *Magister Scientiarum* en Agronomía en la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela.

Recibido: 23 de enero de 2001.

Aceptado: 11 de junio de 2002.

RESUMEN

González, A., Trujillo, G., Vegas, A. y Garrido, M. J. 2002. Hospedantes de cepas del virus de la mancha anillada de la lechosa en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 15:7-12.

El virus de la mancha anillada de la lechosa (PRSV) es el principal obstáculo en la producción de lechosa en Venezuela. Con la finalidad de reconocer plantas hospedantes de una cepa severa y tres cepas atenuadas del PRSV se realizó un bioensayo en un cobertizo protegido de insectos y en cámara de crecimiento. Las cepas atenuadas T6-10, V1-37, HA 5-1 y una cepa severa obtenidas de lechoso (PRSV-P) fueron inoculadas mecánicamente en especies de las familias Cucurbitaceae, Caricaceae y Chenopodiaceae. La cepa severa indujo síntomas sistémicos en *Cucurbita ficifolia*, *C. pepo* var Caserta y Acc. 8687, *Cucumis anguria*, *C. dipsaceus*, *C. melo* cv Edisto 47, *C. metuliferus* Acc. 2459, *Melothria pendula* y *Momordica charantia*. *Vasconcella monoica* manifestó necrosis y muerte de la planta; *V. cauliflora* presentó necrosis del cogollo en baja proporción. Las cepas atenuadas indujeron síntomas sistémicos en las cucurbitáceas *C. ficifolia*, *C. pepo* cv Caserta y las Acciones 8687 y 17326, *C. anguria*, *C. dipsaceus*, *C. melo* cv Edisto 47, *C. sativus* cv Poinsett 76 y *M. pendula*. Estos resultados fueron corroborados mediante Elisa y la recuperación del virus se hizo en plantas de lechoso cv Cartagena amarilla. *C. ficifolia* y *M. charantia* son citadas como nuevos hospedantes experimentales de la cepa severa del PRSV a escala mundial. Asimismo, son citados siete nuevos hospedante para las cepas atenuadas nacionales T6-10 y V1-37. Las especies de chenopodiáceas evaluadas no manifestaron lesiones locales. Estos resultados pueden ser de interés en la detección y caracterización biológica de las cepas atenuadas, así como en los estudios epidemiológicos del PRSV en Venezuela.

Palabras clave adicionales: *Carica papaya*, cepas atenuadas, *Cucurbita ficifolia*, *Momordica charantia*, PRSV.

ABSTRACT

González, A., Trujillo, G., Vegas, A. and Garrido, M. J. 2002. Host range of *Papaya ringspot potyvirus* strains in Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 15:7-12.

Papaya ringspot potyvirus (PRSV) is the main obstacle in the papaya production in Venezuela. Hosts range studies were carried out to evaluate one severe and three attenuated strains of PRSV under shed protected of insects and growth chamber conditions. The attenuated strains T6-10, V1-37, HA 5-1 and local severe PRSV strain obtained from papaya (PRSV-P) were evaluated by mechanical inoculations on Cucurbitaceae, Caricaceae and Chenopodiaceae species. *Cucurbita ficifolia*, *C. pepo* var Caserta and Acc. 8687, *Cucumis anguria*, *C. dipsaceus*, *C. melo* cv Edisto 47, *C. metuliferus* Acc. 2459, *Melothria pendula* and *Momordica charantia* resulted susceptible to the severe strain, showing systemic symptoms. *Vasconcella monoica* showed severe necrosis and death of plants; *V. cauliflora* evidenced necrosis in low proportion. For the PRSV attenuated strains the following cucurbits showed systemic symptoms: *C. ficifolia*, *C. pepo* cv Caserta and Accs. 8687 and 17326, *C. anguria*, *C. dipsaceus*, *C. melo* cv Edisto 47, *C. sativus* cv Poinsett 76 and *M. pendula*. These results were checked by Elisa test and the recovery of the virus from host species was made in papaya plants cv Cartagena amarilla. *C. ficifolia* and *M. charantia* are mentioned as new experimental hosts of the severe strain of PRSV to world scale. Also, seven new hosts are recognized for national strains T6-10 and V1-37. None of *Chenopodium* species showed local lesions. The results will available in mutant or strain detection, biological characterization and epidemiology studies of PRSV in Venezuela.

Additional key words: attenuated strains, *Carica papaya*, *Cucurbita ficifolia*, *Momordica charantia*, PRSV.

INTRODUCCIÓN

El virus de la mancha anillada de la lechosa (*Papaya ringspot potyvirus*, PRSV) causa la principal enfermedad del lechoso (*Carica papaya* L.) a escala mundial, limitando la producción y comprometiendo la viabilidad económica del cultivo (6,7,23). Es transmitido por muchas especies de áfidos de manera no persistente y tiene una estrecha gama de hospedantes confinada sólo a las familias Caricaceae, Cucurbitaceae y Chenopodiaceae. Las cepas del PRSV están divididas en dos grupos: el grupo que infecta lechoso y cucurbitáceas (PRSV-P) y el grupo que infecta sólo cucurbitáceas (PRSV-W). Ambos grupos son serológicamente indistinguibles o están fuertemente relacionados (6,14,17).

Los bioensayos son utilizados frecuentemente en el diagnóstico para confirmar la patogenicidad y en el estudio de hospedantes (1,16,25). La transmisión de un virus a un hospedante susceptible es uno de los pocos métodos para diferenciar entre una enfermedad transmitida por virus y una enfermedad abiótica, cuando la muestra presenta síntomas

confusos (13,15). Esto reviste mayor utilidad cuando otros métodos de diagnóstico no son aplicables, como por ejemplo la dificultad para el diagnóstico serológico de las cepas atenuadas nacionales del PRSV-P utilizando estuches de Elisa importados (20). El objetivo de este trabajo fue el reconocimiento de hospedantes para la identificación y caracterización biológica de las cepas atenuadas del PRSV-P obtenidas recientemente en Venezuela (21) y conocer su papel epidemiológico con respecto a la cepa severa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Siembrado y mantenimiento de hospedantes. Semillas pregerminadas de las especies hospedantes fueron trasplantadas a potes plásticos de 1,5 L de capacidad conteniendo una mezcla esterilizada de arena, tierra y abono orgánico en proporción 1:1:1 (v/v). Las plántulas (3/pote) fueron mantenidas en un cobertizo a prueba de insectos a 24-32 °C y a 45-95 % hr. Las plantas fueron abonadas en forma de riego con una fórmula completa (14-14-14) en dosis de 5 g/L cada

15 d y se aplicaron semanalmente insecticidas y fungicidas como medida preventiva durante todo el ensayo. Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Virología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela en Maracay, Edo. Aragua.

Especies utilizadas. Se probaron 24 especies o cultivares pertenecientes a las familias Caricaceae [*Carica papaya* L. cv Cartagena amarilla, *Vasconcella monoica* Desf., *V. cauliflora* Jacq.], Cucurbitaceae [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn., *Cucurbita maxima* Duch., *C. ficifolia* Bouche., *C. pepo* L. cv Caserta y accesiones 173261 y 86871, *C. moschata* Duch. accesiones 11446 y 11443, *C. mixta* L. accesiones 8904 y 8131, *Cucumis anguria* L., *C. dipsaceus* Spach., *C. melo* L. cv Edisto 47, *C. melo* ssp. *agrestis*., *C. metuliferus* (Naud.) Mey. accesión 2459, *C. sativus* L. cv Poinsett 76, *Citrullus vulgaris* Schrad cv Sunshade, *Melothria pendula* L., *Momordica charantia* L., *Lagenaria siceraria* (Mold.) Standl., *Luffa aegyptiaca* Mill. y *L. operculata* (L.) Cogn.] y Chenopodiaceae [*Chenopodium album* L., *Ch. amaranticolor* Coste y Reyn. y *Ch. quinoa* Will.].

Aislamientos virales. Los tratamientos estuvieron constituídos por una cepa severa y tres cepas atenuadas (dos nacionales y una foránea) del PRSV-P obtenidas por mutagénesis química (21) e identificadas como T1 (PRSV-P severo local), T2 (cepa atenuada T6-10), T3 (cepa atenuada V1-37) y T4 (cepa atenuada HA 5-1 de Hawaii). Previamente, estas cepas fueron multiplicadas en *C. papaya* y luego preservadas a -20 °C.

Inoculación mecánica. Se tomaron 10 g de tejido foliar de plantas infectadas con las cepas virales y se maceraron por separado en un mortero estéril y frío con tampón fosfato de potasio 0,01 M, pH 7, en una proporción 1: 2 (p/v). El extracto obtenido se frotó suavemente sobre hojas espolvoreadas con carborundo 600. Al momento de la inoculación las plantas de caricáceas y chenopodiáceas tenían 45 d de edad (en tres hojas apicales expandidas), mientras que las cucurbitáceas tenían 8-15 d (hojas cotiledonares). Luego, se lavaron las hojas suavemente con agua para eliminar el exceso de abrasivo. El material se identificó y se mantuvo en un cobertizo a 25°C y 79% hr (promedio). En otro ensayo, después de la inoculación, las plantas fueron colocadas en una cámara de crecimiento cuyas características fueron: estantería metálica de color blanco, dimensiones de 0,9 x 0,6 m de la lámina o paño, a una distancia de 0,5 m entre paños, instalando una combinación de bombillos de luz blanca (fría) y amarilla (incandescente) en una relación 3:2, respectivamente. Las condiciones en la cámara fueron: 4200 lux, 27,4 °C y 71,4% hr; las plantas fueron expuestas a un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. La evaluación de las plantas se realizó cada 2 d a partir de la inoculación.

Recuperación del virus. Treinta días después de la inoculación se cosecharon hojas de las plantas con síntomas o sin síntomas. Una porción de tejido fue usada para inocular macánicamente plantas de *C. papaya* cv. Cartagena amarilla; éstas plantas fueron transferidas a un cobertizo a 25°C y 79% hr y se evaluaron durante 60 d.

Serología. Se usó un estuche comercial de Elisa (Sanofi, Francia) con un anticuerpo policlonal polivalente desarrollado para el PRSV-W, que detecta serotipos del PRSV-P severo local (20). La concentración de la 4-nitrofenilfosfatasa del sustrato fue duplicada, debido a la coloración débil y al retraso en el tiempo de tinción; el resto del procedimiento fue el sugerido por la casa comercial. Se tomó una muestra compuesta de cada

tratamiento recolectando las hojas que mostraban mejores síntomas u hojas sin síntomas. El valor del tampón se consideró como blanco, se colocaron las muestras al azar y por duplicado para evitar falsos resultados; lo mismo se hizo con los testigos sanos y enfermos (PRSV-W) del estuche comercial. Los valores de absorbancia se registraron después de 1-2 h de incubación usando un lector Multiskan EX. Se consideró una muestra positiva cuando presentaba una absorbancia dos veces superior a la media de las absorbancia obtenidas con las plantas sanas o control.

Variabes medidas. El diseño del experimento fue completo al azar; se inocularon 12 plantas de cada una de las 24 especies o cultivares seleccionados con cuatro cepas virales distintas (tratamientos). La unidad experimental estuvo constituida por tres plantas/pote y cuatro repeticiones / tratamiento. Se dejó un testigo por cada especie (3 plantas) inoculado con tampón fosfato de potasio 0,01 M, pH 7. Los síntomas fueron evaluados cualitativamente y la concentración viral fue determinada por Elisa. Los valores de absorbancia y la sintomatología fueron analizados mediante el programa estadístico Statistix.

RESULTADOS

Inoculación mecánica de hospedantes. Ninguna de las cepas del PRSV-P evaluadas produjo lesiones locales en *Ch. quinoa*, *Ch. amaranticolor* o *Ch. album*. La cepa severa del PRSV-P en *C. papaya* cv Cartagena amarilla indujo síntomas foliares de moteado, mosaico, distorsión o deformación, manchas grasientas en el tallo y retardo en el crecimiento de la planta. Esta misma cepa, en condiciones de cobertizo, causó en *V. cauliflora* necrosis del cogollo en una planta, mientras que en *V. monoica*, a partir del segundo día de inoculada, produjo síntomas incipientes de mosaico, amarillamiento y necrosis, que fueron acentuándose hasta ocasionar la muerte temprana de la planta (antes de los 25 d). Las cepas atenuadas no indujeron síntomas en las especies de caricáceas.

Los resultados de la transmisión de las cepas probadas en los diferentes hospedantes aparecen registrados en el Cuadro 1. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos por López (10) y Vegas (19,22) para comprobar el efecto de las cepas del PRSV-P severo sobre los hospedantes en diferentes épocas.

Con relación a las especies de cucurbitáceas, la cepa severa indujo síntomas suaves de moteado y mosaico (Fig. 1A); en algunos casos produjo ampollamiento, deformación, reducción de la lámina, estrías y clarificación de las venas, mientras que las cepas atenuadas causaron síntomas similares a los inducidos por la cepa severa (Fig. 1B). Los síntomas fueron evidentes a partir de 10 a 20 d en las especies susceptibles y presentaron diferente grado de intensidad durante el desarrollo de la planta, mientras que los testigo no desarrollaron síntomas. En la cámara de crecimiento los síntomas fueron más evidentes y se apreciaron con mayor nitidez. Bajo estas condiciones la cepa T6-10 indujo síntomas en *C. ficifolia*, a diferencia de los resultados obtenidos en condiciones de cobertizo. Con la excepción de *C. ficifolia*, el resto de los hospedantes se comportaron de manera similar en ambas condiciones.

Serología. A diferencia de los resultados de Elisa para las cepas atenuadas en las especies de *Carica* y *Vasconcella*, el resto de las lecturas de Elisa fueron consistentes con la sintomatología observada en los ensayos de cobertizo y cámara de crecimiento. Las plantas que mostraron síntomas después

Cuadro 1. Reacción de varias especies de plantas a la inoculación mecánica con cuatro cepas del virus de la mancha anillada de la lechosa.

| Especie | Cepas | | | |
|----------------------------------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | Severa | T6-10 | V1-37 | HA 5-1 |
| <i>Vasconcella cauliflora</i> | sd (1/12) ⁽¹⁾ | ss | ss | ss |
| <i>V. monoica</i> | SS (9/12) | ss | ss | ss |
| <i>Cucurbita ficifolia</i> | sd (1/12) | sm (4/12) | ss | ss |
| <i>C. pepo</i> cv Caserta | sm (6/12) | ss | ss | sm (2/12) |
| <i>C. pepo</i> Acc.17326 | ss | ss | sd (4/12) | ss |
| <i>C. pepo</i> Acc.8687 | sd (1/12) | sm (1/12) | ss | ss |
| <i>Cucumis anguria</i> | sm (1/12) | sd (1/12) | ss | ss |
| <i>C. dipsaceus</i> | sd (7/12) | ss | sd (1/12) | sm (2/12) |
| <i>C. melo</i> cv Edisto 47 | sm (3/12) | sm (2/12) | ss | ss |
| <i>C. sativus</i> cv Poinsett 76 | ss | ss | sd (1/12) | ss |
| <i>C. metuliferus</i> Acc.2459 | sm (4/12) | ss | ss | ss |
| <i>Melothria pendula</i> | sm (4/12) | sm (2/12) | sm (6/12) | sd (1/12) |
| <i>Momordica charantia</i> | sd (2/12) ⁽²⁾ | ss | ss | ss |

⁽¹⁾ ss = sin síntomas (ausencia de infección, Elisa negativo); sd = síntomas débiles (mosaico o moteado suave, Elisa positivo); sm = síntomas moderados (moteado o mosaico moderado, estriado, clarificación de venas, Elisa positivo); SS = síntomas severos (moteado o mosaico severo, amarillamiento, deformaciones, necrosis, muerte de plantas, Elisa positivo); (plantas con síntomas / plantas inoculadas).

⁽²⁾ No fue detectada mediante serología.

de la inoculación con la cepa severa y cepas atenuadas dieron lecturas positivas en la prueba de Elisa, mientras que las plantas que no mostraron síntomas dieron lecturas negativas. Las lecturas de Elisa fueron analizadas estadísticamente mediante el análisis de varianza de una clasificación por rangos de Kruskal y Wallis, detectándose diferencias significativas ($p=0,05$), lo cual evidencia que hubo diferencia entre los tratamientos.

La comparación de medias de las lecturas de Elisa del ensayo de cobertizo permitió separar cuatro grupos homogéneos, lo que hizo posible correlacionar los resultados de la serología con la sintomatología. Se consideró el control enfermo (PRSV-W) como el Tratamiento 5, con una lectura promedio de 0,708 nm de absorbancia; el Tratamiento 6 correspondió al control sano, con un valor promedio de 0,082 nm, ambos pertenecientes al estuche comercial de Elisa. La cepa severa o Tratamiento 1 infectó 11 especies con un promedio de 0,263 nm de absorbancia, siguiendo en orden al testigo enfermo. Con relación a las cepas atenuadas, el Tratamiento 3 (cepa T6-10) con un promedio de 0,202 nm de absorbancia, presentó una lectura cercana al Tratamiento 1, infectando cinco hospedantes; el Tratamiento 4 (cepa HA 5-1) mostró un promedio de 0,198 nm, infectando sólo tres especies. Hasta aquí los valores de absorbancia indican un mismo grupo. El Tratamiento 2 (cepa V1-37) infectó cuatro hospedantes, con un promedio de 0,176 nm de absorbancia, ubicándose más distante del control enfermo. El resto de las especies, independientemente del tratamiento, evidenció lecturas cercanas al control sano.

Condiciones ambientales. Bajo condiciones de cobertizo, durante el periodo febrero-marzo de 1999, el factor temperatura se mantuvo más o menos estable, registrándose el pico más alto (25,7 °C) en marzo, mientras el pico más bajo (24,52 °C) se registró en el mismo mes, lo que evidenció poca variación de la temperatura por día o potencial térmico diario. Con relación a la humedad relativa, el pico más alto (80,18%) fue en febrero y el pico más bajo (77,49 %) en el mismo mes. En condiciones de cámara de crecimiento, el pico más alto (33,5 °C) se registró en agosto a las 2 pm y el más bajo (22 °C) en el

mismo mes a las 7 am, la temperatura promedio fue de 27,4 °C, aunque durante la noche hubo un descenso, se mantuvo a 25 °C la mayor parte de la noche.

Recuperación del virus. Diez plantas de *C. papaya* cv Cartagena amarilla fueron inoculadas con tejido fresco proveniente de las diferentes especies que resultaron infectadas con el Tratamiento 1 (PRSV-P severo). En las caricáceas se logró la recuperación a partir de *V. monoica* y de *C. papaya* más no de *V. cauliflora*. En *C. papaya* inoculado con extracto de tejido de cucurbitáceas infectados fue más tardía la aparición de síntomas, hasta 30 d en algunos casos y en menor proporción, que varió de acuerdo al hospedante. Se logró recuperar el virus de *C. pepo* cv Caserta, *C. dipsaceus*, *C. melo* cv Edisto 47, *C. metuliferus* Acc.2459 y *M. pendula*, en un plazo menor de los 30 d. Durante la recuperación del PRSV-P proveniente de las demás especies fueron observados síntomas en *C. papaya* después del tiempo mencionado.

DISCUSIÓN

Ninguna de las cepas del PRSV-P probadas en estas condiciones produjo lesiones locales en *Ch. amaranticolor* y *Ch. quinoa*, especies citadas como susceptibles (lesiones locales) a este virus (1,23,25). Estos resultados coinciden con otros trabajos realizados en el país (10,22). Las especies de cucurbitáceas probadas que resultaron susceptibles a la cepa severa del PRSV-P fueron *C. ficifolia*, *C. pepo* cv Caserta y Acc. 8687, *C. anguria*, *C. dipsaceus*, *C. melo* cv Edisto 47, *C. metuliferus* Acc. 2459 y *M. pendula*, lo cual fue confirmado por bioensayos y Elisa. En *M. charantia* el PRSV-P sólo fue determinado por sintomatología y no pudo ser detectado por Elisa; casos similares son citados por Putnam (15). Se concluye que *M. charantia* es susceptible al PRSV-P severo local, ya que los síntomas se repitieron en el ensayo de la cámara de crecimiento y no fueron observados en las plantas testigo.

De las especies de cucurbitáceas que resultaron susceptibles al PRSV-P, la literatura mundial cita a *C. pepo*, *C. anguria*, *C. melo*, *C. dipsaceus*, *C. metuliferus* Acc. 2459 y *M. pendula*, con la diferencia que en este trabajo se usaron

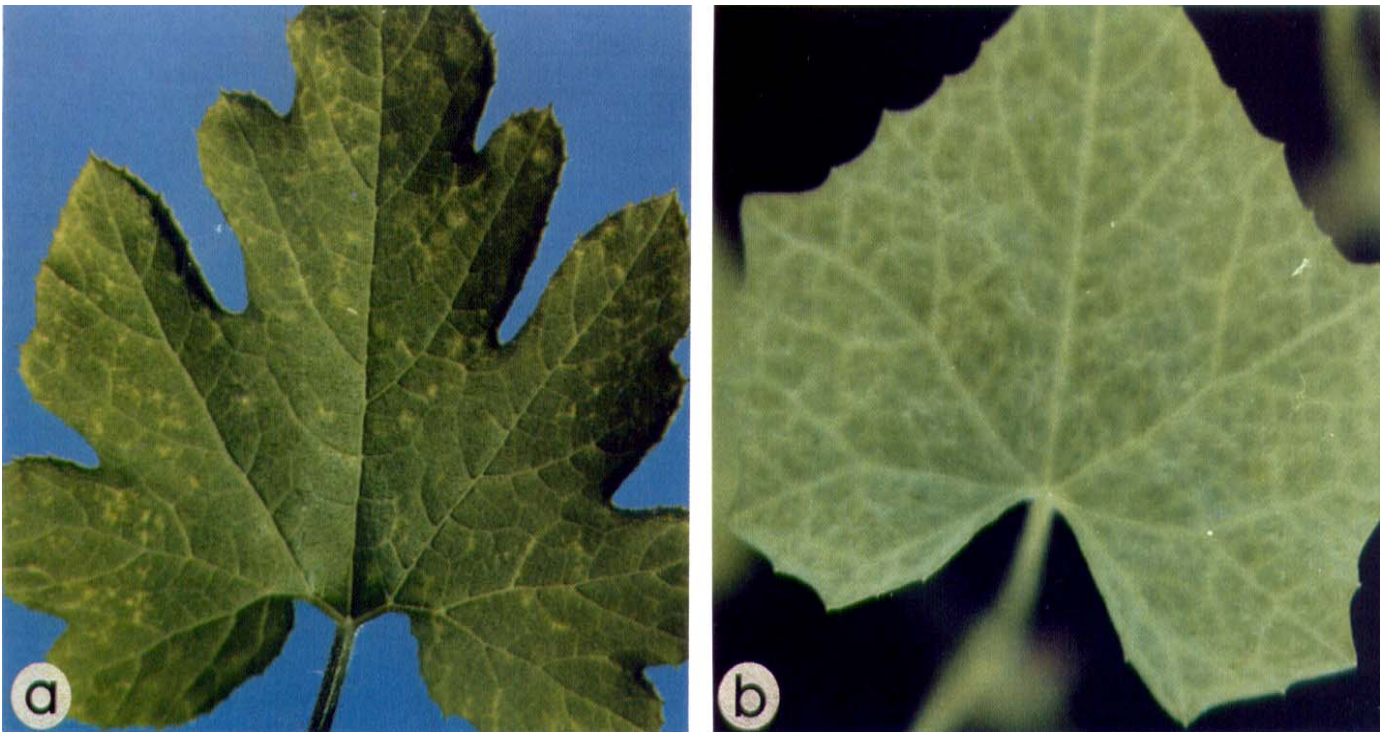


Fig. 1. Síntomas inducidos por el virus de la mancha anillada de la lechosa: a) Moteado suave en *Cucurbita pepo* cv Caserta causado por la cepa severa; b) Mosaico y clarificación de venas producido por la cepa atenuada V1-37 en *Melothria pendula*.

cultivares distintos de *C. pepo* y *C. melo* (14,16,17,25). En cuanto a la literatura nacional, se ha mencionado la transmisión del virus en *C. pepo* (4,10) y *Melothria guadalupensis* (10), con la observación que esos experimentos fueron conducidos en otras condiciones, usando otros cultivares y otras cepas del PRSV-P severo. Con excepción de *C. pepo* y *M. guadalupensis*, el resto de las especies que resultaron susceptibles al PRSV-P son reconocidas por primera vez en Venezuela, mientras que *C. ficifolia* y *M. charantia* se reconocen en este trabajo como nuevos hospedantes experimentales del PRSV-P.

Sobre la base de la reacción a la inoculación mecánica y la serología, los hospedantes que resultaron susceptibles a las cepas atenuadas fueron: *C. ficifolia*, *C. pepo* Acc. 8687, *C. anguria*, *C. melo* cv Edisto 47, *C. metuliferus* Acc. 2459 y *M. pendula* infectadas por la cepa T6-10. *C. pepo* Acc.17326, *C. dipsaceus*, *C. sativus* cv Poinsett 76 y *M. pendula* fueron infectadas por la cepa V1-37. La cepa HA 5-1 infectó a *C. pepo* cv Caserta, *C. dipsaceus* y *M. pendula*. Por consiguiente, todas estas especies son reconocidas como nuevos hospedantes de las cepas atenuadas del PRSV-P producidas en el país. La cepa HA 5-1 se comportó diferente con relación a lo señalado por Yeh *et al.* (23,24), ya que esta cepa es multiplicada de manera rutinaria en *Cucumis metuliferus* Acc. 2459. Por otra parte, se pudo observar que *M. pendula* (7,8) es el hospedante más sensible a la infección de todas las cepas atenuadas probadas, seguido por *C. dipsaceus* y *C. pepo*, lo cual le da ventaja como hospedante experimental sobre el resto de las cucurbitáceas por detectar el mayor número de cepas con alta concentración de virus.

La cepa severa del PRSV-P fue recuperada en baja proporción a partir de las cucurbitáceas al reinocular en *C. papaya* cv Cartagena amarilla, observándose la aparición de síntomas conspicuos en un lapso más prolongado, comparado con *V. monoica*. Esto se debió, posiblemente, a la baja

concentración de virus en el tejido. *V. monoica* exhibió amarillamiento generalizado, necrosis y muerte de la planta en respuesta a la inoculación de la cepa severa; este último se diferencia de los síntomas descritos en la literatura (12). Las plantas de *V. cauliflora* evidenciaron necrosis del cogollo en baja proporción y lecturas débiles en Elisa ante la inoculación con el PRSV-P severo; esta especie ha sido citada como resistente al virus (8,11,12). En ambas especies la inoculación de las cepas atenuadas no produjo síntomas y suponemos que existe un patrón de comportamiento de estas especies ante las cepas atenuadas parecido al de *C. papaya*. Estas observaciones condujo a una investigación más exhaustiva sobre estas dos especies. En *C. papaya* no se pudo comprobar la recuperación de las cepas atenuadas porque éstas no inducen sintomatología, aunque se puede detectar la infección por medio del reto con PRSV-P severo (20), lo que no se hizo en este trabajo por representar el riesgo de contaminación por otras cepas en un plazo muy prolongado de evaluación en nuestras condiciones.

Fueron detectadas un total de 20 especies y cultivares susceptibles a los tratamientos por sintomatología, en comparación con las 19 detectadas por Elisa (96% de similitud), lo que da confiabilidad a los dos métodos de diagnóstico usados (15). El porcentaje de transmisión indicó que existen ventajas entre hospedantes en los bioensayos; por ejemplo, entre las cucurbitáceas, *C. dipsaceus* sería mejor que *C. metuliferus* Acc.2459 y *M. pendula*, para la detección del PRSV-P; para la cepa atenuada T6-10 tenemos a *C. ficandifolia*, para la cepa V1-37 sería *M. pendula* y para la cepa HA 5-1 tenemos a *C. pepo* cv Caserta y *C. dipsaceus* (Cuadro 1).

Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de los conseguidos por López (10) y Vegas *et al.* (19,22) en estudios realizados sobre hospedantes del PRSV-P severo de la localidad de Maracay y otras zonas. El primero reconoció dos especies de cucurbitáceas afectadas por el PRSV-P y no logró la transmisión del virus a otras especies de caricáceas diferente

de *C. papaya*. Por su parte, Vegas (22) logró la transmisión del virus a *C. papaya* y posteriormente (19) informó sobre la susceptibilidad de *V. monoica*. Ambos utilizaron especies similares de cucurbitáceas y caricáceas a los usados en este trabajo, con la diferencia que Vegas realizó sus ensayos en Maracay (Aragua) y López en Altos de Pipe (Miranda), en diferentes épocas. En este estudio se logra el reconocimiento de nueve especies de cucurbitáceas y tres especies de caricáceas como hospedantes del PRSV-P severo. Al comparar los resultados obtenidos en esta investigación con los antes citados, se concluye que la cepa del PRSV-P severo evaluada es más virulenta.

Sobre la base de los resultados obtenidos por Lange (9) en el crecimiento de *C. papaya* en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa, se diseñó una cámara de crecimiento, lo cual favoreció el desarrollo de la sintomatología en comparación con el ensayo bajo cobertizo. De hecho, la cepa atenuada T6-10 indujo síntomas en *C. ficifolia* y fue posible detectarla por Elisa sólo cuando creció en condiciones de 4200 lux a 27, 4 °C y 71,4% hr.

Vegas *et al.* (20) informaron sobre las dificultades en el diagnóstico serológico de las cepas atenuadas del PRSV-P de Venezuela. En virtud de estos antecedentes, se modificó la metodología de Elisa recomendada por Sanofi-Pasteur para lograr mejores resultados. El factor modificado fue el cromógeno del sustrato (4-nitrofenilfosfatasa); a esto se debió el retraso en el tiempo de lectura de la prueba, por lo demás, el proceso funcionó normal. Otro aspecto considerado fue la interpretación de los datos de Elisa; se siguió la recomendación de Sutula *et al.* (18), haciendo uso de histogramas para visualizar la frecuencia de distribución de los valores y el establecimiento del umbral de lectura para los controles enfermos y sanos.

C. papaya, como hospedante natural del virus, representa la especie más importante de este estudio, ya que la transmisión mecánica del PRSV-P severo fue de un 91,6% y la concentración del virus en el tejido fue alta (verificada por Elisa). Las otras especies de caricáceas representan un potencial en el estudio del PRSV-P; *V. monoica* evidenció un 75% de transmisión del PRSV-P severo con lecturas altas de Elisa, mientras que en *V. cauliflora* hubo un 8,3% de transmisión con síntoma de necrosis del cogollo, lo cual se consideró una reacción de hipersensibilidad en principio por la posterior recuperación de la planta. Las lecturas débiles de Elisa evidenciaron que el virus se multiplicó en todas las plantas de *V. cauliflora* inoculadas con la cepa severa. Este hecho evidencia la posibilidad de encontrar hospedantes asintomáticos donde no se detectan las cepas atenuadas por medio de Elisa convencional, tal como se presenta en la familia Caricáceae. Esto indica que la gama de hospedantes del PRSV-P puede ser más amplia a la encontrada en este trabajo. Por tanto, se recomienda continuar con este tipo de estudio, ampliando el número de especies por familia e incorporando otras familias.

Aunque las especies de cucurbitáceas mencionadas exhibieron síntomas sistémicos más débiles o atenuados ante la inoculación con la cepa severa y cepas atenuadas del PRSV-P con relación a las caricáceas, pueden ser útiles en la detección, identificación, caracterización o separación de cepas en bioensayos. *C. dipsaceus* sería la mejor especie de cucurbitácea para detectar el PRSV-P severo con el 58,3% de transmisión; *C. ficifolia* sería la especie más adecuada para detectar la cepa T6-10 con el 33,3% de transmisión; *M. pendula* para la cepa

V1-37 con el 50%, mientras que *C. pepo* cv Caserta y *C. dipsaceus* servirían para la detección de la cepa HA 5-1 de Hawaii con el 16,6% de transmisión. Estos porcentajes de transmisión se consideran bastante buenos, ya que este es el primer reconocimiento de hospedantes, sobre todo para las cepas atenuadas producidas en Venezuela, no así para la cepa HA 5-1 de Hawaii.

No se descarta la existencia de hospedantes para la cepa severa y cepas atenuadas del PRSV-P que soporten una síntesis masiva de virus y muestren una sintomatología más marcada, como es el caso de *C. pepo* cvs Early Prolific Straightneck (4,10) y Small Sugar (22), ya que se ha determinado que la concentración del virus varía con el cultivar (5,13). No obstante, como la cepa del PRSV-P severo se encontró en baja concentración y proporción en las cucurbitáceas, se puede solventar esta deficiencia con la siembra de más plantas y buscar un punto donde las condiciones favorezcan aún más la expresión de los síntomas y la concentración del virus. En este sentido, no se recomienda utilizar las cucurbitáceas probadas en las condiciones evaluadas para la multiplicación de la cepa severa y atenuadas del PRSV-P como fuente de virus para la purificación, salvo que se implementen medidas que permitan concentrar mejor el virus, lo cual debe ser monitoreado por técnicas de diagnóstico.

La cepa atenuada T6-10 se comportó mejor que las restantes, multiplicándose en mayor concentración en una gama más amplia de cucurbitáceas. Se comprobó que la prueba de Elisa, una vez modificada, fue eficaz para la detección de la cepa severa y cepas atenuadas del PRSV-P en la mayoría de los hospedantes utilizados en este estudio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a los profesores Baltasar Trujillo y Victor Badillo (UCV, Facultad de Agronomía, Instituto de Botánica Agrícola, Maracay) por su valiosa ayuda en la identificación de las especies de cucurbitáceas y caricáceas. Asimismo, al CATIE (Costa Rica) por el suministro de semilla de algunas especies de cucurbitáceas.

LITERATURA CITADA

1. Brunt, A., Crabtree, K., and Gibbs, A. 1990. Viruses of tropical plants. Wiltshire, UK. CAB International. Redwood Press. pp. 374-377.
2. Conover, R. 1962. Virus disease of papaya in Florida. Phytopathology 52:6.
3. Cook, A. 1972. Virus disease of papaya. Fla. Agric. Exp. Sta. Bull. N° 750. 19 pp.
4. De la Rosa M. and Lastra, R. 1983. Purification and partial characterization of papaya ringspot virus. Phytopath. Z. 106:329-336.
5. Gibbs, A. and Harrison, B. 1976. Plant Virology. The principles. London, Edward Arnold. pp. 1-128.
6. Gonsalves, D. 1998. Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study. Annu. Rev. Phytopathol. 36:415-431.
7. Gonsalves, D. and Garnsey, S. 1989. Cross-protection techniques for control of plant virus diseases in the tropics. Plant Dis. 73:592-597.
8. Horovitz, S. y Jiménez, H. 1967. Cruzamientos interespecíficos e intergenéricos en caricáceas y sus implicaciones fitotécnicas. Agronomía Trop. 27:323-343.
9. Lange, A. H. 1961. The effect of temperature and photoperiod on the growth of *Carica papaya*. Ecology 42: 481-486.

10. López, O. 1972. Identificación de las virosis de la lechosa (*Carica papaya* L.) en Venezuela. Rev. Fac. Agron. (Maracay) 6:5-36.
11. Magdalita, P., Persley, D., Godwin, I., and Drew, R. 1997. Screening *Carica papaya* x *C. cauliflora* hybrids for resistance to papaya ringspot virus type P. Plant Pathology 46:837-841.
12. Malaguti, G., Jiménez, H. y Horovitz, S. 1957. Pruebas de transmisión del mosaico de la lechosa a otras especies de *Carica*. Agronomía Trop. 7: 23-31.
13. Matthews, R.E.F. 1991. Plant Virology. 3rd ed. San Diego, Academic Press. pp. 1-518.
14. Purcifull, D., Edwarson, J., Hiebert, H., and Gonsalves, D. 1984. Papaya ringspot virus. Descriptions of Plants Viruses No. 292. CMI/AAB, Kew, Surrey, UK. 8 pp.
15. Putnam, M. 1995. Evaluation of selected methods of plant disease diagnosis. In Crop Protection. Great Britain, Elsevier Science. pp. 517-525.
16. Quiot-Douine, L., Lecoq, H., Quiot, J., Pitrat, M., and Labonne, G. 1990. Serological and biological variability of virus isolates related to strains of papaya ringspot virus. Phytopathology 80: 256-263.
17. Shukla, D., Ward, D., and Brunt, A. 1994. The potyviridae. Wallingford, UK. CAB International. 516 pp.
18. Sutula, Ch., Gillet, J., Morrissey, M., and Ramsdell, D. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. Plant Dis. 70: 722-726.
19. Vegas, A. 1996. Control del virus de la mancha anillada de la lechosa vía cultivo de tejidos, protección cruzada e ingeniería genética. Tesis Doctoral. Maracay, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 196 pp.
20. Vegas, A., González, A., Trujillo, G. y Pino, I. 1998. Dificultad en el diagnóstico serológico de cepas atenuadas del virus de la mancha anillada de la lechosa. Fitopatol. Venez. 11: 40-44.
21. Vegas, A., Pino, I., Trujillo, G., González, A., Mata, J. y Monteverde, E. 2000. Avances sobre el control integrado del virus de la mancha anillada del lechoso mediante la implementación de la inoculación de cepas atenuadas y prácticas culturales. Agronomía Trop. 50: 303-309.
22. Vegas, A., Trujillo, G. y Cermeli, M. 1985. Importancia, distribución e incidencia de los virus que afectan la lechosa (*Carica papaya* L.) en algunas zonas productoras del país. Rev. Fac. Agron. (Maracay) 14: 213-237.
23. Yeh, S. and Gonsalves, D. 1994. Practices and perspective of control of papaya ringspot virus by cross protection. Advances in Disease Vector Research. New York. Springer-Verlag. pp. 237-257.
24. Yeh, S. and Gonsalves, D. 1984. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. Phytopathology 74: 1086-1091.
25. Yeh, S., Gonsalves, D., and Provvidenti, R. 1984. Comparative studies on host range and serology of papaya ringspot virus and watermelon mosaic virus 1. Phytopathology 74:1081-1085.