ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

"Capacidad de dos especies de áfidos (HOMÓPTERA: APHIDIDAE) para transmitir *Squash Mosaic Virus-SqMV*en melón bajo condiciones de invernadero eidentificación de sus enemigos naturales''.

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÍCOLA Y BIOLÓGICO

Presentada por:

Jorge Rafael Paredes Montero

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2011

AGRADECIMIENTO

Infinitas gracias a Dios, mi fortaleza y soporte, por permitirme concluir este trabajo con salud y vida y por mantener siempre encendida en mí, la luz que me guía.

A mi madre, María Montero, por darme la vida, por ser el impulso necesario para dar grandes pasos ypor permitirme estudiar en esta universidad. Gracias *mamita* por el apoyo incondicional y por tu cariño bien dado. Agradezco también a todos mis hermanos y sobrinos, deseo que este trabajo sirva de inspiración especialmente para los más pequeños.

Porque este trabajo no sería el mismo sin su tutoría agradezco a mis "*madres en la ciencia*" M.Sc. Myriam Arias Zambrano y Ph.D Esther Lilia Peralta, grandes mujeres, que son la inspiración que me permiten realizar mis trabajos con esmero y entusiasmo. Además, muchas gracias a mi primera tutora Ing. Lisbeth Espinoza por permitirme realizar este trabajo y por su invaluable supervisión.

A mis compañeros y amigos Adriana Montero, Paola Llandán, Marcos Medina, Robert Álvarez, Freddy Magdama, Rosita Rivera, Antonio García, Andrés Ochoa, Ricardo Proaño……., por los buenos momentos vividos y por el mutuo apoyo que permitieron que todos o la gran mayoría del grupo salga adelante.

Porque me enseñaron a querer lo que hago y por todos los sabios consejos que me permitieron hacer las cosas bien, muchas gracias Marita (Ing. María Jama) y Don Rufino.

A mis compañeros del CIBE, infinitas gracias, de manera especial a los Ings. Ana María Campuzano, Fabián Gordillo y a la Srta. Alejandra Ibarra, por el apoyo técnico desinteresado que permitió la culminación de esta tesis. A la Econ. Shirley Huerta Cruz y a la Srta. Karla Aguaguiñapor el apoyo incondicional.

Agradezco a la ESPOL por las becas de estudios y de Equidad y Excelencia (*EyE*) que me permitieron culminar la carrera.

A todos muchas gracias.

DEDICATORIA

A María Montero, Reinaldo Siguencia, Marisol Paredes, José Paredes, María Paredes, Rosita Paredes, Jordy, Nicole, Ricky, Marlon, Justine, Dennise y María José.

M.Sc. Myriam Arias Zambrano, Ph.D Esther Peralta García, Ing. Lisbeth Espinoza, Ing. María Jama, Sr. Rufino Meza.

Adriana Montero, Paola Llandán, Marcos Medina, Robert Álvarez…….

A ti querido hermano, a quien el destino arrebató la posibilidad de lograr la meta que ahora yo estoy alcanzando, Armando Paredes, *DEP*.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Francisco Andrade S.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

M.Sc Myriam Arias Z.
DIRECTORA DE TESIS

Ing. Lisbeth Espinoza L.
VOCAL PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL ''.

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

_____

Jorge Rafael Paredes Montero

RESUMEN

Se colectaron muestras de plantas con síntomas de enfermedades virales, áfidos y controladores biológicos en las localidades dePedro Carbo, Taura (Guayas) y Santa Elena. La identificación de las especies virales se realizó mediante pruebas ELISA-DAS en las que se emplearon diagnosticadores específicos para la detección deSqMV, CMV, ToMV, TEV, TMV, PVY, WSMoV, WMV-2, TSWVy de PRSV producidos por Agdia Inc. (Indiana, EU).

A partir de los insectos colectados se establecieron colonias en plantas de melón sanas mantenidas en el invernadero del CIBE, en cajas entomológicas de 60 x 70 x 150 cm.Para la identificación de las especies de áfidos, se realizó el aclaramiento y montaje de los especímenes siguiendo el método de Hill Ris Lamber (Smith, 1963); se emplearon claves taxonómicas, considerando características específicas de la cabeza, cornículos y cauda de cada espécimen. Se establecieron colonias puras con las especies de áfidos identificados.

Las pruebas de transmisión viral mediante insectos se realizó con la descendencia áptera de dos especies de áfidos obtenidas de las colonias puras previamente establecidas; los áfidos fueron sometidos a una (1) hora de ayuno; cumplido ese período, fueron retirados y colocados en plantas de melón viróticas (*SqMV*) para el período de adquisición de cinco (5) minutos. Se empleó un pincel -000 corona- delineador humedecido para la

manipulación de los insectos. Se colocaron los áfidos infectivos en plantas sanas de melón para el período de inoculación de 5 minutos de acuerdo a lo sugerido por Kalleshwaraswamy (2008). Quince después de la inoculación biológica, se comprobó la infección de las plantas mediante las pruebas inmunoquímicas de ELISA-DAS. Los valores fueron sometidos a un Análisis de la varianza.

La identificación de los enemigos naturales se realizó mediante el uso de claves taxonómicas de enemigos naturales. La identidad de las especies fue comprobada por especialistas del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias[1].

Se comprobó la presencia de *Squash Mosaic Virus* (11,42 % del total de muestras evaluadas) afectando a cultivos de ciclo corto entre los cuales están: *C. melo, C. lanatus, C. annum y Centrosoma sp*. Se detectaron además otras especies virales como*: Cucumber Mosaic Virus, Papaya Ringspot Virus-W, Watermelon Mosaic Virus-2.*

Las especies de pulgones identificadas corresponden a *A. gossypii* Glover y *M. persicae* Sulzer, ambos son importantes especies transmisoras de virus, y además están en capacidad de formar colonias sobre las especies vegetales en estudio.

[1] INIAP, Estación Experimental del Litoral Sur, Laboratorio de Entomología

El vector *A. gossypii* presentó un porcentaje de transmisión de 10,84%± 0,031, bajo condiciones semicontroladas. Especialistas de la Universidad de Georgia [57] y Colorado certifican la posibilidad de la transmisión de SqMV por este vector (Howard Schwartz, comunicación personal). *M. persicae* no es capaz de transmitir el virus.

Se identificaron diez especies de coleópteros depredadores pertenecientes a la familia coccinellidae, todos están en capacidad de alimentarse de las dos especies de pulgones en estudio, los insectos corresponden a: *Brumus quadripustulatus, Scymnus sp, Psyllobora confluens, Psyllobora sp, Cyra sp, Coccinella sp, Microweisea sp, Cycloneda munda, Paraneda pallidula* y *Tenuisvalvae bromelicola.*Otros insectos predadores corresponden a: *Orius insidiosus* y *Pseuodorus clavatus*, las ninfas y adultos de *O. insidiosus*, y solo las larvas de *P. clavatus* se alimentan de pulgones.Se determinó la identidad de una especie de parasitoide de pulgones que corresponde a *Lysiphlebus testaceipes*. Los hongos entomopatógenos de las especies de pulgones en estudio corresponden a: *Nomuraea rileyi* y *Aspergillus ochraceus*.

INDICE GENERAL

Página

RESUMEN II
INDICE GENERAL V
ABREVIATURAS VII
SIMBOLOGÍA VIII
ÍNDICE DE FIGURAS IX
ÍNDICE DE TABLAS X
INTRODUCCIÓN 1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 2
1.1. Virosis en las cucurbitáceas 2
1.2. Especies virales de importancia en cucurbitáceas. 3
1.2.1. Virus Mosaico de la calabaza (Squash Mosaic Virus, SqMV). 4
1.2.2. Virus Mosaico del pepino (Cucumber Mosaic Virus, CMV). 8
1.2.3. Virus del mosaico de la sandía - 2 (Watermelon Mosaic Virus – 2, WMV-2). 10
1.2.4. Virus de la mancha anular de la papaya raza sandía (Papaya Rinspot Virus – w, PRSV-W). 12
1.3. ÁFIDOS TRANSMISORES DE VIRUS EN CUCURBITÁCEAS 13
1.3.1. Taxonomía 15
1.3.2. Biología y comportamiento 16
1.3.3. Daños 17
1.3.4. Transmisión biológica de virus 18
1.4. ENEMIGOS NATURALES DE LOS ÁFIDOS 27
1.4.1. Parasitoides 28
1.4.2. Predadores 29
1.4.3. Entomopatógenos 31
2. MATERIALES Y MÉTODOS 33

2.1. Muestreo en campo 34
2.2. Identificación y conservación del aislamiento viral. 37
2.3. Identificación y mantenimiento de colonias puras de áfidos. 39
2.4. Pruebas de transmisión vectorial. 42
2.5. Identificación de enemigos naturales de los áfidos. 44
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 47
3.1. Detección de especies virales. 47
3.2. Identificación de pulgones o áfidos. 49
3.3. Transmisión vectorial de virus. 53
3.4. Identificación de enemigos naturales. 55
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 67
APÉNDICES 70
BIBLIOGRAFÍA 75

ABREVIATURAS

pH = potencial de Hidrógeno

p/v = peso / volumen

Ag = Aphis gossypii

Mp = Myzus persicae

ARN = Ácido ribonucleico

AND = Ácido desoxiribonucleico

NCBI = National Center for Biotechnology Information

d = Dalton

h = horas

” = segundos

’ = minutos

SIMBOLOGÍA

%= Porcentaje
nm= nanómetro
°C = grados centígrados
mm= milímetros

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.1	Tracto alimenticio de un insecto succionador, y las partes de interacción con los virus de plantas.……	26
Figura 1.2	Interacción de partes de sistema digestivo del insecto y virus circulativos de plantas…….....	27
Figura 2.1	Distribución geográfica de las zonas muestreadas en las provincias de Guayas y Santa Elena y muestreo…….....	35
Figura 2.2	(A) Aplicación de BIOL en la parcela demostrativa de melón. (B) Traslado de especímenes en frascos de vidrio. (C) larva de mosca benéfica colectada……	37
Figura 2.3	Hembras áptera y alada de *Aphis sp*…..……..	40
Figura 2.4	Procedimiento utilizado para la inoculación biológica de plantas de melón con *Squash Mosaic Virus* (SqMV)…..	44
Figura 3.1	Vista dorsal de *A. gossypii*……...	50
Figura 3.2	Vista dorsal de *M. persicae*…….	52
Figura 3.3	Parasitoide de ninfas de pulgones *Lysiphlebus testaceipes*……	56
Figura 3.4	Mosca sírfida, las larvas son depredadores de pulgones…….	58
Figura 3.5	Especies de depredadores de pulgones……..	63
Figura 3.6	Cuerpo fructífero y conidias de N. rileyi……	65
Figura 3.7	A. ochraceus, se observan sus estructuras macro y microscópicas…….	66

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Lista de áfidos transmisores de virus de cucurbitáceas.	15
Tabla 2	Géneros de virus de plantas transmitidos por insectos, sus vectores y modo de transmisión ……..……..	23
Tabla 3	Características de las formas de transmisión de virus por los áfidos……...	24
Tabla 4	Resultados de pruebas serológicas a material vegetal sintomático de las zonas de Taura, Pedro Carbo y Santa Elena…….....	48
Tabla 5	Comparación de la eficiencia de la transmisión de *Squash Mosaic Virus* (SqMV) por *Aphis gossypii* y *Myzus persicae*…..……	53
Tabla 6	Porcentaje de transmisión de *Squash Mosaic Virus*…....	53
Tabla 7	Taxonomía de especies de enemigos naturales de *A. gossypii* y *M. persicae*……..	55

INTRODUCCIÓN

Los áfidos son insectos chupadores que se alimentan de la savia de las plantas mediante un estilete o rostrum, de tal forma que tienen capacidad de transmitir enfermedades virales a las plantas.Un problema relevante en el agro ecuatoriano es el desconocimiento de enfermedades virales que se encuentran presentes en el país, afectando generalmente a cultivos de ciclo corto. Así, en el año 2007, una enfermedad viral desconocida, que fue identificada posteriormente por técnicos de la Compañía Monsanto, afectó cultivos de melón, sandía, tomate, pepino y pimiento en la provincia de Manabí, provocando pérdidas superiores a los 8 millones de dólares [3].

El Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador mediante visitas técnicas realizadas a campo en las provincias de Guayas y Santa Elena ha identificado cultivos de cucurbitáceas de variedades comerciales de melón, sandía y pepino afectadas con sintomatología correspondiente a la manifestación de enfermedades virales como el virus del mosaico de la calabaza (*SqMV*) que se encuentran ocasionando pérdidas significativas en los productores. Así, se planteó el objetivo principal de esta tesis que fue: determinar la capacidad de dos especies de áfidos para transmitir *Squash Mosaic Virus*que se encuentra afectando al cultivo del melón en las provincias de Guayas y Santa Elena.

CAPÍTULO 1

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Virosis en las cucurbitáceas

Entre los diferentes grupos de agentes infecciosos que afectan las cucurbitáceas, los virus se diferencian de los demás organismos por varias características especiales. Entre ellas por su tamaño extremadamente pequeño (30 – 200 nm); por poseer un sólo tipo de ácido nucleico (ARN o ADN) y por ser parásitos obligados que carecen de metabolismo propio. En consecuencia, deben emplear el aparato bioquímico de las células vivas para su replicación [1].

Las enfermedades virales han causado pérdidas económicas significativas. Aproximadamente 35 virus son capaces de

afectar a especies cultivadas de cucurbitáceas en condiciones naturales de campo [2].

Un problema relevante en el agro ecuatoriano es el desconocimiento de enfermedades virales que se encuentran presentes en el país, afectando generalmente a cultivos de ciclo corto. Así, en el año 2007, una enfermedad viral desconocida, -identificada posteriormente por técnicos de la Compañía Monsanto-, afectó cultivos de melón, sandía, tomate, pepino y pimiento en la provincia de Manabí, provocando pérdidas superiores a los 8 millones de dólares [3].

1.2. Especies virales de importancia en cucurbitáceas.

A nivel mundial los virus con mayor incidencia económica sobre el cultivo del melón son los virus del mosaico del pepino (*cucumber mosaic virus*, CMV), de la mancha anular de la papaya – cepa sandía (*papaya ringspot virus*, PRSV-W), del mosaico de la sandía 2 (*watermelon mosaic virus* 2, WMV 2) y del mosaico amarillo del zucchini (*zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV), las mismas cepas virales son consideradas importantes limitaciones para la producción de melón en América Central y específicamente en Costa Rica [4].

Cuando las poblaciones de insectos tienden a incrementarse, se registran en plantaciones de cucurbitáceas, importantes incidencias de enfermedades virales. Alvarado et.al. [5] reporta la presencia de otros virus en el melón como el *Bean Yellow Mosaic Virus* (Virus del mosaico amarillo del fríjol, BYMV), *Clover Yellow Vein Virus* (Virus del amarillamiento de las venas del trébol, CYMV) y *Squash Mosaic Virus* (Virus del mosaico de la calabaza, SqMV).

Trabajos recientes realizados por Ozaslan et. al. [6] reportan la presencia de los virus *Cucurbit Aphid Borne Yellow Mosaic Virus* (CABYV), *Potato Y Virus* (PYV).

1.2.1. Virus Mosaico de la calabaza (Squash Mosaic Virus, SqMV).

La enfermedad del mosaico de la calabaza (SqMV) en cucurbitáceas fue notificada por primera vez en 1916 y su propagación vía semillas en 1934[7].

El virus SqMV pertenece a la familia Comoviridae, donde tenemos a los géneros Comovirus, Nepovirus y Fabavirus, SqMV pertenece al género Comovirus [8]. Zitter, et al. [7] menciona que SqMV no se multiplica dentro delos insectos vectores, pero puede ser

recuperado de fluidos de regurgitación, hemolinfa y heces del insecto, así, el virus se transmite de manera no persistente [9].

En el Ecuador SqMV fue reportado por primera vez en 2009 por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador en plantaciones de melón [10].

Serológicamente se han distinguido dos grupos de SqMV: el grupo I (SqMV-I), la cepa del melón, causa síntomas importantes en melón, pero síntomas ligeros en calabaza y el grupo II (SqMV-II), la cepa de la calabaza, provoca síntomas destacados en calabaza, pero síntomas ligeros en melón. Algunos miembros del grupo I infectan a la sandía [7].

Este grupo tiene dos tipos de partículas isométricas (M y B) de unos 28 nm de diámetro, que contienen respectivamente, dos moléculas de RNA bicatenario de sentido positivo de 1,4 $X10^6$ d (M) y 2,4 X106 d (B); existe un tercer tipo de partícula que es la cápsida vacía [11].

Los síntomas causados por SqMV son variables y dependen de la especie huésped y del cultivar.

Generalmente las plantas infectadas responden con una variedad de síntomas, como son bandeado nerval verde, mosaico, moteado, ampollas, manchas anulares y protuberancias de los nervios en el margen de las hojas. En ciertas condiciones ambientales, las plantas infectadas de algunas calabazas (*Cucurbita pepo* y *Cucurbita moschata*) pueden desarrollar prominentes enaciones foliares. Con frecuencia las plantas son raquíticas, produciendo frutos deformes y moteados [7].

Los síntomas que el melón cantaloupe presenta son: bandeado de las nervaduras tornándose de color verde con subsecuentes moteado en las hojas jóvenes. Los síntomas en sandía constan de un marcado retraso en el crecimiento, distorsión de las hojas con clorosis y necrosis localizadas. Las hojas en calabazas infectadas se deforman, con áreas rugosas, presentando moteados y áreas de color verde oscuro sobresaliendo de la superficie foliar. Las plantas infectadas crecen más lentamente y presentan una menor producción de frutos los cuales presentan coloraciones amarillas o moteados [12].

En calabaza las hojas de mayor edad adquieren un color amarillento y gradualmente mueren, sin embargo, pueden ocasionalmente retener el color normal por algún tiempo. En *C. moschata* los frutos jóvenes presentan un moteado amarillento y verrugas de color verde oscuro; a la madurez se presentan deformes y el carácter verrugoso es aún más pronunciado [9].

En la página del NCBI podemos encontrar los siguientes hospedantes reportados: *Cucumis melo, C. sativus, Cucurbita pepo, C. moschata, C. maxima, Citrullus lanatus, Ecballium elaterium, Chenopodium album* como hospedantes en la naturaleza [11].

En melón la enfermedad afecta notablemente el número de frutos producidos por planta; sin embargo no influye en el peso, tamaño o calidad de frutos[9].

Se ha reportado hasta la actualidad la transmisión por semillas, y por artrópodos del orden coleóptera, algunos investigadores mencionan la probabilidad de la transmisión por pulgones [11]

1.2.2. Virus Mosaico del pepino (Cucumber Mosaic Virus, CMV).

El virus mosaico del pepino (CMV) es uno de los virus de plantas más comunes, e infecta alrededor de 1000 especies [13].

Muchas cepas de *CMV* has sido descritas difiriendo en su rango de hospederos, síntomas, y vectores, en las propiedades serológicas de las proteínas estructurales, y en la secuencia del ácido nucleico [14]. La mayoría de las cepas de CMV están actualmente divididas en dos grandes grupos (subgrupo 1 y 2) basadas en similitudes serológicas y secuenciales [15]. Cepas comunes de CMV infectan típicamente solanáceas y cucurbitáceas, pero no leguminosas.

CMV, pertenece al género Cucumovirus de la familia Bromoviridae [14], este virus está formado por tres partículas isométricas de 29 nm de diámetro. Su ácido nucleico está constituido por 4 piezas de ARN monocordal, dos incluidas en una misma partícula y las otras dos encapsidadas separadamente [16]. CMV es transmitido por áfidos de manera no persistente [17]. La

proteína de la cápside viral interactúa con los componentes del estilete de áfido para influir en la eficiencia de la transmisión [18], y no requiere de componentes proteicos que ayuden a la transmisión viral, tal como ocurre en la transmisión no persistente de potyvirus.

Las plantas infectadas prontamente son atrofiadas con malformación de hojas, los frutos no son comercializables debido a la rugosidad pronunciada que presentan. No todos los frutos infectados pueden mostrar síntomas, algunas variedades de cucurbitáceas pueden mostrar patrones de manchas verdes. Los síntomas más comunes son: epinastia severa, doblamiento de la superficie del pecíolo y lahoja hacia abajo y reducción de las hojas [19].

CMV tiene un amplio rango de hospederos incluyendo más de 1200 especies de plantas en alrededor de 100 familias de dicotiledóneas y angiospermas monocotiledóneas [20]. Las familias hospederas más comunes son: Amaranthaceae, Apocynaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Convolvulaceae,

Cruciferae, Cucurbitaceae, Leguminosae-Papilionoideae, Malvaceae, Phytolaccacea, Polygonaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Tetragoniaceae, Tropaeolaceae, Umbelliferae [21].

CMV es transmitido por unas 80 especies de áfidos en 33 géneros, de forma no persistente no circulativa, aunque se ha reportado la transmisión semipersistente de algunas cepas de *CMV* en Japón [22].

1.2.3. Virus del mosaico de la sandía - 2 (Watermelon Mosaic Virus – 2, WMV-2).

El virus mosaico de la sandía raza II es el segundo virus más importante que afecta las cucurbitáceas comerciales [19].

El Virus del mosaico de la sandía tipo 2 (WMV-2), pertenece a la familia de los potyvirus y está constituido por partículas filamentosas de 730 a750 nm de largo, que en el citoplasma de las células del hospedero inducen la formación de inclusiones cilíndricas conocida como “pinwheels” [23].

Los síntomas predominantes son: mosaico y moteado en el melón, pepino, calabaza y sandía.Además, reduce la producción y la calidad de frutos en calabaza y otras cucurbitáceas [24]. Se reportan además deformaciones de la lámina foliar y, en algunos casos, clorosis intervenal y acortamiento de los entrenudos [25].

Las familias hospederas de WMV-2 son: Amaranthaceae, Apocynaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Convolvulaceae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Leguminosae-Caesalpinioideae, Leguminosae-Papilionoideae, Malvaceae, Pedaliaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Tetragoniaceae, Umbelliferae y Valerianaceae [26].

La forma de transmisión es no persistente según [25], por varias 38 especies de áfidos, pertenecientes a 19 géneros, entre las cuales se incluyen *A. gossypii* Glover y *M. persicae* Sulzer. Su transmisión mecánica es posible de forma artificial y no se ha detectado transmisión por semillas [16].

1.2.4. Virus de la mancha anular de la papaya raza sandía (Papaya Rinspot Virus – w, PRSV-W).

Es un virus de gran importancia económica, esta raza de PRSV solo afecta a cucurbitaceas y no a la papaya, su distribución es mundial [27].

Se trata de una cepa del virus de la mancha anular de la papaya [23]. Sus partículas virales son filamentos flexuosos de 760 nm a 800 nm de longitud y están asociados en el citoplasma de las células a los típicos "pinwheel" de los potyvirus, grupo al cual pertenece, y a otras inclusiones amorfas. Su ácido nucleico es RNA monocordal [28].

El melón puede ser gravemente afectado por este virus, el cual provoca un amarillamiento y deformaciones, que pueden tomar un aspecto filiforme, en las hojas. En los frutos da lugar también a la aparición de mosaicos. Su distribución geográfica es amplia en las zonas tropicales y subtropicales [16].

Este virus es transmitido de forma no persistente por 24 especies pertenecientes a 15 géneros de áfidos. *Myzus persicae* puede ser considerada como la más importante

desde este punto de vista. Es posible su transmisión mecánica y su transmisión por semillas no ha sido detectada. El rango de hospederos está limitado a las cucurbitáceas (38 especies pertenecientes a 11 géneros) [16].

1.3. ÁFIDOS TRANSMISORES DE VIRUS EN CUCURBITÁCEAS

Existen alrededor de 4700 especies de áfidos a nivel mundial [29].De estas, alrededor de 450 han sido reportadas en cultivos [30], pero solo alrededor de 100 son de importancia económica. De 300 especies de áfidos probados como vectores unas 192 resultaron capaces de transmitir por lo menos un virus [31] Estas especies fueron capaces de transmitir unos 164 virus, lo que constituye alrededor del 60% de los virus conocidos de plantas. Sin embargo Lastra R. [1] estima que entre un 80 y 90% de las virosis vegetales son transmitidas por estos insectos.

Los virus patogénicos de plantas se han adaptado eficientemente a las condiciones agrícolas para su transmisión y han explotado los diferentes tipos de comportamiento de los áfidos. Estas relaciones parecen haber evolucionado alrededor de tres clases de comportamiento de los áfidos: 1) la selección

del huésped, la cual la realizan mediante breves y superficiales pruebas de alimentación en una planta después de que ha ocurrido la migración u otros movimientos entre plantas; 2) el establecimiento de las colonias después que los alados depositan una pocas ninfas en cada una de varias plantas en vez de establecer una sola colonia grande en una planta; 3) la dispersión de la población, que ocurre cuando las colonias de ápteros alienícolas se tornan muy densas y desarrollan formas aladas que se dispersan entre los cultivos o hacia otros cultivos estableciendo nuevas colonias. Este comportamiento asegura la raza contra su extinción debido a la sobrepoblación y dispersan los virus de las zonas afectadas a nuevas áreas y huéspedes [32].

En la tabla 1 se presenta un resumen adaptado de Kennedy et al. [31] de las enfermedades virosas transmitidas por especies de áfidos. Como se puede observar las especies *Aphis gossypii* (Glover), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) y *Myzus persicae* (Sulzer) son las de mayor importancia económica por el número de enfermedades que pueden transmitir

Tabla 1 Lista de áfidos transmisores de virus de cucurbitáceas.

ÁFIDO	ENFERMEDAD VIROSA EN CUCURBITACEAS
Aphis craccivora	Mosaico del pepino
Aphis fabae	Mosaico del pepino
Aphis gossypii	Mosaico del pepino, Mosaico de la sandía
Brevicoryne brassicae	Mosaico del pepino
Macrosiphum Euphorbiae	Mosaico del pepino, Mancha anular de la papaya,
Macrosiphum rosae	Mosaico del pepino
Myzus ornatus	Mosaico del pepino
Myzus persicae	Mosaico del pepino, Mosaico de la sandía y Mancha anular de la papaya - W

1.3.1. Taxonomía

Los pulgones o áfidos pertenecen al orden Hemíptera. Los vectores probados en su mayoría corresponden a la familia *Aphidinae*, a excepción de uno de la familia

Adelgidae. A la sub-familia *Aphidinae* pertenecen 173, *Callaphidinae10*, *Chaitophorinae* 6, *Pemphiginae* 2, y *Thelaxinae* 1[33].

1.3.2. Biología y comportamiento

Los áfidos son polimórficos, es decir, poseen más de una forma o morfo en su ciclo de vida, con funciones específicas. Esta diversidad de formas, la habilidad de reproducirse partenogenética o sexualmente según las condiciones ambientales existentes y la alterancia de hospederos les permite desarrollar poblaciones gigantescas en corto tiempo y aprovechar al máximo las condiciones favorables para su desarrollo [34].

En condiciones tropicales como las del Ecuador solo se reproducen por partenogénesis (anholocíclica), estando las colonias formadas solo por hembras virginóparas, ápteras o aladas [34].

Las hembras aladas inician nuevas colonias que al comienzo consisten solo de ápteras, al crecer en número o al cambiar las condiciones de la planta, dan origen a las aladas que se encargaran de migrar y buscar nuevas

plantas hospederas. La distancia recorrida por las aladas varía de acuerdo a las condiciones ambientales imperantes al inicio del vuelo. El movimiento de un número tan grande de aladas, hasta 3500 millones por hectárea de una localidad a otra [35], junto al comportamiento para seleccionar las plantas hospederas, constituyen un factor importante en la transmisión de los virus por este grupo de insectos. Al emprender el vuelo, los migrantes son atraídos inicialmente por la luz ultravioleta del sol. Al cabo de un tiempo de vuelo, esta atracción cambia hacia la radiación proveniente de la superficie terrestre, particularmente los rayos infrarojos, cerca de la superficie se orientan hacia el color verde-amarillento de las plantas y por la disposición de las mismas sobre el suelo [34].

1.3.3. Daños

Los áfidos efectúan el daño en varias formas: 1) al succionar la savia de las plantas ocasionan el enroscamiento de los nuevos brotes o la formación de agallas en los tallos y raíces; 2) algunas especies secretan sustancias que son tóxicas a las plantas; 3) la

mayoría de los áfidos debido a sus secreciones azucaradas están asociadas a hormigas y hongos que como el *Capnodium* producen la “fumagina”, la cual interfiere con el normal desarrollo de la fotosíntesis en las plantas; 4) sin embargo, el hecho más importante de este grupo es su capacidad para transmitir enfermedades virosas de una planta a otra [32].

1.3.4. Transmisión biológica de virus

Uno de los mayores obstáculos para implementar eficientes estrategias para el control de virus es el incompleto conocimiento de cómo se propagan de una planta a otra por organismos vectores. Los insectos forman un gran grupo y son los más importantes vectores [36].

Los virus de plantas deben pasar por dos etapas durante su ciclo de infección. Primero, se deben replicar dentro de las células del hospedero, empleando sistemas celulares complementados con funciones virales; para colonizar la planta a partir de los focos iniciales de infección, tienen que trasladarse a células adyacentes y, a través del sistema vascular, alcanzar otros tejidos y

órganos. En la segunda etapa, los virus deben propagarse a nuevos hospederos, para conseguirlo, tienen que cruzar barreras para ingresar a las células. Para la mayoría de virus de plantas, este proceso se realiza por organismos vectores [25].

La transmisión por insectos usualmente no involucra una simple transmisión pasiva de las partículas virales. En algunos casos, el virus es capaz de replicarse en las células del vector. La especificidad y selectividad del proceso de transmisión (basado en las características específicas que regulan las interacciones entre el virus, vector y hospedero) influye en la propagación de las enfermedades causadas por virus. Por lo tanto, es de gran importancia el estudio de los procesos de transmisión con el propósito de diseñar estrategias efectivas para interferir la propagación de muchas enfermedades de importancia económica.

Las relaciones entre los virus y sus insectos vectores pueden ser diferenciadas de acuerdo a la duración de la retención de los virus dentro del vector. Una clasificación puede ser realizada basándose en el tiempo requerido

para la adquisición, latencia y retención. El periodo de adquisición abarca desde la prueba y alimentación de la planta que realiza el insecto hasta que el vector adquiera el virus; la latencia comprende el tiempo requerido después de la adquisición para que el vector sea capaz de transmitir el virus; y la retención o persistencia es el periodo en el cual el insecto se mantiene virulífero. En base a la persistencia del virus en el vector y la habilidad de este para transmitir la enfermedad, se han caracterizado los siguiente tipos de transmisión viral: no-persistente, semipersistente y persistente (propagativa y no propagativa).

Otras dos importantes categorías de transmisión, no-circulativa y circulativa, pueden también ser reconocidas basadas en los sitios de retención y las rutas de movimiento del virus a través del vector [25].

Los virus no circulativos se asocian temporalmente a las superficies del tracto digestivo del vector (partes de la boca o intestinos). Estos virus no demuestran latencia, y se pierden con la muda. Los virus no circulativos pueden ser no-persistentes o semipersistentes. Los virus no

persistentes son adquiridos en periodos breves de tiempo (segundos a minutos), y se pueden inocular inmediatamente después de la adquisición, y la retención está limitada a periodos cortos. La transmisión es considerada semipersistente cuando su eficiencia se incrementa directamente con la duración de los periodos de adquisición e inoculación y normalmente los vectores se mantienen virulíferos por horas a días.

Los virus circulativos son aquellos que necesitan replicarse dentro del vector para ser transmitido. La mayoría de estos virus se encuentran en el tejido vascular de las plantas, y algunos no pueden ser inoculados mecánicamente. Una característica común es que estos virus necesitan un tiempo de latencia después de la adquisición. La transmisión circulativa se puede clasificar en no-propagativa y propagativa [36]. La transmisión no-propagativa ocurre cuando las partículas virales no se replican sino que únicamente circulan en el cuerpo del insecto en este caso, la habilidad de transmitir la enfermedad se mantiene por varios días hasta que se agoten las partículas virales que haya ingerido el vector. Este tipo de transmisión también se caracteriza por ser

intermitente o sea que el insecto deja de transmitir el virus por un día para recuperar la capacidad de transmisión al día siguiente hasta que se agote su reserva viral [1]. En el caso de la transmisión circulativa propagativa o persistente propagativa, el virus es capaz de replicarse en las células del vector durante su circulación; así, el virus es un parásito de ambos plantas e insectos. En algunos casos, el virus se puede incluso transmitir transovarialmente a la progenie del vector [36].

La tabla 2 muestra un listado de géneros de virus de plantas transmitidos por insectos, sus vectores y modo de transmisión.

Tabla 2 Géneros de virus de plantas transmitidos por insectos, sus vectores y modo de transmisión [36]

Familia[1]	Genero[1]	Vector	Forma de Transmisión
Geminiviridae	Mastrevirus	Saltahojas	Circulativa no-propagativa
	Curtovirus	Saltahojas	Circulativa no-propagativa
	Begomovirus	Moscas blancas	Circulativa no-propagativa
Caulimoviridae	Badnavirus	Cochinillas	Semipersistente
	Rice tungro baciliform	Saltahojas	Semipersistente
	Caulimovirus	Áfidos	No-persistente/semipersistente
Reoviridae	Fijivirus	Saltahojas	Circulativa propagativa
	Phytoreovirus	Saltahojas	Circulativa propagativa
	Oryzavirus	Saltahojas	Circulativa propagativa
Rhabdoviridae	Cytorhabdovirus	Saltahojas/Áfidos	Circulativa propagativa
	Nucleorhabdovirus	Saltahojas/Áfidos	Circulativa propagativa
Bunyaviridae	Tospovirus	Trips	Circulativa propagativa
Sequiviridae	Sequivirus	Áfidos	Semipersistente
Comoviridae	Waikavirus Comovirus	Saltahojas Coleópteros	Semipersistente Circulativa
	Fabavirus	Áfidos	No-persistente
Potyviridae	Potyvirus	Áfidos	No-persistente
	Macluravirus	Áfidos	No-persistente
	Ipomovirus	Moscas blancas	No-persistente
Bromoviridae	Alfamovirus Bromovirus	Áfidos, Coleópteros	No-persistente Circulativa
	Cucumovirus	Áfidos	No-persistente
Closteroviridae	Closterovirus	Áfidos	Semipersistente
	Crinivirus	Moscas blancas	Semipersistente
Luteoviridae	Luteovirus	Áfidos	Circulativa no-propagativa
	Polerovirus	Áfidos	Circulativa no-propagativa
	Enamovirus	Áfidos	Circulativa no-propagativa
	Nanovirus	Áfidos	Circulativa no-propagativa
	Marafivirus	Saltahojas	Circulativa propagativa
	Tenuivirus	Saltahojas	Circulativa propagativa
	Umbravirus Sobemovirus	Áfidos/Coleópteros	Circulativa no-propagativa Circulativa
	Tymovirus	Coleópteros	Circulativa
	Carlavirus	Áfidos	No-persistente

[1] Basada en la actual ICTV Sistema universal de taxonomía de virus (Pringle, 1999)

En la tabla 3 se resumen las principales características de la transmisión de virus por áfidos.

Tabla 3 Características de las formas de transmisión de virus por los áfidos

	NO CIRCULATIVOS		CIRCULATIVOS
Características	**No-persistente**	**Semipersistente**	**Persistentes**
Periodo de Adquisición	10" – 30"	Minutos a horas (5' – 12h)	Horas
Periodo de Inoculación	10" – 30"	Minutos a horas (5' – 12h)	Horas
Periodo de retención	Minutos a horas	1 – 3 días	3 días
Periodo de incubación	-	-	+ (12 h)
Ayuno	+	-	-
Transmisión mecánica	Fácil	Difícil	Muy difícil
Especificidad del vector	Baja	Mediana	Alta
Retención en la muda	-	-	+
Transmisión transovarial	-	-	+
Presencia en la hemolinfa	-	-	+
Transmisión por semilla	+	+	(-)
Reproducción en el vector	-	-	+
Mecanismo de transmisión	Ingestión – Egestión	Ingestión – Egestión	Ingestión – salivación

La mayoría de los virus de plantas tienen una relación no circulativa con sus vectores. Si bien la transmisión se puede realizar en periodos cortos, esta puede ser muy compleja. En la mayoría de los casos, el número real de

partículas requeridas para la transmisión puede ser bastante bajo [37], y se requieren medios de detección sumamente sensibles para identificar la presencia del virus en el vector [38]. Por lo tanto, para la mayoría de los virus, no se conoce la identidad de los sitios reales de retención. Si bien el tiempo de retención es generalmente considerado corto, su duración puede depender de condiciones específicas, y, en la práctica, virus no-persistentes han mostrado ser retenidos el tiempo suficiente para viajar distancias bastante largas en sus vectores [39].

Como es típico de insectos chupadores-succionadores, los áfidos realizan breves inserciones de su estilete para probar si una planta es o no su hospedero, succionan savia e inyectan saliva en el proceso. Como resultado, la adquisición e inoculación de virus no-persistentes ocurre durante esas pruebas [40]. La figura 1 muestra un esquema de la interacción entre virus no persistentes y las partes bucales del vector.

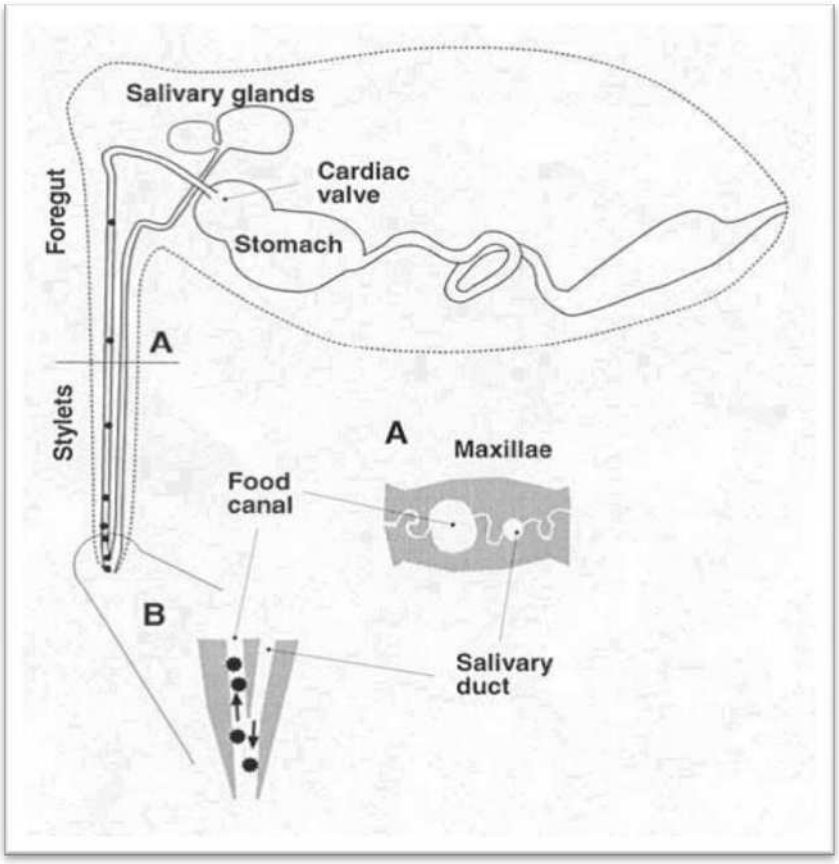

Fig. 1.1 Tracto alimenticio de un insecto succionador, y las partes de interacción con los virus de plantas. (A) Detalles de la sección transversal de la maxila mostrando los conductos: alimenticio y salivar. (B) Detalles de la sección longitudinal del estilete

En la transmisión circulativa no propagativa, el virus debe atravesar el tracto digestivo para llegar a la hemolinfa, una vez allí, el virus se mueve a las glándulas salivares y luego es excretado mediante el conducto salivar. La Figura 2 muestra el esquema de la transmisión de virus circulativos.

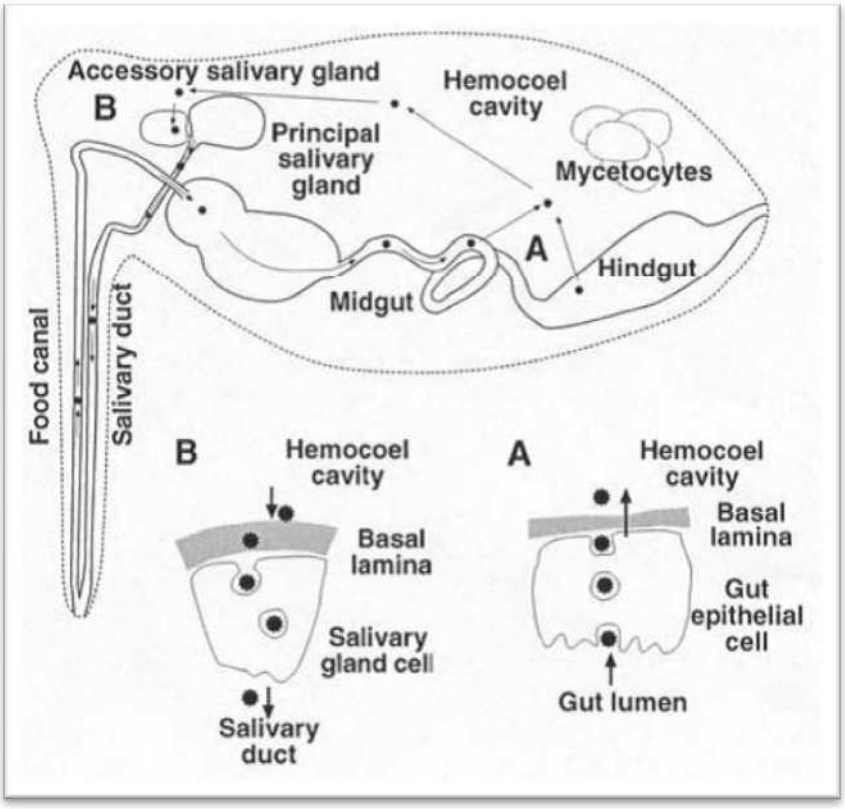

Fig. 1.2 Interacción de partes de sistema digestivo del insecto y virus circulativos de plantas. La ruta del virus está indicado por las flechas, empieza en el canal alimenticio, de donde el virus alcanza el estómago, y el tracto digestivo medio o el trasero en donde se interna (A). Una vez en la cavidad sanguínea "Hemocole", el virus se mueve a través de la sangre, hasta que alcance las glándulas salivares; la inoculación ocurre cuando el virus contenido en la saliva es secretado (B).

1.4. ENEMIGOS NATURALES DE LOS ÁFIDOS

En la naturaleza, los pulgones son neutralizados por numerosos agentes biológicos de origen vegetal y animal. Los primeros son muy interesantes, desde el punto de vista práctico.

Mucho más numerosos y variados son los animales limitantes de los pulgones, entre los cuales se encuentran depredadores y

parasitoides. Entre los antagonistas más importantes de los pulgones se encuentra el grupo de los coleópteros, los coccinélidos; entre los neurópteros, los crisópidos; y en los dípteros, los sírfidos y cecidómidos.

Todos los antagonistas de los grupos citados (hongos, depredadores y parasitoides) ejercen una actividad espontánea contra los pulgones, que en no pocos casos produce beneficios evidentes. Algunos de estos agentes auxiliares están siendo utilizados hoy para realizar un control biológico programado sobre los cultivos [41].

1.4.1. Parasitoides

Dentro del complejo de los enemigos naturales de los áfidos, los parásitoides himenópteros juegan un papel muy importante. Entre ellos podemos mencionar a organismos pertenecientes a las familias Aphidiidae, Aphelinidae, Braconidae y otras menos importantes [42].

Las hembras del micro himenóptero parasitoide, parasita las ninfas de los áfidos. Solo una larva parasitoide se desarrolla por hospedero. Cuando el hospedero muere, su exoesqueleto forma una momia redonda de color

marrón. La larva parasitoide empupa dentro de esta momia. Luego, el adulto parasitoide corta un hueco circular en el dorso de la momia; de este hueco sale el adulto. Los adultos se alimentan de la mielecilla de los áfidos [43].

1.4.2. Predadores

Los artrópodos depredadores pueden separarse en dos distintas categorías: generalistas y especialista. Depredadores generalistas son aquellos que se alimentan de cualquier presa disponible y aceptable, mientras que los especialistas tienden a atacar selectivamente a los individuos pertenecientes a una determinada especie, género o familia [44].

Los predadores generalistas tienden a concentrar sus esfuerzos en la especie-presa que sea más abundantes en un momento dado, mientras que ciertos depredadores especialistas tienen una relación tan específica con su presa que no le es posible sobrevivir sin ella. Como grupo los predadores tienden a ser más generalistas que los parasitoides en sus hábitos alimenticios [44].

Son relativamente pocos los grupos de artrópodos que habitual u ocasionalmente se alimentan de áfidos. Los más importantes pertenecen a las familias Anthocoridae (Hemíptera), Coccinélidae (Coleóptera), Chrysopidae (Neuróptera), Syrphidae y Cecidomyiidae (Díptera). En la literatura frecuentemente se les denomina insectos afidófagos [44].

Los anthocóridos más representativos se agrupan en los géneros Orius y Anthocoris. A pesar de su pequeño tamaño Orius sp. puede cunsumir entre 45 y 75 áfidos durante su desarrollo y ha sido capaz de controlar poblaciones confinadas en jaulas del áfido *Myzus persicae* [44].

Entre los coccinélidos depredadores hay muchos que se alimentan casi exclusivamente de áfidos y otros que los incluyen en su dieta.

En conjunto, constituyen uno de los grupos de insectos afidófagos de mayor importancia. El adulto es una mariquita, muchas veces de vivos colores y a menudo con manchas oscuras en los élitros y de forma círculo

ovalada. Puede vivir más de dos meses y tener un periodo de ovoposición de 1 a 2 meses [44].

De los más importantes predadores se conoce que, el cuarto estadio larval y el adulto de *Hippodamia convergens* consumen alrededor de 50 áfidos diariamente, en China, la larva madura del coccinélido gigante *Caria dilatata* devora de 400 a 500 áfidos por día [44]; las larvas de *Chrysopa sp* pueden consumir de 200 a 500 áfidos durante su desarrollo, a razón de 15 a 35 por día, los adultos ingieren mielecilla de homóptera, que es altamente nutritiva, y que puede ser un requisito para la producción de huevos; las larvas voraces de los sirphidos, consumen hasta 800 áfidos para completar su desarrollo [44].

1.4.3. Entomopatógenos

Los hongos Entomopatógenos pertenecientes a los entomophtorales (géneros *Erynia, Conidiobolus, Zoophthora*) y a los Deuteromycetos (*Verticillium*), se intentan utilizar para llevar a cabo una lucha microbiológica de los pulgones (43).

Estos agentes suelen no ser muy efectivos en el control de infestaciones de áfidos en cultivos anuales, bien sea por ser dependientes de la densidad del huésped, o bien, por depender de las condiciones ambientales; los hongos efectúan un mayor control en la época de mayor humedad ambiental [34].

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo estuvo orientado a la validación de la siguiente hipótesis:

"La presencia de diferentes especies de áfidos colonizando muestras foliares de melón colectadas en campo con síntomas del virus del mosaico de la calabaza (Squash Mosaic Virus – SqMV), evidencia la relación de los pulgones presentes con la transmisión y diseminación de la enfermedad viral observada".

Para la comprobación de la hipótesis se planteó el siguiente objetivo general:

Determinar la capacidad de dos especies de áfidos para transmitir *Squash Mosaic Virus* que se encuentra afectando al cultivo de melón

en las provincias de Guayas y Santa Elena, además de identificar los principales enemigos naturales de estos insectos.

Los objetivos específicos que permitieron cumplir el objetivo general son:

1) Realizar muestreo en campo de: hojas y partes de plantas de cucurbitáceas con sintomatología de enfermedades virales, especies de áfidos que afectan los cultivos de cucurbitáceas en las provincias en estudio y de enemigos naturales presentes en dichas zonas de producción.

2) Determinar mediante pruebas inmunoquímicas la identidad de las especies virales presentes en las cucurbitáceas muestreadas.

3) Identificar especies de áfidos relacionados a las cucurbitáceas con síntomas virales.

4) Determinar la eficiencia de los áfidos en la transmisión vectorial de *Squash Mosaic Virus*.

5) Identificar los principales enemigos naturales de los áfidos.

2.1. Muestreo en campo

Los muestreos de partes de plantas con síntomas virales, áfidos y enemigos naturales en campo se realizaron durante los meses

de marzo hasta junio en el año 2010, efectuando un total de ocho muestreos en localidades ubicadas en las provincias de Guayas y Santa Elena. Las muestras se colectaron concretamente en el cantón Pedro Carbo (Guayas), en la parroquia Taura (Guayas); en la península de Santa Elena el muestreo se realizó en las localidades de: El azúcar, Chanduy y Pechiche.

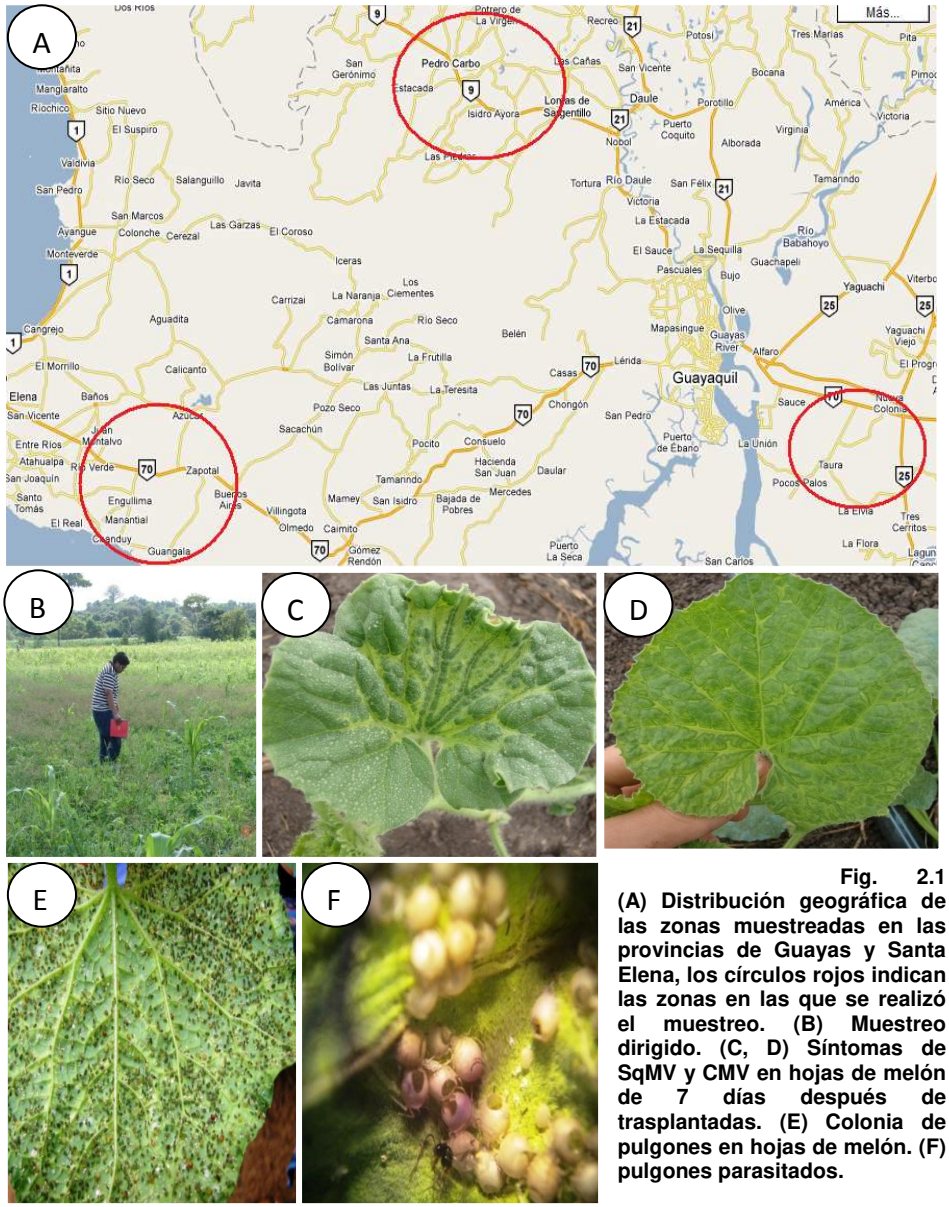

Fig. 2.1 (A) Distribución geográfica de las zonas muestreadas en las provincias de Guayas y Santa Elena, los círculos rojos indican las zonas en las que se realizó el muestreo. (B) Muestreo dirigido. (C, D) Síntomas de SqMV y CMV en hojas de melón de 7 días después de trasplantadas. (E) Colonia de pulgones en hojas de melón. (F) pulgones parasitados.

En todas las zonas evaluadas se realizó un muestreo dirigido con el fin de encontrar plantas que presenten sintomatologías producidas por virus. Muestras de partes de plantas de cucurbitáceas fueron colectadas en bolsas de papel para su procesamiento en laboratorio.

Se determinó la presencia de áfidos mediante evaluación visual y se realizó un muestreo terrestre mediante colecta directa de vectores, método empleado universalmente para organismos poco móviles de acuerdo a metodología sugerida [45]. Se utilizaron frascos de vidrio cubiertos de malla entomológica (Nylon Jordán®) para el traslado de los especímenes colectados en campo, se trasladaron sobre material vegetal para mantener la humedad y garantizar la supervivencia de los insectos.

La colección de los principales enemigos naturales de los pulgones en campo se efectúo en parcelas demostrativas de melón bajo el sistema de producción orgánico, ubicado en el sector de Villao del cantón Pedro Carbo, en estas parcelas se realizaron aplicaciones quincenales de biofertilizante líquido (BIOL) producido por técnicos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL). Se colectaron

posturas, larvas, pupas y adultos de controladores biológicos para su identificación en laboratorio (Fig 4).

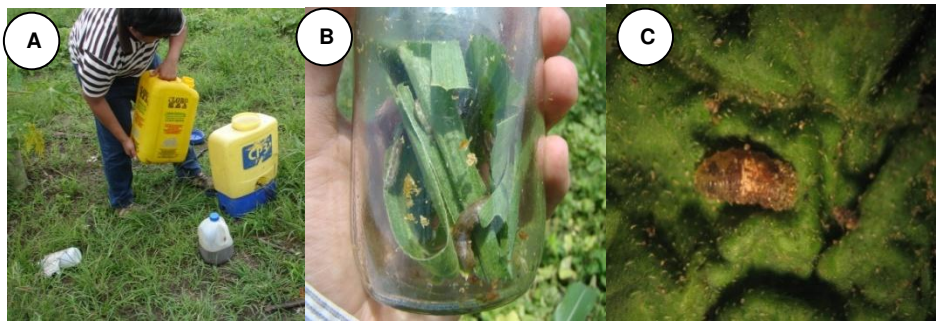

Fig. 2.2 (A) Aplicación de BIOL en la parcela demostrativa de melón. (B) Traslado de especímenes en frascos de vidrio. (C) larva de mosca benéfica colectada.

Se dejó constancia fotográfica de la situación sanitaria de los cultivos visitados y de los síntomas encontrados, por otra parte varias secciones de hojas con síntomas fueron conservados en congelación a -80°C para mantener la fuente de inóculo; y colonias limpias de pulgones por especie se establecieron para el desarrollo de investigaciones posteriores.

2.2. Identificación y conservación del aislamiento viral.

Todas las muestras fueron valoradas en el laboratorio de Virología vegetal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) ubicado en Guayaquil – Ecuador. Para la detección serológica de los virus se utilizó la técnica de inmunoabsorción enzimática de fase sólida en doble sándwich (DAS - ELISA) [46]. Se emplearon diagnosticadores específicos

para la detección del virus mosaico de la calabaza (*SqMV*) (ACD Inc. V054-C3/D3), producidos por Agdia Inc. (Indiana, EU). Las evaluaciones serológicas se realizaron con material vegetal fresco

La lectura de absorbancia para determinar la concentración de virus se realizó en un espectrofotómetro microplater TECAN, Sunrise 2460033, utilizando una longitud de onda de 405 para la detección de virus donde se empleó fosfatasa alcalina.

Para la determinación de la positividad de las muestras en los ensayos de diagnóstico se realizaron duplicados de las muestras analizadas, obteniendo el valor medio. El testigo sano se determinó evaluando los controles negativos (incluido en los kits de diagnóstico) promediando los resultados obtenidos de las lecturas de absorbancia. Como criterio para la determinación del límite de detección se empleó dos veces el valor del testigo sano.

El aislamiento viral se conservó mediante inoculaciones periódicas en plantas indicadoras de melón (*Cucumis melo*) y zapallo (*Cucurbita sp.*). Los tejidos de las muestras cuyos resultados fueron positivos para las especies virales antes mencionadas se homogeneizaron en una solución amortiguadora de fosfato con pH 7.0 a una relación 1:10 (p/v), se filtró el

homogeneizado en una gasa estéril y se agregó carborundum de 600 mesh para inducir heridas microscópicas en el tejido de las plantas indicadoras. Inmediatamente, con un hisopo de algodón humedecido con el filtrado se frotaron las hojas de las plantas indicadoras para su inoculación mecánica.

Las plantas indicadoras utilizadas fueron sembradas semanalmente con la finalidad de realizar inoculaciones constantes y evitar la pérdida del inoculo viral, para las inoculaciones se utilizaron plantas de siete días después de trasplantadas y se inocularon las primeras hojas verdaderas. Las plantas inoculadas se colocaron dentro de cajas cubiertas de malla entomológica para evitar el ingreso de insectos u otros artrópodos.

2.3. Identificación y mantenimiento de colonias puras de áfidos.

Los áfidos colectados en campo se observaron en microscopio estéreo con la finalidad de evitar incorporar a la colonia pulgones parasitados o infectados por agentes entomopatógenos. De las colonias de áfidos colectadas en campo, un grupo de diez por colonia colectada se preservaron en alcohol al 90% para realizar

el aclaramiento y montaje de los especímenes que permitió su identificación.

Para la identificación de las especies de áfidos, se realizó el aclaramiento y montaje de los especímenes siguiendo el método de Hill Ris Lamber [47] con ciertas modificaciones, este método es relativamente fácil y utiliza reactivos sencillamente disponibles [48] el protocolo se adjunta en el apéndice1.

Las características morfológicas usadas en la identificación de los áfidos fueron: Tubérculos frontales y antenales de la cabeza (Fig. 5 A, B), sifúnculos o cornículos, cauda del insecto (Fig. 5 D y C) y otras características específicaspara el diagnóstico.

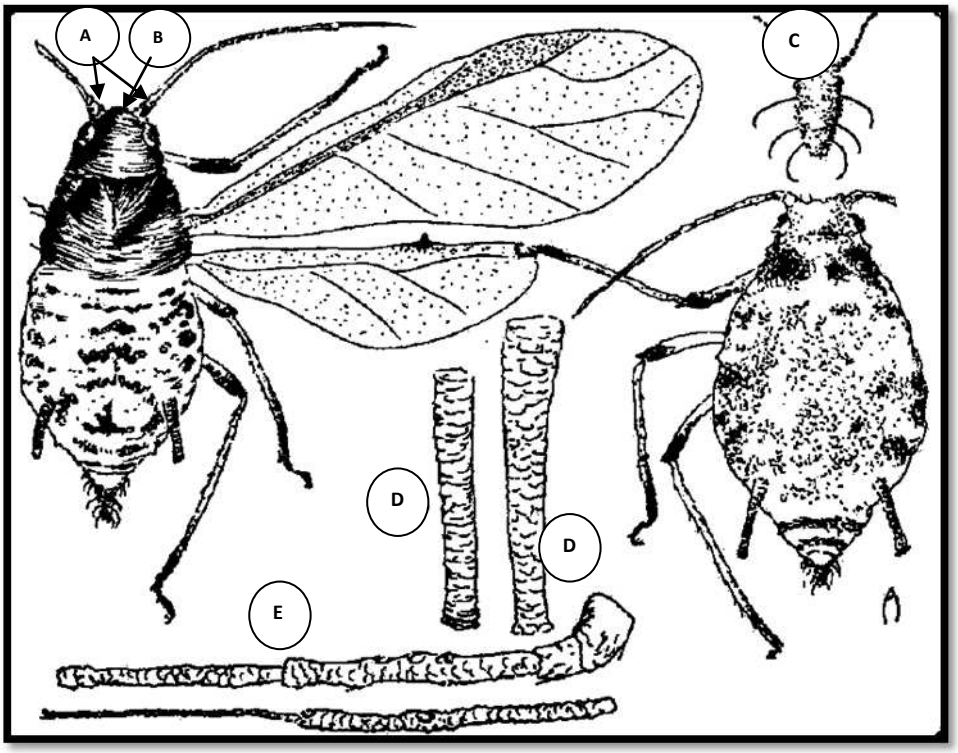

Fig. 2.3 Hembras áptera y alada de *Aphis sp.* (A) Tubérculos antenales. (B) Tubérculo frontal. (C) Cauda. (D) Cornículos o sifúnculos. (E) Antenas

Con las características observadas se procedió a determinar la especie mediante el uso de la Clave general para especie de áfidos ápteros de Colombia[32].

Se establecieron colonias libres de virus con la descendencia áptera de las dos especies de áfidos identificadas, para lo cual, se colocaron pulgones adultos en cajas de polietileno provista de papel filtro humedecido en la base durante un periodo de 12 a 24 horas o hasta que se produzcan ninfas, se transfieren las ninfas a las plantas hospederas con un pincel humedecido con agua destilada para iniciar la colonia. Las plantas infestadas con ninfas de pulgones se mantuvieron en cajas entomológicas bajo condiciones controladas a temperatura de 27ºC.

El riego de las plantas hospederas se efectuó cada tres días y el cambio de las mismas cada semana; en este proceso se cuidó que no se produzca la sobrepoblación de pulgones, falta de agua en las plantas, pobre nutrición o problemas radiculares por exceso de agua; todos estos parámetros contribuyen a que los pulgones de la colonia sean más pequeños, vivan periodos más cortos de tiempo y produzcan hembras aladas por varias generaciones hasta que la condiciones mejoren.

2.4. Pruebas de transmisión vectorial.

Las pruebas de transmisión viral mediante insectos se realizaron con la descendencia áptera de las dos especies de áfidos obtenidas de las colonias puras previamente establecidas; los áfidos que se utilizaron para las pruebas de transmisión fueron sometidos a una (1) hora de ayuno, para lo cual se colocaron los insectos en cajas de polietileno selladas y provistas de un agujero cubierto con malla entomológica; cumplido ese período, grupos de tres áfidos fueron retirados y colocados en plantas de melón (*Cucumis melo*) infectadas con el virus *SqMV,* para el período de adquisición en el que el áfido se alimenta de la planta enferma. Se comprobó la inserción del estilete o rostrum mediante la observación del insecto con una lupa de mano (10x) cuando el insecto coloca sus antenas hacia atrás sobre el dorso [49]; el tiempo de adquisición empleado fue de cinco minutos de acuerdo a lo propuesto por Kalleshwaraswamy [49] para este tipo de virus de transmisión no persistente y no se evalúo tiempo de incubación.

Los áfidos fueron retirados de las plantas viróticas con un pincel -000 corona- delineador humedecido, procurando perturbarlos para evitar romper el estilete o rostrum. Se colocó un grupo de

áfidos (tres) infectivos en plantas sanas de melón para el período de inoculación de cinco minutos acorde a lo sugerido por Kalleshwaraswamy [49], se utilizaron grupos de tres pulgones infectivos por cada una de las plantas. En este ensayo, un total de 20 plantas fueron inoculadas con los pulgones y el experimento se repitió 5 veces con cada especie de áfido evaluada, los controles de este experimento consistieron en la alimentación de los áfidos en plantas sanas para el periodo de adquisición y la inoculación con estos se realizó en otras 100 plantas sanas.

Transcurrido el periodo de inoculación biológica se procedió a eliminar a los pulgones de las plantas inoculadas y estas se trasladaron a cajas cubiertas con malla entomológica para prevenir la entrada de insectos y otros artrópodos. Treinta días después de la inoculación biológica, se registró la presencia de síntomas virales en las plantas y se comprobó la infección de estas mediante la técnica de inmunoabsorción enzimática de fase sólida en doble sándwich (DAS - ELISA).

El proceso de transmisión viral se resume en la Figura 6:

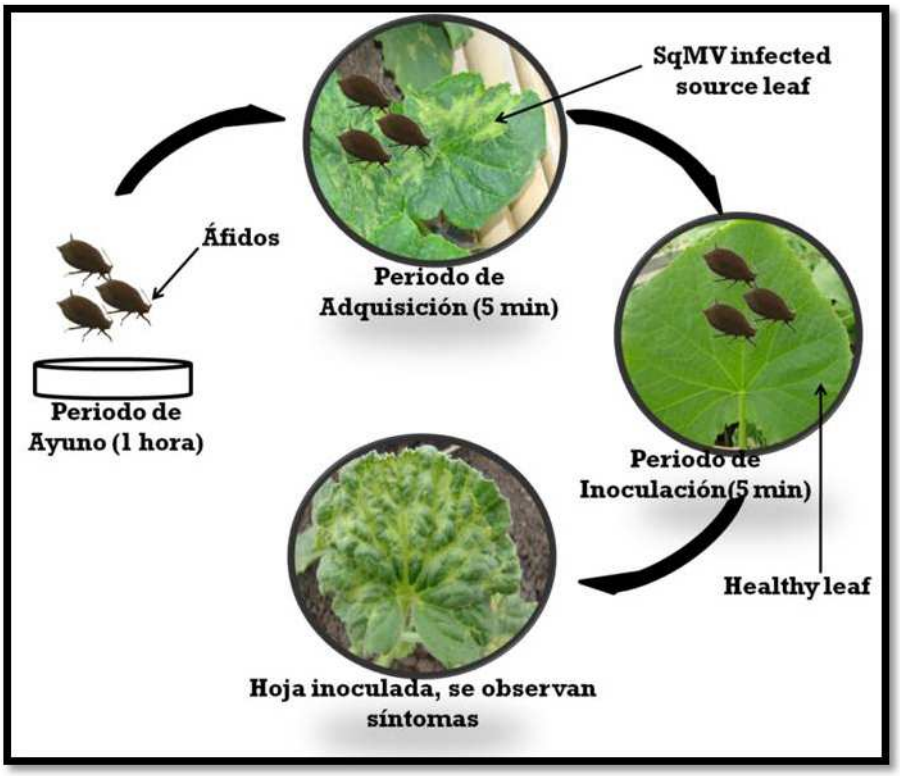

Fig. 2.4 Procedimiento utilizado para la inoculación biológica de plantas de melón con Squash Mosaic Virus (SqMV).

2.5. Identificación de enemigos naturales de los áfidos.

La identificación de las principales especies de enemigos naturales (insectos) colectadas en campo se realizó utilizando la clave taxonómica para la identificación de parasitoides[43]. Las características principales que fueron consideradas al momento de la identificación fueron: celdas de las alas, segmentos abdominales, número de segmentos antenales, número de tarsos, forma del ovipositor, coloración y manchas en las alas en el caso de adultos; y formas de las larvas y posturas.

Para la identificación de los parasitoides, se realizó el montaje de los mismos utilizando el protocolo para el aclaramiento y montaje de pulgones (Apéndice1).

La identificación de los predadores de pulgones se realizó mediante la comparación de características morfológicas utilizando colecciones sinópticas disponibles en la web, las utilizadas en la presente investigación fueron: Coccinellidae del Perú [50], Colección sinóptica del Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica (INBIO) [51], Díptera Collection, e Identificación [52], imágenes e información de insectos y arañas de Estados Unidos y Canadá (BUGGUIDE) [53]. Se consideraron características morfológicas con valor diagnóstico tales como: coloración y manchas de los élitros y del pronoto.

Para el aislamiento de los hongos ya esporulados sobre los individuos colectados, se realizaron siembras en cajas petri de 10 cm de diámetro, por el método de siembra directa en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar), en presencia de antibióticos, según el método descrito por Rhodes & Smith (27). Para los individuos sospechosos de micosis se realizaron lavados con agua estéril y desinfecciones con NaHClO a 0,5% durante 1 min. Seguidamente se realizaron dos lavados por agua estéril y se

colocaron en cámaras húmedas incubadas a 28ºC por 7 días. En los individuos donde se detectó emersión de micelio se realizaron transferencias bajo condiciones asépticas, con siembras directas de acuerdo con el método ya mencionado.

Se purificaron las cepas fúngicas siete días después de aisladas, las colonias puras se observaron al estéreo microscopio y se realizaron preparaciones al microscopio óptico que se compararon con las descripciones de géneros hifomicetos [55, 56]. Los hongos pertenecientes a un género entomopatogénico de interés, se multiplicaron en medio agarizado para conservar las cepas y realizar estudios posteriores; las muestras que no correspondieron a hongos de importancia entomopatogénica: fueron eliminadas.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Detección de especies virales.

En la tabla 4 se muestran los resultados de las pruebas serológicas realizadas a 371 muestrasde material vegetal colectado en campo, aquí se presentan las especies evaluadas y se detalla el total de muestras por cada especie, la mayor cantidad de muestras evaluadas fueron tomate (135), melón (127), seguidas de pimiento (54), sandía (52) y malezas (8).

Las especies virales con mayor incidencia fueron *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) y*Squash Mosaic Virus* (SqMV) en con 29 y 25 muestras positivas respectivamente, ambos virus afectando principalmente el cultivo de melón.

Además, en la tabla se muestran las especies de áfidos identificadas en cada localidad, en la que se demuestra que *Aphis gossypii* y *Myzus persicae* son las especie que colonizan los cultivos evaluados.

Localidad	Especie vegetal	Número de plantas evaluadas	REACCIONES POSITIVAS A VIRUS POR ELISA*										Especies de pulgones identificados
			POTYVIRUS				TOSPOVIRUS		CUCUMOVIRUS	COMOVIRUS	TOBAMOVIRUS		
			TEV[1]	PVY[1]	WMV-2[1]	PRSV[1]	WSMoV	TSWV[1]	CMV[2]	Sq MV[1]	ToMV[1]	TMV[1]	
Taura	Solanum lycopersicum	55	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	0	N/E	N/E	N/E	N/E	-
	Capsicum annum	12	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	1	N/E	N/E	N/E	N/E	MP
Santa Elena	Solanum lycopersicum	80	6	0	N/E	N/E	1	0	0	N/E	11	0	-
	Capsicum annum	39	1	0	0	0	1	0	3	0	4	0	MP
	Citrullus lanatus	34	N/E	N/E	0	8	0	0	3	0	N/E	0	AP
	Cucumis melo	13	N/E	N/E	N/E	1	N/E	N/E	0	1	N/E	N/E	AP
	Luffa sp.	5	N/E	N/E	0	1	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	AP, MP
Pedro Carbo	Capsicum annum	3	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	2	3	N/E	N/E	MP, AP
	Citrullus lanatus	13	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	6	4	N/E	N/E	AP
	Cucumis melo	114	N/E	N/E	4	0	N/E	N/E	14	16	N/E	N/E	AP
	Centrosema sp.	3	N/E	N/E	1	0	N/E	N/E	1	1	N/E	N/E	MP, AP
	TOTAL	371	7	0	5	10	2	1	29	25	15	0	

* Numero de muestras positivas
N/E = No evaluado
CMV= Cucumber Mocaic Virus
Sq MV= Squash Mosaic Virus
ToMV= Tomato Mosaic Virus
TEV= Tobacco Etch Virus
TMV= Tobacco Mosaic Virus
PVY= Potato Virus Y
WSMoV= Watermelon Silver Mottle Virus
WMV-2= Watermelon Mosaic Virus-2
TSWV= Tomato Spotted Wilt Virus
PRSV= Papaya Ringspot Virus
1 DAS - ELISA
2 ELISA COMPETITIVO
UDO plantas positivas 0,205 - 2,43
UDO control positivo 1,47 - 3,45
UDO control negativo 0,063 - 0,105
\- No se encontraron pulgones
MP= Myzus persicae
AP= Aphis gossypii

Tabla 4 Resultados de pruebas serológicas a material vegetal sintomático de las zonas de Taura, Pedro Carbo y Santa Elena.

3.2. Identificación de pulgones o áfidos.

El aclaramiento y montaje de los especímenes permitió determinar la identidad de las dos especies de áfidos colectados en campo las cuales corresponden a: ***Aphis gossypii*** Glover (Insecta: Hemiptera: Aphididae) -especie reconocida por su eficacia en la transmisión no persistente del virus del mosaico del pepino y de varios potyvirus- y ***Myzus persicae*** Sulzer (Insecta: Hemiptera: Aphididae) -considerado el vector más importante de virus en plantas-.

Las características morfológicas que permitieron la identificación de especímenes ápteros de ***A. gossypii*** fueron las siguientes: color amarillo pálido a verde amarillento y verde oscuro, abdomen sin manchas, antenas amarillentas más cortas que el cuerpo alcanzando 2/3 de su longitud; patas amarillentas, con los extremos de la tibia y tarsos negros, cornículos negros o verde oscuros; cauda con 3 pares de pelos laterales. Tubérculos laterales presentes en los segmentos abdominales, I y VII. Cornículos casi 2.8 veces la longitud de la cauda. Rostrum sobrepasando ligeramente el segundo par de coxas. Unguis 2 a 3 veces la longitud de la base del VI segmento antenal. Longitud del cuerpo de 1.1 – 1.8 (Figura 7).

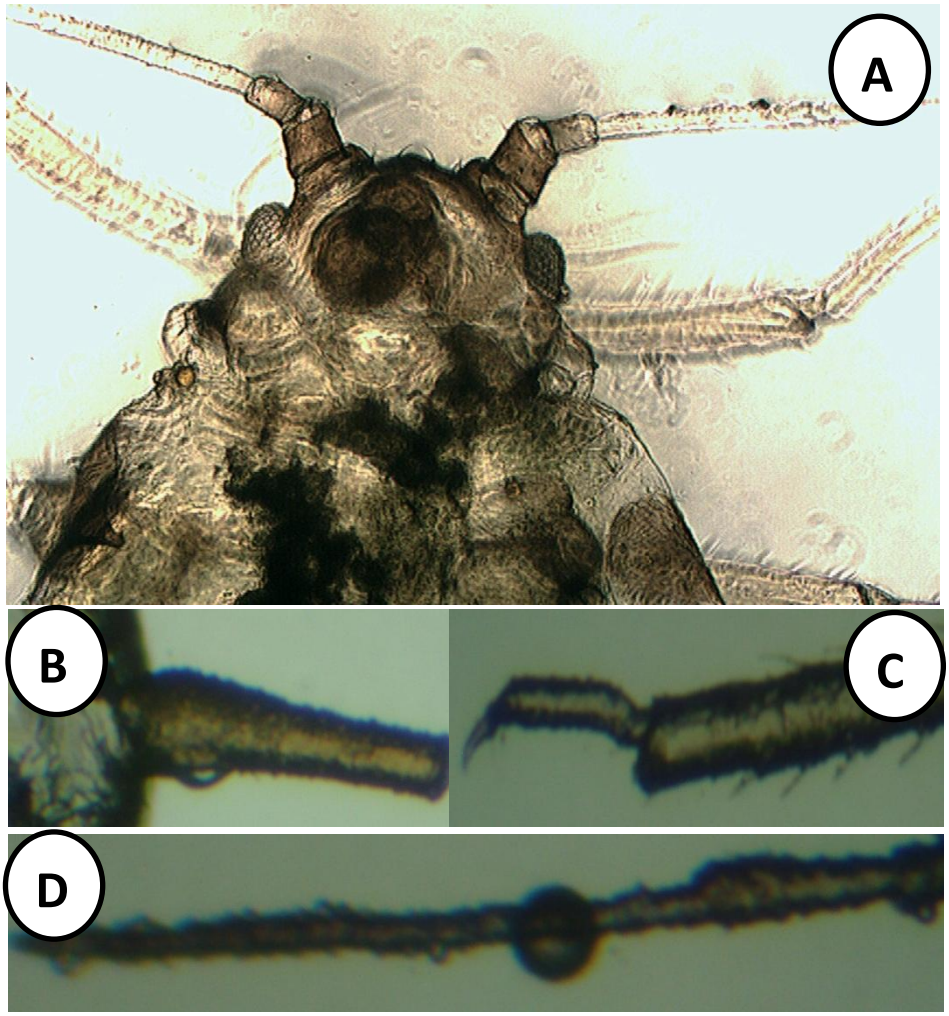

Fig.3.1 A) Vista dorsal de *A. gossypii*, se observa el margen frontal ligeramente sinuoso. B) Coniculos ligeramente más anchos en la base. C) tarso y extremo de la tibia oscuros. D) Último segmento antenal

Las características de los especímenesalados de ***A. gossypii*** difirieron de los ápteros en lo siguiente: Cabeza y tórax negro; abdomen verde amarillento sin áreas oscuras excepto en áreas laterales; manchas detrás de los cornículos en la base, visibles en especímenes aclarados; patas amarillentas con tarsos y

extremos de la tibia negra; antena un poco oscura más corta que el cuerpo sobrepasando la mitad de su longitud; cornículos negros cilíndricos ligeramente más anchos en la base; cauda y placas anal y genital oscuras a negras; sensorias secundarias largas en una hilera simple. Rostrum terminando entre el II y III par de coxas. Setas puntiagudas pequeñas o esparcidas en las antenas y tibias posteriores. Cauda ligeramente en forma de cuchara, llevando 2-3 pares de pelos. Tubérculos laterales notorios en el protórax y en los segmentos abdominales I y VII. Longitud del cuerpo 1.4 a 2 mm.

En el caso de especímenes ápteros de ***M. persicae*** Sulzer, las características con valor diagnóstico que permitieron su identificación fueron: coloración amarilla o verde claro, sin manchas en el cuerpo; todas las patas con los tarsos pálidos; extremos de las tibias, de las antenas, del rostrum y de los cornículos oscuro. El rostrum se extiende hasta el segundo o tercer par de coxas. Los cornículos se presentaron de forma cilíndrica ligeramente hinchados en su extremo distal y con un reborde bien diferenciado, dos veces más largos que la cauda, entre 1/4 a 1/5 de la longitud del cuerpo. Cauda cónica, llevando tres pares de pelos laterales. Margen frontal cóncavo con tubérculos antenales bien desarrollados y convergentes. Antena

tan larga como el cuerpo. Unguis 3 a 5 veces más largo que la base del VI segmento antenal. El tamaño del cuerpo del insecto es de 2 a 3 mm.

Los especímenes alados de ***M. persicae***, presentaron diferencias morfológicas en: la cabeza y tórax de color negro; cauda pálida a oscura; tibia pálida, y tarsos negros; cornículos oscuros; Antena oscura o negra excepto la base del III segmento antenal. Antenas casi iguales a la longitud del cuerpo. Rostrum más pequeño que el los especímenes ápteros, llegando al II par de coxas, tamaño de 1.5 a 2 mm (Figura 8).

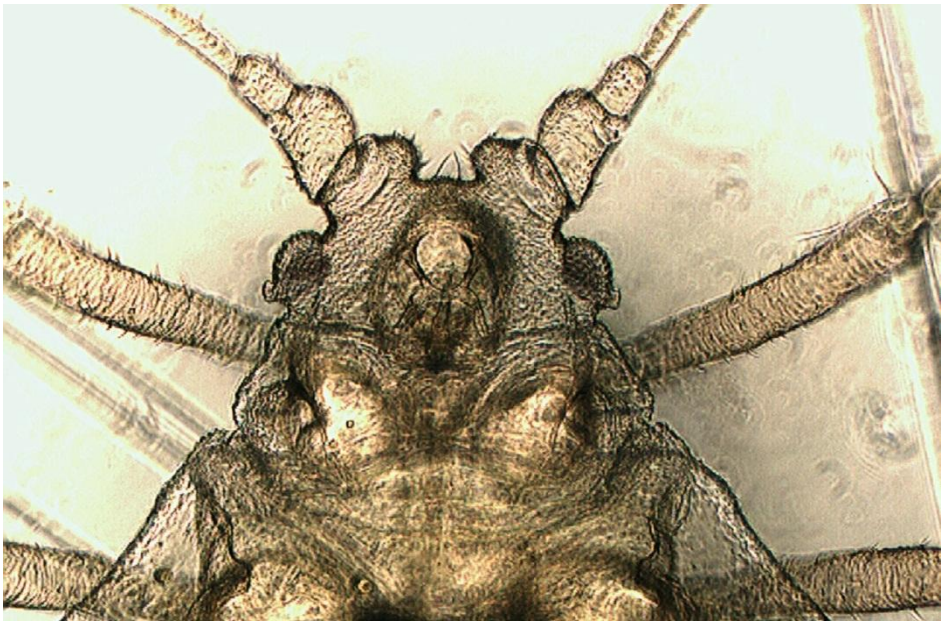

Fig. 3.2 Margen frontal cóncavo con tubérculos antenales bien desarrollados

3.3. Transmisión vectorial de virus.

De las dos especies de áfidos evaluadas solo *A. gossypii* resultó ser vector de *Squash Mosaic Virus* (SqMV)bajo condiciones semicontroladasde acuerdo a los resultados que se muestran en la Tabla5, el porcentaje de transmisión con *M. persicae* y en los controles negativos fue cero (0%).

Tabla 5 Comparación de la eficiencia de la transmisión de Squash Mosaic Virus (SqMV) por Aphis gossypii y Myzus persicae[d]

Especies de áfidos	Numero total de plantas inoculadas	% de plantas con SqMV confirmado por ELISA	Media de valores UDO (ELISA)
Aphis gossypii	100	10,84 + 0,031 a [g]	0,21 ± 0,073 a
Myzus persicae	100	0,00 b	0,10 ± 0,003 b
Control 1 [e]	100	0,00 b	0,08 + 0,002 c
Control 2 [f]	100	0,00 b	0,08 + 0,002 c
H test		10,71 *	59,40 *
Valor p		0,0003	< 0,0001

* Diferencias estadísticamente significativas (p<=0,05)

d Inoculacion biológica; cinco repeticiones; 20 plantas por repetición

e Myzus persicae se alimento de plantas libres de virus en el periodo de adquisición

f Aphis gossypii se alimento de plantas sanas en el periodo de adquisición

g $\bar{x} \pm$ sem; sem= $\sqrt{(\sigma/n)}$

La tabla 6 muestra los porcentajes de transmisión de *SqMV* por *A. gossypii y M. persicae* en las cinco repeticiones evaluadas por tratamiento, se observa además que en los controles negativos el resultado de la transmisión fue cero.

Tabla 6Porcentaje de transmisión de Squash Mosaic Virus

	REPETICIONES				
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V
A. gossypii	16%	7%	12%	7%	13%
Control Ag	0%	0%	0%	0%	0%
M. persicae	0%	0%	0%	0%	0%
Control Mp	0%	0%	0%	0%	0%

Control Ag = Aphis gossypii se alimentó de plantas sanas en el periodo de adquisición

Control Mp = Myzus persicae se alimentó de plantas sanas en el periodo de adquisición

Especialistas de la Universidad de Georgia [57]y Colorado (Howard Schwartz, comunicación personal) testifican la posibilidad de la transmisión de SqMV por pulgones. No existen registros de la transmisión de *Squash Mosaic Virus* por *Aphis gossypii*, este estudio representa el primer reporte de la transmisión del virus perteneciente al género Comovirus por insectos de la familia Aphididae.

La eficiencia de latransmisión de virus no persistentes por pulgonesse ve afectada por factores como: el tiempo tomado por cada especie para la inserción del estiletedurante la prueba inicial en la planta sana [58, 59, 60];las partículas de virus no persistentes, una vez adquiridos se ligan al estilete del áfido y son liberados únicamente en el proceso de salivación[61]; Además, las partículas virales ligadas están expuestas a diferentes enzimas y condiciones iónicas que pueden afectar la superficie estructural de los viriones[61]. Por otra parte, los componentes químicos de la secreción salivar pueden variar con la especie de vector e incluso entre biotipos de la misma especie [61].

3.4. Identificación de enemigos naturales.

En la tabla 4 se presenta la taxonomía de las diferentes especies de enemigos naturales (predadores y parasitoides) de *A. gossypii* y *M. persicae*, Se colectaron un total de treinta y seis (36) individuos agrupados en cuatro (4) órdenes y cuatro (4) familias. Un total de 13 especies de insectos fueron identificadas.

Tabla 7. Taxonomía de especies de enemigos naturales de *A. gossypii* y *M. persicae.*

Orden	Superfamilia	Familia	Subfamilia	Tribu	Género	Especie
Coleóptera	Cucujoidea	Coccinellidae	Chilocorinae	Chilocorini	*Brumus*	*B. quadripustulatus*
			Scymninae	Scymni	*Scymnus*	-----
			Coccinellinae	Halyziini	*Psyllobora*	*P. confluens*
			Scymninae	Brachiacanthini	*Cyra*	-----
			Coccinellinae	Halyziini	*Psyllobora*	-----
			Coccinellinae	Coccinellini	*Coccinella*	-----
			Sticholotidinae	Microweiseini	*Microweisea*	-----
			Coccinellinae	Coccinellini	*Cycloneda*	*C. munda*
			Coccinellinae	Coccinellini	*Paraneda*	*P. pallidula*
			Scymninae	Hyperaspidini	*Tenuisvalvae*	*T. bromelicola*
Díptera	-----	Syrphidae	Syrphinae	Syrphini	*Pseudodorus*	*P. clavatus*
Hymenóptera	Ichneumonoidea	Braconidae		-----		
			Aphidiinae		*Lysiphlebus*	*L. testaceipes*
Hemíptera	Cimicoidea	Anthocoridae	-----	-----	***Orius***	***O. insidiosus***

Se identificó una especie de parasitoide de pulgones, el microhimenóptero corresponde a ***Lysiphlebus testaceipes*** Cresson (Hymenóptera: Braconidae: Aphidiinae). Las características morfológicas que permitieron la identificación del

insecto fueron: Longitud promedio de 1.7 mm (puede variar de 1.3 a 2.0 mm); coloración parda oscura a negra, Venación reducida, el intercúbito y parte del cúbito en el ala anterior se encuentran formando una T invertida, no presenta vena recurrente; la cubierta del ovopositor es corta, posee doce (12) segmentos antenales y cuatro (4) tarsales. Se encontró al insecto parasitando ninfas de *A. gossypii* Glover y *M. persicae* Sulzer (Figura 9).

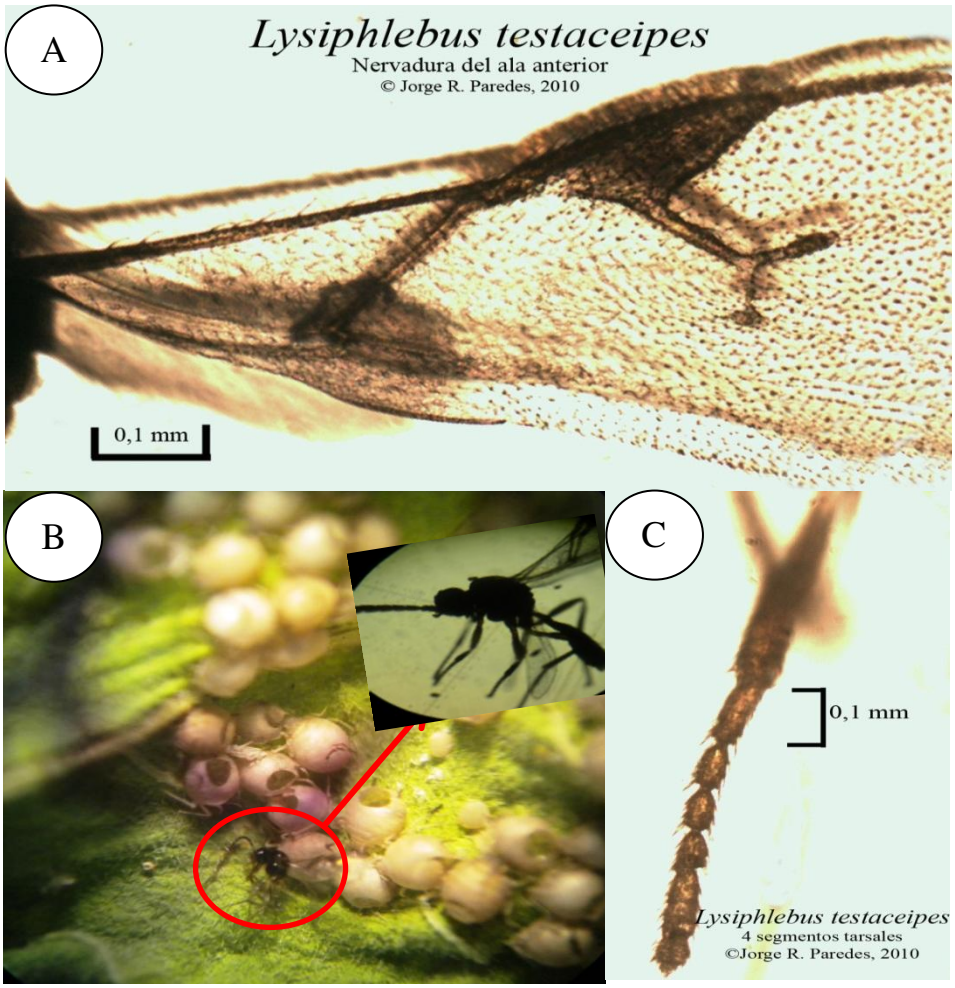

Fig. 3.3 Parasitoide de ninfas de pulgones *Lysiphlebus testaceipes*, (A) Nervadura escasa del ala anterior, (B) adulto de *L. testaceipes* emergiendo de momias, (C) Segmentos tarsales de la pata anterior.

Se identificaron diez (10) especies de coleópteros predadores de áfidos y un predador del orden Díptera, las características morfológicas con valor diagnostico que permitieron la identificación para cada especie fueron:

Pseudodorus Clavatus F. (Díptera: Syrphidae): Forma del cuerpo elongada muy peculiar que puede confundirse con los géneros *Baccha* y *Ocyptamus* (Figura 10A) mide de 7 a 12 mm, el patrón de las alas y la coloración del escutelo diferencian esta especie. Las alas de *P. clavatus* presentan un borde de color marrón y una banda de la misma coloración sobre r1 y r2+3, tal como se observa en la figura 10B. El escutelo de *P. clavatus* se caracteriza por ser de color amarillo con una amplia banda transversal de color negro como se observa en la figura 10C. Las antenas de *P. clavatus* son más elongadas que las de *Baccha sp. (*Figura 10D). Se encontró a las larvas del sírfido alimentándose de ninfas de las dos especies de pulgones en estudio.

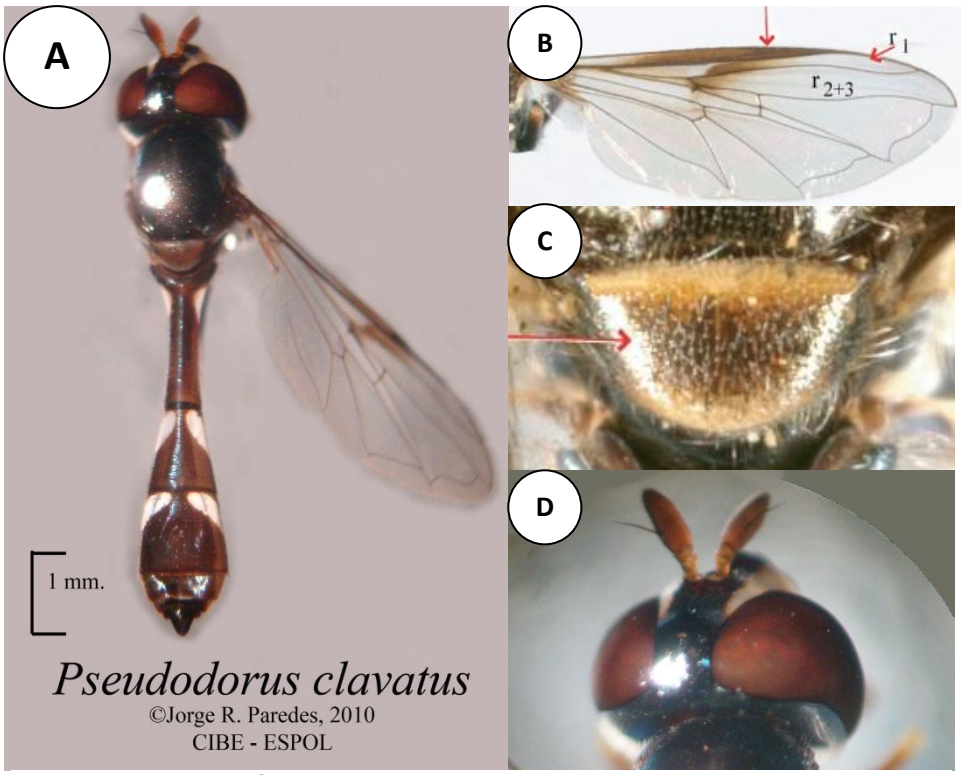

Fig. 3.4 Mosca sírfida, las larvas son depredadores de pulgones, (A) Cuerpo elongado, (B) Nervadura del ala anterior, (C) Escutelo, (D) Antenas más largas que en el género *Baccha*.

Brumus quadripustulatus Linnaeus (Coleóptera: Coccinellidae): Son de color negro brillante con dos manchas de color anaranjado o rojizo en cada élitro (Figura 11 A), las manchas delanteras tienen forma de "C" o "coma (,)". Miden de 4 a 6 mm. Las larvas y adultos de *B. quadripustulatus* fueron colectados alimentándose de pulgones, escamas y cochinillas.

Scymnus sp. Mulsant (Coleóptera: Coccinellidae): Son escarabajos diminutos, pueden medir entre 1.5 y 2 mm, se caracterizan por tener forma ovalada, la coloración de los élitros

es marrón, presenta una mancha triangular oscura que cubre parte de los élitros y un semicírculo negro desde la base de los élitros en el pronoto. Las larvas de estos insectos presentan excrecencias cerosas cubriendo la totalidad del cuerpo. Se alimentan de *A. gossypii*, *M. persicae*, huevecillos y ninfas de *Bemisia tabacci*, Pseudocóccidos y escamas [62], (Figura 11B).

Psyllobora confluens Fabricius (Coleóptera: Coccinellidae): La coloración de este insecto varia de marfil a amarillo, tiene diez manchas de color marrón que puede variar de marrón claro a casi negro, las manchas se encuentran en disposición 2, 3, 1, 3, 1 en cada élitro y pueden estar más o menos unidas o totalmente separadas, la mancha 2 presenta una extensión lineal hasta la 5. Los adultos miden de 3 a 4 mm. Se colectaron las larvas y adultos de colonias de *A. gossypii* en melón (Figura 11C).

Psyllobora sp. Fabricius (Coleóptera: Coccinellidae): Esta especie presenta una coloración marfil claro, la tonalidad es más baja que *P. confluens*, las manchas de color marrón oscuro están más separadas y se diferencian claramente; similar a *P. confluens*, las manchas se encuentran en disposición 2, 3, 1, 3, 1 en cada élitro. Los adultos de esta especie miden entre 1,5 y 2 mm. (Figura 11D).

Cyra sp. Mulsant (Coleóptera: Coccinéllidae): El cuerpo de estos insectos es de forma ovalada. La coloración del cuerpo del insecto es negra con manchas de color amarillo, presenta 5 manchas en cada élitro en disposición: 2, 2, 1 (dos en la base, dos en la mitad y una posterior algo transversal, el pronoto es negro con manchas laterales amarillas y 1 línea transversal delgada e incompleta de color amarillo rojizo en el centro. Miden 4 mm aproximadamente (Figura 11E).

Coccinella sp.Linnaeus (Coleóptera: Coccinéllidae): Estos coleópteros presentan una forma ovalada del cuerpo. El cuerpo es de color anaranjado con 4 manchas negras en cada uno de los élitros, dos en la base, 1 en el centro y otra posterior. La segunda mancha de la base del élitro izquierdo, se une con la primera mancha del élitro derecho. El pronoto es negro con el margen superior de color anaranjado rojizo. Miden aproximadamente 4 mm (Figura 11F).

Microweisea sp.Cockerell(Coleóptera: Coccinéllidae): Son diminutos insectos depredadores de 1,5 mm que se alimentan de ninfas de pulgones y de ácaros. Los élitros no cubren la totalidad de los segmentos abdominales, pronoto marginado en la base de los élitros, la cabeza no es visible dorsalmente (Figura 11G,H).

Cycloneda mundaSay(Coleóptera: Coccinéllidae): Miden entre 5 a 6 mm, es de color anaranjado, más clara que *C. sanguínea*. Se caracteriza por tener una mancha blanca o amarillo pálida en forma de “C” en los extremos laterales del pronoto. El clípeo de *C. munda*, tiene una mancha blanca rectangular, a diferencia de *C. sanguínea*que tiene dos y de *C. polita* que posee dos manchas triangulares de la misma coloración (Figura 11L).

Paraneda pallidula guticullisMulsant(Coleóptera: Coccinéllidae): Son insectos de color ocre claro, con los bordes pronotales color crema, con un ligero borde negro que lo separa de la zona discal. Los ojos de este insecto tienen un margen definido de color ocre más oscuro. Miden de 4,5 a 6 mm. Se colectaron los adultos alimentándose de pulgones (Figura 11J).

Tenuisvalvae bromelicolaSicard(Coleóptera: Coccinéllidae): Son de color amarillo, pronoto con una gran mancha negra en la base que llega casi al borde delantero, dividida en el centro. Los élitros son de color amarillo, con mancha común negra en forma de murciélago, que deja dos manchas amarillas subescutelares grandes, y un borde irregular amarillo, interrumpido en el tercio anterior (Figura 11I).

Orius insidiosusSay(Hemíptera: Anthocoridae): La longitud del cuerpo varía entre 1,1-2,0 mm;La cabeza es negra, generalmente presentando el área comprendida entre la base de las antenas y la punta de la cabeza de color crema claro; la frente posee esculturas, los ocelos son prominentes.Es un depredador polífago que se alimenta de varias presas, tales como ninfas de áfidos, trips, moscas blancas y saltahojas, ácaros, huevos y larvas pequeñas de plagas lepidópteras también come polen (Figura 11K).

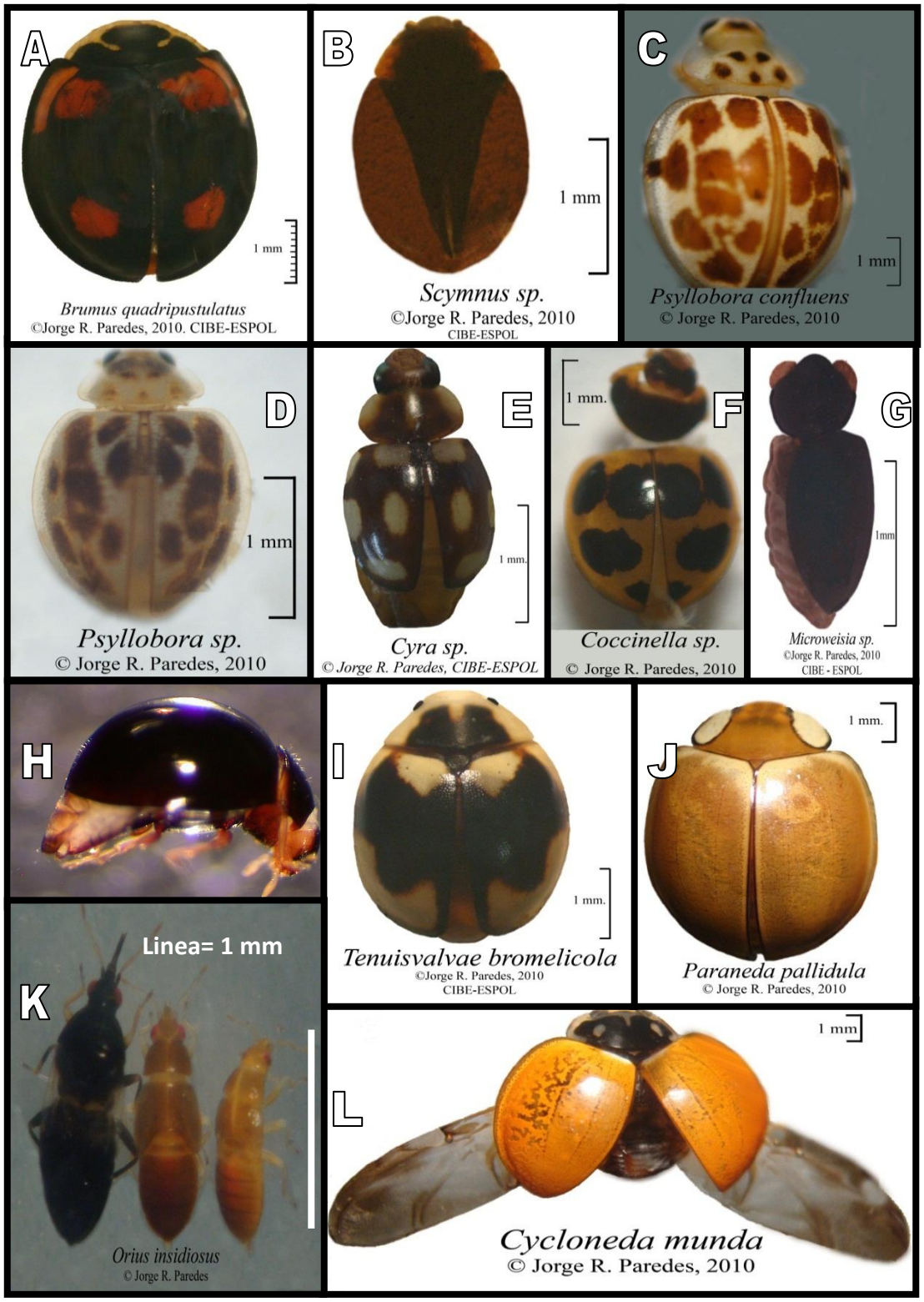

Fig. 3.5 Especies de depredadores de pulgones

Se identificaron dos especies de hongos entomopatógenos que corresponden a *Nomuraea rileyi* y *Aspergillus ochraceus*, el primero ha sidoinformado como patógeno de más de 30 especies de larvas de lepidópteros, principalmente cuando estas se encuentran en condiciones de alta humedad relativa [63]. Ha sido aislado, fundamentalmente, a partir de insectos muertos y de suelos cultivados [64], encontrándose muy asociado a fitófagos importantes, como *Spodoptera frugiperda*, en campos de maíz [65].La infección de pulgones a causa de este hongo fue estudiada [66]. Por otra parte, hongos entomopatógenos del género *Aspergillus* han sido reportados como controladores biológicos de áfidos[64], además, Hornbostel et al. [67] señalan que *A. ochraceus* es causante de alteraciones en la fecundidad, y en los períodos de preoviposición y oviposición de sus hospederos.

Las características con valor diagnóstico que permitieron la identificación de los aislados fueron:

N. rileyi: Conidióforos de coloración verde pálido (Fig. 12 A, B) y micelio blanco, las conidias son completamente elípticas (Fig. 12 C, D), los conidióforos ramificados, cada ramificación contiene dos a cinco fiálides o cadenas de conidias.

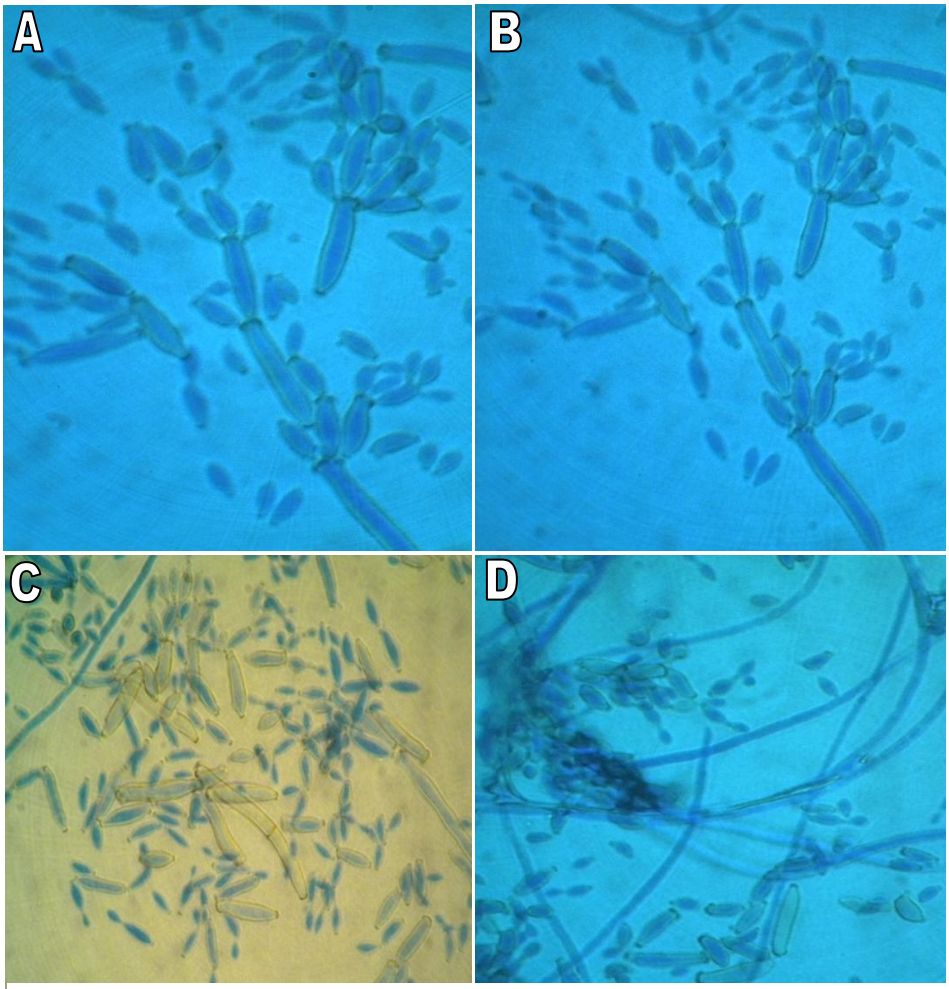

Fig. 3.6 Cuerpo fructífero y conidias de N. rileyi

A. ochraceus: Conidioforos verticales, sencillos, terminando en una protuberancia globosa (Fig. 13F), con fiálides en el ápice, las conidias son unicelulares, globosas y dispuestas en cadenas (Figura 13E). Las estructuras macroscópicas son distintivas, se observan en las figuras 13 A, B, C y D.

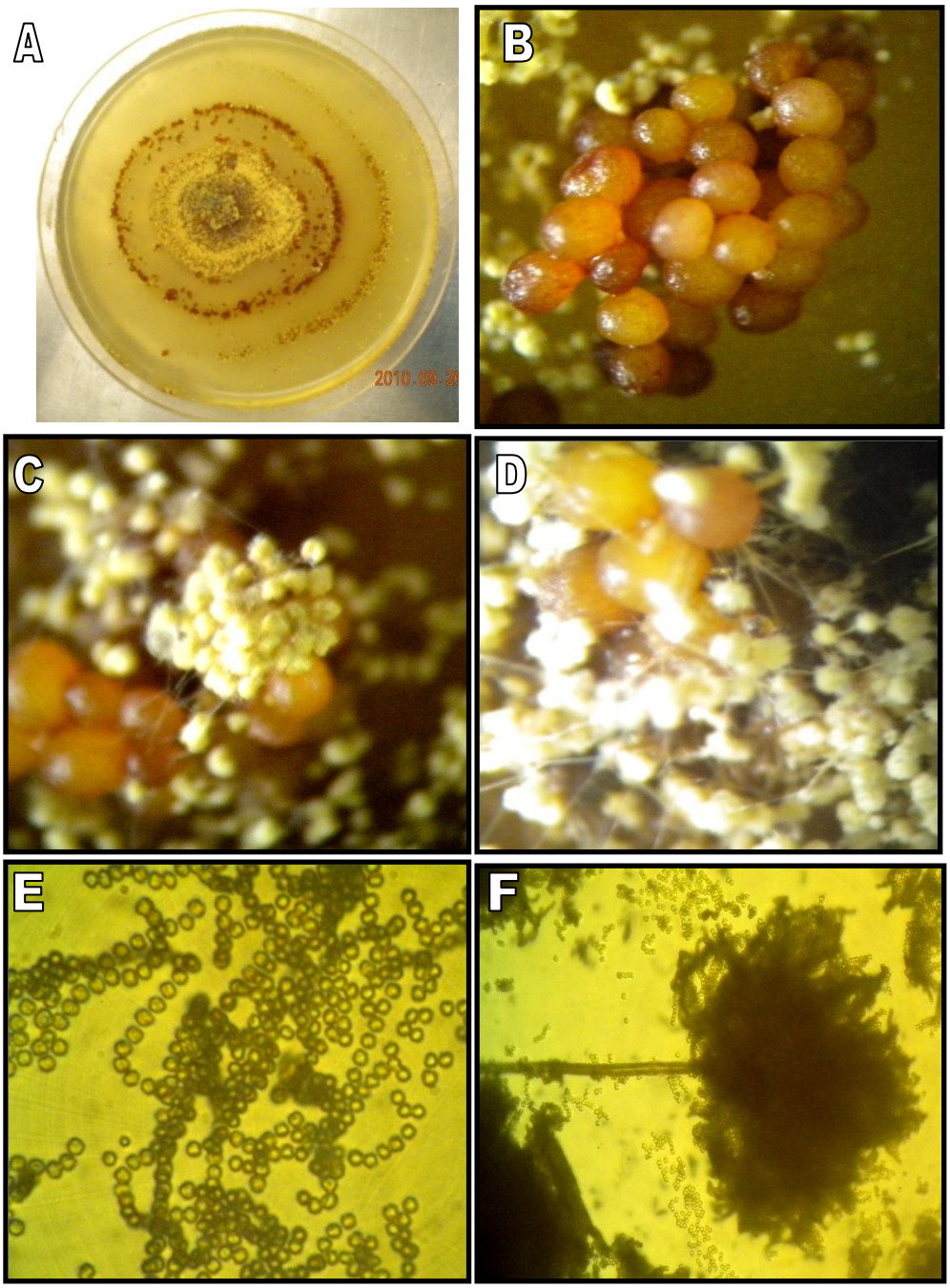

Fig. 3.7A. ochraceus, se observan sus estructuras macro y microscópicas

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se comprobó mediante pruebas inmunoquímicas de ELISA la presencia de *Squash Mosaic Virus*en un 11,42 % del total de muestras evaluadas,afectando a cultivos de ciclo corto entre los cuales están: *Cucumis melo, Citrullus lanatus, Capsicum annum y Centrosoma sp*,la última especie corresponde a una *"maleza"* que actúa como reservorio del virus manteniendo constante el ciclo viral en las plantaciones de los cultivos afectados.

Se detectaron además otras especies virales como: *Cucumber Mosaic Virus, Papaya Ringspot Virus-W, Watermelon Mosaic Virus-2*.

Centrosoma sp, también actúa como reservorio de *Cucumber Mosaic Virus y Watermelon Mosaic Virus-W.Luffa sp* es hospedera del virus *PRSV-W (Papaya Ringspot Virus-W).*

Se identificaron dos especies de pulgones que corresponden a *Aphis gossypii* Glover y *Myzus persicae* Sulzer, ambos son importantes especies transmisoras de virus, y además están encapacidad de formar colonias sobre las especies vegetales en estudio.

El vector *A. gossypii* presentó un porcentaje de transmisión de 10,84%± 0,031, bajo condiciones semicontroladas. No existen registros de la transmisión de SqMV por insectos de esta especie, por lo que los estudios en este tema deben ser profundizados evaluando otras variables como capacidad de retención de las partículas virales y resultados de transmisión incrementando el periodo de ayuno (Lenin Paz, comunicación personal). Especialistas de la Universidad de Georgia [57] y Colorado certifican la posibilidad de la transmisión de SqMV por este vector (Howard Schwartz, comunicación personal). *M. persicae* no es capaz de transmitir el virus.

Se identificaron diez especies de coleópteros depredadores pertenecientes a la familia coccinellidae, todos están en

capacidad de alimentarse de las dos especies de pulgones en estudio, los insectos corresponden a: *Brumus quadripustulatus, Scymnus sp*, *Psyllobora confluens*, *Psyllobora sp, Cyra sp, Coccinella sp, Microweisea sp, Cycloneda munda*, *Paraneda pallidula* y *Tenuisvalvae bromelicola.*

Otros insectos predadores corresponden a: *Orius insidiosus* y *Pseuodorus clavatus*, las ninfas y adultos de *O. insidiosus*, y solo las larvas de *P. clavatus* se alimentan de pulgones.

Se determinó la identidad de una especie de parasitoide de pulgones que corresponde a *Lysiphlebus testaceipes*.

Los hongos entomopatógenos de las especies de pulgones en estudio corresponden a: *Nomuraea rileyi* y *Aspergillus ochraceus.*

Se recomienda:

Profundizar los estudios de transmisión de *Squash Mosaic Virus* mediante el vector *Aphis gossypii*.

Eliminar la maleza hospedera *Centrosoma sp* que actúa como reservorio de *Squash Mosaic Virus*.

Emplear los enemigos naturales de las especies de pulgones en planes de Manejo Integrado de Plagas.

APÉNDICES

APENDICE. A CORROBRACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE CONTROLADORES

BIOLÓGICOS

INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACION EXPERIMENTAL DEL LITORAL SUR "DR. ENRIQUE AMPUERO PAREJA"
CENTRO DE INVESTIGACION Y CAPACITACION AGROPECUARIA

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PROTECCIÓN VEGETAL
AREA DE ENTOMOLOGÍA

Colectores: Egdo. Jorge Paredes Montero
Cultivo: Melón
Lugar : Pedro Carbo - Guayas
Predio: Agricultor Pedro Pozo

Fecha de ingreso: 20 / 08 /2010
Fecha de análisis: 31 /08 /2010

DIAGNÓSTICO
Insectos Benéficos
Organismos identificados:

Orden	Superfamilia	Familia	Subfamilia	Tribu	Género	Especie
Coleóptera	Cucujoidea	Coccinellidae	Chilocorinae	Chilocorini	*Brumus*	*quadripustulatus*
			Scymninae	Scymni	*Scymnus*	----------
			Coccinellinae	Halyziini	*Psyllobora*	*confluens*
			Scymninae	Brachiacanthini	*Cyra*	----------
			Coccinellinae	Halyziini	*Psyllobora*	----------
			Coccinellinae	Coccinellini	*Coccinella*	----------
			Sticholotidinae	Microweiseini	*Microweisea*	----------
			Coccinellinae	Coccinellini	*Cycloneda*	*munda*
			Coccinellinae	Coccinellini	*Paraneda*	*pallidula*
			Scymninae	Hyperaspidini	*Tenuisvalvae*	*bromelicola*
Díptera	------	Syrphidae	Syrphinae	Syrphini	*Pseudodorus*	*clavatus*
Hymenóptera	Ichneumonoidea	Braconidae	Aphidiinae	-------	*Lysiphlebus*	*testaceipes*
Hemíptera	Cimicoidea	Anthocoridae	--------	-------	*Orinus*	*insidiosus*

Atentamente,

Ing. Myriam Arias de López
Entomólogo E. E. L.S.

Km 26 Vía Durán-Tambo, Parroquia Virgen de Fátima, Cantón Yaguachi, Provincia del Guayas
Página Web: www.iniap-ecuador.gov.ec Correo electrónico: iniap_litoralsur@yahoo.com
/myriarias@yahoo.com.mx /Telf. 099612911 Apartado postal: 09 01 7069, Guayaquil, Ecuador

APENDICE. B IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE PULGONES

INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACION EXPERIMENTAL DEL LITORAL SUR "DR. ENRIQUE AMPUERO PAREJA"
CENTRO DE INVESTIGACION Y CAPACITACION AGROPECUARIA

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PROTECCIÓN VEGETAL
AREA DE ENTOMOLOGÍA

Colectores: Egdo. Jorge Paredes Montero
Cultivo: Melón
Lugar : Pedro Carbo - Guayas
Predio: Agricultor Pedro Pozo

Fecha de ingreso: 20 / 08 /2010
Fecha de análisis: 31 /08 /2010

DIAGNÓSTICO
Insectos Plaga
Organismos identificados:

Orden	Familia	Género	Especie
Hemiptera - Homoptera	Aphididae	*Aphis*	*gossypii* Glover
Hemiptera - Homoptera	Aphididae	*Myzus*	*Persicae* Sulzer

Atentamente,

Ing. Myriam Arias de López
Entomólogo E. E. L.S.

Km 26 Vía Durán-Tambo, Parroquia Virgen de Fátima, Cantón Yaguachi, Provincia del Guayas
Página Web: www.iniap-ecuador.gov.ec Correo electrónico: iniap_litoralsur@yahoo.com
/myriarias@yahoo.com.mx /Telf. 099612911 Apartado postal: 09 01 7069, Guayaquil, Ecuador

APENDICE. C PROTOCOLO PARA EL ACLARAMIENTO DE PULGONES

ESPOL C I B E	**PROTOCOLO # 14** **Nombre**: Aclaramiento y montaje de áfidos Versión # **1** **Fecha de Creación/Modificación del Protocolo: 10 / 12 /2009**	Formato realizado el: 23 / 07 / 2007 Rev. 1 Hoja 1 de 1

ESTE DOCUMENTO CONTIENE INFORMACIÓN QUE ES PROPIEDAD INTELECTUAL DEL CIBE

Fuente: SMITH, C.F.; L.F. MARTORELL & M.E. PEREZ ESCOLAR. Aphididae of Puerto Rico. Univ. Puerto Rico, Agr. Exp. Sta. Tech. Paper 37: 1-121. 1963.

Modificado: Jorge R. Paredes

Protocolo CBE-PROT-FP-14

1. Colectar áfidos adultos ápteros y alados (El número de áfidos depende del número de montajes a realizar) en alcohol al 70% (si el montaje se realizará en días posteriores a la colección) o al 90% (si el montaje se realizará inmediatamente luego de la colección). Los especímenes se pueden colocar en tubos de ensayo.
2. Realizar una perforación con un alfiler entomológico en la superficie ventral de cada uno de los especímenes que se desea montar, esto se realiza para facilitar el ingreso del KOH al interior de los insectos.
3. Calentar a baño maría los especímenes en tubos de ensayo en alcohol al 95% hasta el punto de ebullición por algunos minutos dependiendo del grado de esclerotización de los especímenes. Generalmente de 1 a 2 minutos.
4. Decantar el alcohol y agregar Hidróxido de potasio (KOH) al 10% en solución con agua destilada, se realiza nuevamente baño maría durante unos 3 minutos o más dependiendo del grado de esclerotización de los especímenes. Durante este proceso se observa el aclaramiento de los insectos.
5. Decantar el KOH y lavar los especímenes de 5 a 6 veces con agua destilada. Dejar en remojo durante unos cinco minutos con cada cambio de agua.
6. Decantar el agua y añadir ácido acético glacial. Dejar reposar 2 a 3 minutos. Repetir el proceso.
7. Decantar el ácido acético y agregar unas gotas de aceite de clavo. Dejar en remojo durante 10 a 20 minutos, hasta que los especímenes se aclaren completamente.
8. Transferir los áfidos a una got de bálsamo de Canadá centrado en un portaobjetos. El cuerpo debe quedar con el dorso hacia arriba, los apéndices bien separados y el segmento rostral hacia un lado.
9. Mojar con xileno un cubreobjetos limpio y cubrir inmediatamente el espécimen.
10. Rotular la placa con un marcador permanente y secar en un horno a 50ºC durante una semana.

NOTA: Para la manipulación de los especímenes, se recomienda disponer de una herramienta que pueden ser microalfileres doblados en forma de L.

Área de Investigación: Fitopatología **Jefe de Investigación:** M.Sc. Pablo Chong	**Firma:**

BIBLIOGRAFÍA

1. LASTRA, R. 1987. Algunas virosis de importancia agrícola en América tropical. Curso de áfidos. Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza. No.125:63-69.
2. PROWIDENTI, R. 1996. Diseases caused by viruses. Compendium of Cucurbit Diseases, pp: 37-45.
3. EL DIARIO, 2007. "El virus anónimo sigue destruyendo cultivos". En línea, consultado el http://www.eldiario.com.ec/noticias-manabi-ecuador/41725
4. RIVERA, C., W. VILLALOBOS., M.V. SÁNCHEZ., C. ZUMBADO & C.M. RODRÍGUEZ. 1993. Identification and distribution of melon-infecting virus and their vectors in two provinces of Costa Rica. Turrialba 43: 210-215.
5. ALVARADO, E; MENESES, R; PERRING, T; POLSTON, J. 1991. Virosis y vectores del virus del melón en Guatemala, Manejo Integrado de Plagas. CR. 22:36-40.
6. OZASLAN M, AYTEKIN T, BAS B, KILIC H, AFACAN ID, DAG DS. 2006. VirusDiseases ofCucurbits inGaziantep, Turkey. The Plant Pathology Journal5, 24–27

7. ZITTER T. A., HOPKINS D. L., Y THOMAS C. E. 2004. Plagas y enfermedades de las cucurbitáceas. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España.
8. ASTIER S., ALBOUY J., MAURI., ROBAGLIA C., Y LECOQ H. 2007. Principles of plant virology: genome, pathogenicity, virus ecology. Paris, Francia.
9. ALVIZO VILLASANA H. F. 1982. Identificación del virus mosaico de la calabaza en *Cucurbita* spp. y sus vectores. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
10. ESPINOZA L., JAMA M., CAMPUZANO A., IBARRA A., PAREDES JR., ÁLVAREZ R., PERALTA EL. 2010. *First Report of Squash Mosaic Virus (SqMV) in Melón and Watermelon crops in Ecuador*. British Plant Pathology Society
11. ICTVDB MANAGEMENT (2006). 00.018.0.01.015. Squash mosaic virus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA
12. KURSTAK, EDOUARD. 1981. Handbook of plant virus infections and comparative diagnostics. Ed. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Netherlands.
13. ROOSSINCK, M. J. 2002. Evolutionary history of *Cucumber mosaic virus*

deduced by phylogenetic analyses. J. Virol. 76:3382-3387.

14. PALUKAITIS, P., ROOSSINCK, M. J., DIETZGEN, R. G., AND FRANCKI, R. I. B.1992. Cucumber mosaic virus. Adv. Virus Res. 41:281-348.
15. HSU, H. T., BARZUNA, L., HSU, Y. H., BLISS, W., AND PERRY, K. L. 2000. Identification and subgrouping of Cucumber mosaic virus with mouse monoclonal antibodies. Phytopathology 90:615-620.
16. ESTEVA, J; NUEZ, F. 1991. Enfermedades causadas por virus en el cultivo de melón. ITEA 87(2): 111-125.
17. NAULT, L. R. 1997. Arthropod transmission of plant viruses: A newsynthesis. Ann. Entomol. Soc. Am. 90:521-541.
18. CHEN, B., AND FRANCKI, R. I. B. 1990. Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. J. Gen. Virol. 71:939-944.
19. ZITTER, T. A., AND J. F. MURPHY. 2009. Cucumber mosaic. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0518-01
20. PALUKAITIS, P; GARCÍA – ARENAL, F. 2003. Cucumber Mosaic Virus. AAB. Descriptions of Plant Viruses, No. 400.
21. ICTVdB MANAGEMENT (2006). 00.010.0.04.001. Cucumber mosaic virus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

22. KAMEYA-IWAKY, M; MURAKAMI, K; ITO, S; HANADA, K; TANAKA, S. 1987.Semipersistency of *Myzus persicae* transmission of
23. cucumoviruses systemically infecting leguminous plants. **Journal of Virology Methods**, Amsterdam, v.15, n.3, p.233-247.
24. PURCIFULL, D.; HIEBERT, E. Y ESWARDSON, J. 1984. Watermelon mosaic virus 3. CMI/AAB descriptions of plant viruses Nº 293 (nº63 revised). Kew, Surrey, England.
25. PURCIFULL, D., HIEBERT, E., EDWARDSON, J. 1984. Descriptions of plant viruses. No. 293. CMI/AAB. 7pp.
26. MATTHEWS, R. 1993. Diagnosis of plant virus disease. CRC Press. Boca Ratón, Florida, 375 p.
27. ICTVdB MANAGEMENT (2006). 00.057.0.01.073. Watermelon mosaic virus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA
28. GONSALVES, D., S. TRIPATHI, J. B. CARR, AND J. Y. SUZUKI. 2010. Papaya Ringspot virus. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2010-1004-01.
29. ICTVdB MANAGEMENT (2006). 00.057.0.01.045. Papaya ringspot virus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
30. REMAUDIÈRE, G. AND REMAUDIÈRE, M. 1997 Catalogue des Aphididae du Monde. INRA, París, 473 pp.

31. BLACKNMAN, R.L. AND EASTOP, V.F. 2006. Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs. Wiley, Chichester, 1493 pp.
32. KENNEDY, JS; DAY, MF; EASTOP, VF. 1962. A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses. Commonwealth Institute of Entomology. London. 114 p.
33. BUSTILLO PARDEY, A.E.; SÁNCHEZ GUTIÉRREZ, G. 1977. Los áfidos en Colombia: plagas que afectan los cultivos agrícolas de importancia económica. Ed. Bogotá (Colombia). Instituto Colombiano Agropecuario.96 p.
34. HARRIS, KF. 1980. Aphids, Leafhoppers, and plant hoppers. p 1-13. In: Vectors of plant pathogens. Harris, KF. & Maramorosch, K. (EDS) Academic Press, NY.
35. CERMELI, M. 1987. Control de áfidos plagas en Venezuela. Curso de áfidos. Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza. No.125:20-35.
36. DIXON, AFG. 1973. Biology of aphids. E. Arnold (Public.) Ltd. London. 58 p.
37. JAWAID A. KHAN Y JEANNE DIJKSTRA (Eds). 2002. Plant viruses as Molecular Diseases. The Haworth Press, Inc. London. 557 pp.
38. WALKER HL, PIRONE TP. 1972. Particle numbers associated with mechanical and aphid transmission of some viruses. Phytopathology 82: 1283-1288.

39. PLUMB RT. 1989. Detecting plant viruses in their vectors. In Harris KF (ed.), Advances in Disease Vector Research, (Volume 6), Springer-Verlag, Berlin, pp. 191-209.
40. ZEYEN RJ, BERGER PH. 1990. Is the concept of short retention times for aphid-borne nonpersistent plant viruses sound? Phytopathology 80: 769-771.
41. LOPEZ-ABELLA D, BRADLEY RHE, HARRIS KF. 1988. Correlation between stylet paths made during superficial probing and the ability of aphids to transmit nonpersistent viruses. In Harris KF (ed.), Advances in Disease Vector Research (Volume 5), Springer-Verlag, New York, pp. 251-287.
42. BARBAGALLO, S., CRAVEDI, P., PASCUALINI, E., y PATTI, ISIDORA. 2002. Pulgones de los principales cultivos frutales. Bayer-Mundi Prensa. España. 121 p.
43. CARBALLO, M.; QUEZADA, J.R. 1987. Uso de parásitos en el control biológico de áfidos. no. 6:1-10.:28-35.
44. CAVE, RD. 1995. Manual para el Reconocimiento de Plagas Agrícolas en América Central. 1ra Edición, Editorial Zamorano. 202pp.
45. CHIRI, AA. 1987. Enemigos Naturales de los Afidos: Depredadores. En Curso de Áfidos. CATIE Panamá. Serie Técnica No 125. 36-42 pp.

46. COLMAR-ANDREAS SERRA. 1996. Metodología para el estudio y manejo de moscas blancas y Geminivirus. Luko Hilje ed. Turrialba, C.R.: CATIE. Unidad de Fitoprotección, 1996.
47. CLARK, M. F.; A. N. ADAMS.1977.«Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses», Journal of General Virology 34:475-483, Inglaterra.
48. SMITH, CF.; L.F. MARTORELL y M.E. PERES ESCOLAR. Aphididae of Puerto Rico. Univ. Puerto Rico, Agr. Exp. Sta. Tech., Paper 37: 1-121. 1963.
49. MARTIN, J. H. 1983. The identification of common aphid pests of tropical agriculture. Trop. Pest Manage. 29: 395-411.
50. KALLESHWARASWAMY CM, KUMAR NKK. 2008. Transmission efficiency of Papaya ringspot virus by three aphid species. *Phytopathology*.;98(5):541-6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18943221.
51. GONZÁLEZ, G. & VANDENBERG, N., 2007. Los Coccinellidae de Perú [online]. Disponible en World Wide Web: http://www.coccinellidae.cl/paginasWebPeru.
52. INSTITUTO NACIONAL DE BIODIVERSIDAD. 2009. Colecciones sinópticas de Artrópodos [online]. Disponible en World Wide Web: http://lucina.inbio.ac.cr/synoptics/

53. DipteraInfo. 2010. Images in Diptera Gallery and Forum. [online]. Disponible en World Wide Web:http://www.diptera.info/photogallery.php?album_id=49&rowstart=630

54. BugGuide. 2005. Identification, Images, & Information For Insects, Spiders and Their Kin For the United States & Canada [online]. Disponible en World Wide Web:http://bugguide.net/node/view/15740

55. RHODES, D. J.; J. D. SMITH. 1992. «Techniques for Quantifying the Ecologicaland Pathological Characteristics of Entomopathogenic Fungal Strains». Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases, 351-356.

56. BARNETT, H. L.; B. B. HUNTER. 1998.Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4th Edition, The American Phytopahological Society Press.

57. TZEAN S.S., HSIEH L.S., CHEN J.L., WU W.J. 1993. *Nomuraea cylindrospora*. Mycological Society of America Vol 85. No 3. Pp: 514-519.

58. FORESTRY IMAGES. 2010. Squash Mosaic Virus. The University of Georgia - Warnell School of Forestry and Natural Resources and College of Agricultural and Environmental Sciences [online]. Disponible en:http://www.forestryimages.org/browse/subimages.cfm?sub=10380&Area=96.

59. KAAKEH, W., AND DUTCHER, J. D. 1993. Population dynamics and probing behavior of cowpea aphid *A. craccivora* (Homoptera: Aphididae) on preferred and nonpreferred host cover crops. J. Entomol. Sci. 28:145-155.

60. STUBBS, L. L. 1960. Aphid transmission of broad bean wilt virus and comparative transmission efficiency of three vector species. Aust. J. Agr. Res. 11:734-741.

61. YUAN, C., AND ULLMAN, D. E. 1996. Comparison of efficiency and propensity as measures of vector importance in Zucchini yellow mosaic potyvirus transmission by *Aphis gossypii* and *A. craccivora*. Phytopathology 86:698-703.

62. GRAY, S. M., AND BANERJEE, N. 1999. Mechanism of arthropod transmission of plant and animal viruses. Microbiol. Mol. Biol. R. 63:128-148.

63. ALVIS L., A. RAIMUNDO, M. VILLALBA, F. GARCÍA-MARÍ. 2002. Identification and abundance of Coccinellidae (Coleóptera) in *Citrus* orchards fron Valencia (Spain). *Bol.San. Veg. Plagas,* 28: 479-491.

64. DEVI U, MOHAN C, PADMAVATHI J, RAMESH K. 2003. Susceptibility to Fungi of Cotton Bollworms before and after a natural epizootic of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). Biocontrol Sci Technol.13(3):367-371.

65. BING S, YU H, CHEN A, LIU X. 2008. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. Crop Protection. 27:1421-1426.
66. WYCKHUYS KA, O'NEIL RJ. 2006. Population dynamics of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) and associated arthropod natural enemies in Honduran subsistence maize. Crop Protection. 25:1180-1190.
67. VU VH, HONG SI, KIM K. 2007. Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. J Biosci Bioeng. 104:498-505.
68. HORNBOSTEL VL, OSTFELD RS, ZHIOUA E, BENJAMIN MA. 2004. Sublethal effects of*Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology 41: 922–929.