

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



TRABAJO FINAL DE GRADO (TFG)

ESTRATEGIA DE GESTIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO Y SUS VECTORES EN CULTIVOS HORTÍCOLAS POR MEDIO DE PRODUCTOS NATURALES

Curso académico 2018-2019

Titulación: Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural

Autor: Madalina-Gabriela Bozga

Tutores: María Isabel Font San Ambrosio y Rafael Laborda Cenjor

Directora experimental: Paloma Pérez Díaz

Valencia, noviembre de 2018

RESUMEN

TÍTULO: Estrategia de gestión del virus del mosaico del pepino y sus vectores en cultivos hortícolas por medio de productos naturales.

RESUMEN: Los virus vegetales causan considerables daños y pérdidas económicas en los cultivos de todo el mundo. El virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) es el miembro tipo del género *Cucumovirus*, de la familia *Bromoviridae*. El CMV es el virus con mayor rango de huéspedes y uno de los virus de plantas con distribución geográfica más amplia, siendo el primer causante de pérdidas económicas en hortícolas y ornamentales al aire libre. En España ha sido citado prácticamente en todas las provincias. Los pulgones son una de las principales plagas de los cultivos hortícolas, produciendo daños directos en la planta debido a su alimentación y además son vectores de importantes virosis. La mayoría de virus vegetales transmitidos por pulgones, incluido el CMV, se inoculan de forma no persistente. El control directo de las enfermedades virales no es posible y los insecticidas sintéticos no suelen ser eficaces en estos casos, además de que tienen un impacto negativo en la salud humana y en el medio ambiente. En vista de esta situación se considera de gran importancia utilizar los recursos naturales incluso para la gestión de virus y sus vectores en cultivos hortícolas. Con la intención de avanzar en el diseño de estrategias para el control de estos problemas, en el presente trabajo de fin de grado se ha realizado, en una primera fase, una evaluación de la incidencia de virus vegetales en los cultivos hortícolas de tomate, berenjena, pepino, calabacín y pimiento en la finca ecológica de la empresa SAIFRESC ubicada en el municipio de Alcàsser. Los resultados de los análisis determinaron la presencia únicamente del virus del mosaico del tomate (ToMV) en 3 de las 8 muestras de tomate con sintomatología de posibles infecciones víricas recogidas en campo. También se ha determinado la eficacia del pulgón *Macrosiphum euphorbiae* como transmisor del CMV, siendo esta del 10 %. En una segunda fase, se ha ensayado la eficacia del producto natural tierra de diatomeas para el control de la transmisión del CMV de modo no persistente por el pulgón *Macrosiphum euphorbiae*. Para ella se ha empleado la tierra de diatomeas en aplicación directa sobre los pulgones a una dosis del 2%, no mostrando diferencias significativas en comparación con el control en cuanto a su comportamiento tóxico, ni tampoco al incrementar la dosis del producto, ya que no intensificaba su eficacia como insecticida. La tierra de diatomeas, a una dosis del 2% tampoco mostró ningún tipo de repelencia sobre los pulgones.

PALABRAS CLAVE: Pulgones, virosis, productos naturales, hortícolas

AUTORA: Madalina-Gabriela Bozga

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, noviembre de 2018

TUTORES: María Isabel Font San Ambrosio y Rafael Laborda Cenjor

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Paloma Pérez Díaz

TÍTOL: Estratègia de gestió del virus del mosaic del cogombre i els seus vectors en cultius hortícoles per mitjà de productes naturals.

RESUM: Els virus vegetals causen considerables danys i pèrdues econòmiques en els cultius de tot el món. El virus del mosaic del cogombre (*Cucumber mosaic virus*, CMV) és el membre tipus de gènere *Cucumovirus*, de la família *Bromoviridae*. El CMV és el virus amb major rang d'hostes i un dels virus de plantes amb distribució geogràfica més àmplia, sent el primer causant de pèrdues econòmiques en hortícoles i ornamentals a l'aire lliure. A Espanya ha sigut citat pràcticament en totes les províncies. Els pulgons són una de les principals plagues dels cultius hortícoles, produint danys directes en la planta degut a la seua alimentació i a més són vectors d'importants virosis. La majoria de virus vegetals transmesos per pulgons, inclòs el CMV, s'inoculen de forma no persistent. El control directe de les malalties virals no és possible i els insecticides sintètics no solen ser eficaços en estos casos, a més que tenen un impacte negatiu en la salut humana i en el medi ambient. En vista d'aquesta situació es considera de gran importància utilitzar els recursos naturals inclús per a la gestió de virus i els seus vectors en cultius hortícoles. Amb la intenció d'avançar en el disseny d'estratègies per al control d'aquests problemes, en el present treball de fi de grau s'ha realitzat, en una primera fase, una avaluació de la incidència de virus vegetals en els cultius hortícoles de tomaca, albergina, cogombre, carabasseta i pimentó en la finca ecològica de l'empresa SAIFRESC ubicada en el municipi d'Alcàsser. Els resultats dels anàlisis van determinar la presència únicament del virus del mosaic de la tomaca (ToMV) en 3 de les 8 mostres de tomaca amb simptomatologia de possibles infeccions víriques arreplegades en camp. També s'ha determinat l'eficàcia del pulgó *Macrosiphum euphorbiae*, com a transmissor del CMV, siguent aquesta del 10 %. En una segona fase, s'ha assajat l'eficàcia del producte natural terra de diatomees per al control de la transmissió del CMV de manera no persistent pel pulgó *Macrosiphum euphorbiae*. Per a això s'ha empleat la terra de diatomees en aplicació directa sobre els pulgons a una dosi del 2%, no mostrant diferències significatives en comparació amb el control en quant al seu comportament tòxic, ni tampoc a l'incrementar la dosi del producte, ja que no intensificava la seua eficàcia com a insecticida. La terra de diatomees, a una dosi del 2% tampoc va mostrar cap tipus de repel·lència sobre els pulgons.

PARAULES CLAU: Pulgons, virosi, productes naturals, hortícoles

ABSTRACT

TITLE: Management strategy of cucumber mosaic virus and its vectors in horticultural crops through natural products.

ABSTRACT: Plant viruses cause significant damage and economic losses to crops throughout the world. *Cucumber mosaic virus* (CMV) is the type member of the genus *Cucumovirus*, of the *Bromoviridae* family. CMV is the virus with highest host range and one of the plant viruses with the broadest geographical distribution, being the first cause of losses in vegetables and outdoor ornamentals. In Spain it has been cited practically in all the provinces. Aphids are one of the main pests of horticultural crops, producing direct damages in the plant due to their feeding and are also important viral vectors. Most plant viruses transmitted by aphids, including CMV, are inoculated in a not persistent way. Direct control of viral diseases is not possible and synthetic insecticides are usually not effective in these cases, in addition to that they have a negative impact on human health and the environment. In view of this situation, it is considered of great importance to use natural resources even for the management of viruses and their vectors in horticultural crops. With the intention of advancing in the design of strategies for the control of these problems, in the present work of end of degree, in a first phase, an evaluation was made of the incidence of plant viruses in tomato, eggplant, cucumber, zucchini and pepper horticultural crops in the ecological farm of the SAIFRESC company located in the municipality of Alcàsser. The results of the analyses determined the presence only of the tomato mosaic virus (ToMV) in 3 of the 8 tomato samples with symptoms of possible viral infections collected in the field. The effectiveness of the aphid *Macrosiphum euphorbiae* as a CMV vector has been also determined, being 10%. In a second phase, the effectiveness of the natural product diatomaceous earth has been tested for the control of CMV transmission in a non-persistent way by the *Macrosiphum euphorbiae* aphid. For it the diatomaceous earth has been used in direct application on the aphids at a dose of 2%, showing no significant differences compared to the control in terms of its toxic behaviour, nor when increasing the dose of the product, since it did not intensify its effectiveness as an insecticide. The diatomaceous earth, at a dose of 2%, did not show any kind of repellence on the aphids either.

KEY WORDS: Aphids, virus diseases, natural products, horticulture

*A mi familia, en especial a mis padres Gavril y Anisia
y a mis amigas y compañeras Carolina y Belén*

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Introducción	1
1.1. Virus vegetales y su transmisión	1
1.2. Los pulgones y su papel como transmisores de virus	4
1.3. El virus del mosaico del pepino (<i>Cucumber mosaic virus</i> , CMV).....	7
1.4. Control del CMV	8
2. Objetivos	13
3. Material y métodos	14
3.1. Trabajo de campo.....	14
3.2. Análisis de las muestras	16
3.3. Cría y manejo de pulgones	18
3.4. Ensayo: Eficacia de <i>Macrosiphum euphorbiae</i> como transmisor de CMV	20
3.5. Ensayos con tierra de diatomeas	26
3.5.1. Ensayo 1: Toxicidad de la tierra de diatomeas en aplicación directa sobre <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	26
3.5.2. Ensayo 2: Eficacia de distintas dosis de tierra de diatomeas sobre <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	27
3.5.3. Ensayo 3: Repelencia de la tierra de diatomeas sobre <i>Macrosiphum euphorbiae</i> ...	28
3.6. Análisis estadístico de los resultados	29
4. Resultados y discusión	30
4.1. Análisis de las muestras tomadas en campo.....	30
4.2. Eficacia de <i>Macrosiphum euphorbiae</i> como transmisor de CMV	33
4.3. Ensayo 1: Toxicidad de la tierra de diatomeas en aplicación directa sobre <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	34
4.4. Ensayo 2: Eficacia de distintas dosis de tierra de <i>diatomeas</i> sobre <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	34
4.5. Ensayo 3: Repelencia de la tierra de diatomeas sobre <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	35
5. Conclusiones	37
6. Bibliografía	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transmisión no persistente (A): El insecto necesita alimentarse un periodo de tiempo corto, y generalmente de tejidos cercanos a la superficie de la hoja, para adquirir el virus. Transmisión persistente (B): El insecto necesita alimentarse durante varias horas, a menudo de tejidos conductores de alimento de las plantas, para el virus.....	2
Figura 2. Cantidad de virus transmitido por las cuatro principales familias de vectores homópteros, dividido en las cuatro categorías de transmisión.....	4
Figura 3. Representación esquemática de un pulgón alimentándose: (e): epidermis vegetal; (p): parénquima vegetal; (se): jugos celulares; (ss): estilete; (st): punta del estilete	5
Figura 4. Hojas de tomate con filiformismo (A) y mosaico foliar (B), síntomas característicos de CMV en tomate	8
Figura 5. Tierra de diatomeas	12
Figura 6. Plano de las 24 parcelas que componen la finca dedicada a la horticultura ecológica de la empresa SAIFRESC y localización de las parcelas muestreadas	14
Figura 7. Recolección e identificación de una muestra en una planta de tomate con aparentes síntomas de ToMV (virus del mosaico del tomate)	15
Figura 8. Orden en la parcela de las diferentes variedades de tomate de la finca SAIFRESC	15
Figura 9. Muestras de los cultivos de tomate (A) y pepino (B) preparadas para su procesado en laboratorio y análisis	16
Figura 10. Prueba serológica de inmunocromatografía de flujo lateral (BIOREBA AG, Suiza) Agdia ImmunoStrip® (Agdia, Inc. USA Biogenetic).	17
Figura 11. Interpretación de los resultados de la prueba serológica de inmunocromatografía de flujo lateral (BIOREBA AG, Suiza).....	17
Figura 12. Hoja de berenjena (<i>Solanum melongena</i>) con pulgones de la especie <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	18
Figura 13. Flor de berenjena (<i>Solanum melongena</i>) infestada con pulgones de la especie <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	18
Figura 14. Recipiente de cría de pulgones (<i>Macrosiphum euphorbiae</i>) en condiciones de laboratorio.....	19
Figura 15. Hojas de berenjena (<i>Solanum melongena</i>) con parasitoides de pulgones, pulgones de la especie <i>Macrosiphum euphorbiae</i> sin parasitar y parasitados (momias).....	20
Figura 16. Material vegetal con el virus a inocular (CMV) sin homogeneizar (A) y una vez homogeneizada en un mortero estéril, con solución inóculo y carborundo añadido (B)	21
Figura 17. Inoculación mecánica artificial de una planta de tomate cv. Valenciano (<i>Solanum lycopersicum</i>) con CMV en laboratorio	21

Figura 18. Recogida de muestras tomando el foliolo terminal de la segunda hoja recién formada de cada planta de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) infectada, guardada en una bolsa de plástico debidamente identificada	22
Figura 19. Muestras de material vegetal de plástico ELISA (A) y durante el proceso de machaque (B)	23
Figura 20. Placa Petri sellada con cinta Parafilm conteniendo en su interior ejemplares de <i>Macrosiphum euphorbiae</i> obtenidos de la cría disponibles en laboratorio	24
Figura 21. Ejemplares de <i>Macrosiphum euphorbiae</i> alimentándose libremente de una hoja de planta virosada con CMV, contenidos dentro de una placa Petri modificada.....	25
Figura 22. Transferencia de ejemplares de <i>Macrosiphum euphorbiae</i> virulíferos desde la planta virosada (A) a las plantas test (B)	25
Figura 23. Portaobjetos modificado con cuatro pulgones de la especie <i>Macrosiphum euphorbiae</i> adheridos.....	27
Figura 24. Portaobjetos modificados con cuatro pulgones de la especie <i>Macrosiphum euphorbiae</i> fijados a cada uno, sobre una grada, una vez han sido sumergidos en solución de producto en agua de concentración conocida (cuatro repeticiones por dosis)	28
Figura 25. Pulverización de una planta de berenjena con una solución de tierra de diatomeas preparada al 2%	28
Figura 26. Caja de plástico con tres plantas de berenjena: planta tratada con una solución de tierra de diatomeas preparada al 2%; planta sin tratamiento (Control) y una planta plagada de pulgones	29
Figura 27. Resultados positivos a la infección con ToMV en las muestras N.º 4, N.º 5 y N.º 6 de tomate	30
Figura 28. Resultados negativos a la infección con TEV y CMV en las muestras de tomate	30
Figura 29. Resultados negativos a la infección con ZYMV, CGMMV, SqMV, en las muestras de pepino y PepMV en las muestras de tomate	31
Figura 30. Número de pulgones (<i>Macrosiphum euphorbiae</i>) vivos a distintos tiempos desde la aplicación de los diferentes tratamientos: control (agua); tierra de diatomeas (dosis del 2%); producto insecticida comercial de efectividad ya comprobada. Letras distintas indican diferencias significativas a nivel estadístico. Diferencias significativas según ANOVA ($P \leq 0,05$)	34
Figura 31. Número de pulgones (<i>Macrosiphum euphorbiae</i>) vivos a distintos tiempos después de un tratamiento con tierras de diatomea a distintas dosis. Dosis evaluadas (%): 0,1- 1- 10. Prueba ANOVA (nivel de significación de ($P \leq 0,05$))	35
Figura 32. Número de pulgones (<i>Macrosiphum euphorbiae</i>) que eligen situarse sobre plantas de berenjena (<i>Solanum melongena</i>) tratadas con el producto de prueba (tierra de diatomeas pulverizada con una dosis del 2%) y sobre plantas control (pulverización con agua) a distintos tiempos desde su aplicación. Prueba ANOVA (nivel de significación de $P \leq 0,05$)	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros de la familia Bromoviridae con su especie tipo	7
Tabla 2. Resultados obtenidos al analizar las muestras de tomate mediante la técnica serológica de inmunocromatografía de flujo lateral (BIOREBA AG, Suiza) para TEV, CMV, ToMV y PepMV	31
Tabla 3. Resultados obtenidos al analizar las muestras de pepino mediante la técnica serológica de inmunocromatografía de flujo lateral (BIOREBA AG, Suiza) para ZYMV, CGMMV y SqMV...	32

1. INTRODUCCIÓN

El sector hortofrutícola se sitúa como el más importante en el conjunto del sector agrario español con una producción cuyo valor alcanza los 10.000 millones de euros (MAGRAMA, 2018). La superficie total de producción de hortalizas en España en 2017 fue de 387.767 hectáreas, con una producción aproximadamente de 15.581.210 toneladas (MAGRAMA, 2018). Aunque el sector horticola se encuentra presente en la mayoría de las Comunidades Autónomas, destaca sobre todo en Andalucía, la Región de Murcia, Castilla-La Mancha, Extremadura y la Comunidad Valenciana (MAGRAMA, 2018).

Entre el 30% y el 40% de la producción española de hortalizas (media de 2010-2012) se dedica a la exportación. De hecho, nuestro país es el primer exportador de frutas y hortalizas de la Unión Europea y es uno de los tres primeros países exportadores mundiales, junto a China y EE. UU. En los últimos años y a diferencia de las importaciones, las exportaciones han seguido una evolución creciente, habiendo alcanzado en el año 2012 el volumen de 12.109.400 toneladas con un valor de 10.829 millones de euros. Los principales cultivos horticolas que se exportan son aquellos cultivados en el invernadero, tales como el tomate, el pimiento y el pepino (MAGRAMA, 2018).

Sin embargo, hay aproximadamente 70.000 especies diferentes de plagas en el mundo que pueden dañar los cultivos. Se estima que entre el 35% y el 42% de la producción potencial mundial de los cultivos es destruida por plagas. Aproximadamente el 14% de las pérdidas son causadas por plagas de insectos, y tanto los patógenos de las plantas como las malas hierbas causan pérdidas del 13%, respectivamente. El valor de esta pérdida de cosecha se estima en 2.000 millones de dólares por año (Pimentel, 2009).

1.1 VIRUS VEGETALES Y SU TRANSMISIÓN

Los virus vegetales, como parásitos intracelulares obligados, requieren de diversas estrategias para moverse de una planta infectada a otro huésped sano para sobrevivir (Moreno, 2005).

Por una parte, el virus se puede transmitir de manera vertical, lo que significa que el patógeno pasa de un progenitor infectado directamente a la siguiente generación. La transmisión puede ser también horizontal, en este caso el virus se transmite de un huésped a otro de la misma especie o incluso a uno que potencialmente no esté relacionado. La transmisión por contacto directo o indirecto, por ejemplo, a través de heridas abiertas, también pertenece a este tipo de transmisión. En la transmisión aérea, los virus usan soportes inertes para alcanzar e infectar nuevos huéspedes. Aunque es sin duda, la transmisión mediante insectos vectores la más empleada por los virus vegetales para dispersarse de un huésped a otro (Dáder, 2017).

En cuanto al éxito de la transmisión vectorial, se debe en parte a que, a diferencia de la distribución pasiva, un vector es capaz de moverse y buscar de manera activa nuevos huéspedes. Además, muchos insectos vectores son parásitos que se alimentan de savia o sangre, pudiendo administrar el virus directamente a las células y vasos del nuevo huésped. Las partes bucales parecidas a agujas de los insectos chupadores provocan un daño mínimo a los huéspedes, dejando

intactas las células y tejidos perforados, y, por tanto, compatibles con la infección y propagación del virus (Dáder, 2017).

La transmisión de virus mediante cualquier vector requiere de la transferencia de viriones de las plantas infectadas a aquellas sanas. En este proceso se pueden distinguir cuatro fases diferentes: adquisición, retención, latencia e inoculación. En un primer momento el vector se alimenta a partir de una planta infecta adquiriendo la suficiente carga viral como para poder transmitir el virus. Sin embargo, el vector no es capaz de inocular el virus inmediatamente después de la fase de adquisición, para ello, ha de pasar un periodo de latencia. Una vez pasado el tiempo de latencia, destacamos un intervalo de tiempo en el que el virus es capaz de transmitir dicho virus a otra planta huésped, siendo este el periodo de retención. Por último, en el proceso de inoculación el virus el vector libera los viriones retenidos en los tejidos de una planta susceptible de tal manera que se establezca una nueva infección (Katis et al, 2007).

En base al tiempo que tarda el vector en adquirir y luego transmitir el virus y al tiempo que sigue el vector siendo capaz de transmitir el virus se ha clasificado la transmisión en dos grandes categorías: transmisión no persistente y transmisión persistente o circulativa. La transmisión de un virus por insectos es un proceso biológico muy específico. Un virus solo puede ser transmitido por el vector de manera persistente o no persistente. (Persley y Gambley, 2010).

En cuanto a la transmisión no persistente, la adquisición y la inoculación requieren un periodo de tiempo relativamente corto de penetración del estilete (menor a 1 minuto), además, el vector únicamente retiene el virus en sus partes bucales durante unas pocas horas, perdiendo la capacidad de transmisión tras la muda. Cuando un vector, una vez se haya alimentado, pierde la carga viral, para ser capaz de infectar otras plantas tiene que alimentarse otra vez de una planta infectada (Katis et al, 2007). En el caso de la transmisión persistente, los periodos de adquisición e inoculación pueden durar desde varias horas hasta días. Para que el vector sea capaz de transmitir el virus a cualquier otra planta huésped, en este caso sí que es necesario que pase un periodo de latencia de diversas horas, y una vez ha pasado, el vector puede seguir infectivo de por vida (Katis et al, 2007).

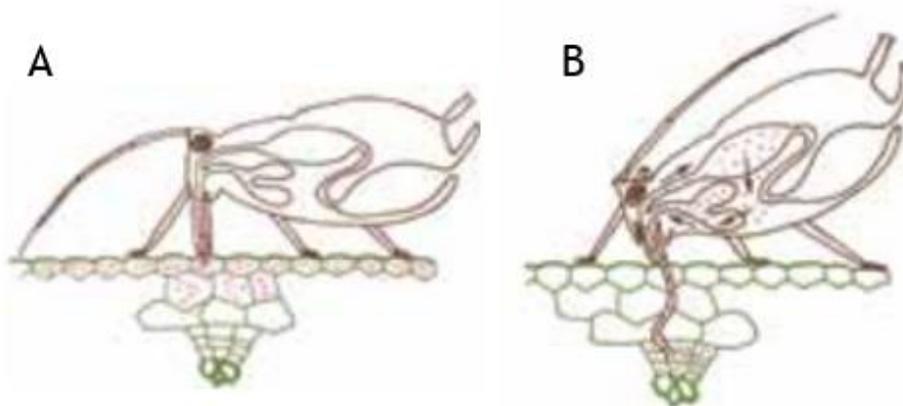


Figura 1. Transmisión no persistente (A): El insecto necesita alimentarse únicamente un periodo de tiempo corto, y generalmente de tejidos cercanos a la superficie de la hoja, para adquirir el virus. Transmisión persistente (B): El insecto necesita alimentarse durante varias horas, a menudo de tejidos conductores de las plantas, para obtener el virus (Persley y Gambley, 2010).

Como los virus vegetales necesitan pasar de plantas infectadas a plantas sanas con el fin de sobrevivir, estos aprovechan el carácter altamente invasivo de algunas especies vectores para propagarse, causando brotes de enfermedades virales en cultivos de hortalizas cada año, dañando los suministros de alimentos y fuentes de biocombustibles del mundo y causando graves pérdidas económicas en todo el mundo. Por ejemplo, solo en los EE. UU., las enfermedades de los cultivos causan pérdidas de miles de millones de dólares cada año, atribuidas principalmente a microorganismos invasores (Viteri y Gordillo, 2009).

En España, en los últimos años, los principales cultivos hortícolas se han visto afectados por diversas virosis transmitidas por insectos vectores. Destacan las siguientes: el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV, Cucumovirus); el virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV, Polerovirus); el virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV, Begomovirus), el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV, Tospovirus), el virus del torrado del tomate (*Tomato torrado virus*, ToTV, Torradovirus) y entre otros virus emergentes de reciente aparición como por ejemplo el virus del rizado amarillo del tomate de Nueva Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV, Begomovirus) (Michele Do Cormo, 2015).

De los 700 o más virus vegetales, se conoce, o se sospecha, que alrededor del 70% pueden ser transmitidos por artrópodos, nemátodos o vectores fúngicos. El 95% de las más de 380 especies de animales citadas como vectores de virosis vegetales son artrópodos. Entre estos más del 75% corresponden a insectos del orden Hemiptera destacando las familias *Aphididae* (pulgones) y *Aleyrodidae* (moscas blancas), *Delphacidae* (delfácidos) y *Cicadellidae* (cicadélidos). Dado que estos grupos tienen partes bucales chupadoras que penetran las células y los tejidos de las hojas, son ideales para transmitir virus de plantas enfermas a plantas sanas. Aproximadamente el 50% de los virus transmitidos por artrópodos son transmitidos por áfidos y aproximadamente el 30% por moscas blancas (Katis et al, 2007).

Entre estos vectores, los pulgones son el grupo más importantes, transmitiendo muchos más virus que las moscas blancas, los delfácidos y los cicadélidos (Figura 1). Se sabe con certeza que, de las más de 4700 especies de pulgones descritas, 190 son capaces de transmitir virus vegetales, con muchas especies capaces de transmitir más de un virus. La mayoría de los pulgones vectores de virus vegetales pertenecen a los géneros *Myzus*, *Aphis*, *Acyrtosiphon*, y *Macrosiphum*, dentro de la subfamilia *Aphidinae*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el potencial número de pulgones vectores de virus vegetales es probablemente mucho más grande ya que, solo una pequeña porción de especies de pulgones ha sido probada como vectores de virus (aproximadamente 300) (Katis et al, 2007).

El 50 % de los virus de plantas pueden ser transmitidas por insectos. Muchos de estos virus causan enfermedades de mayor importancia económica en cultivos como los cereales, patatas y remolacha azucarera (Katis et al, 2007).

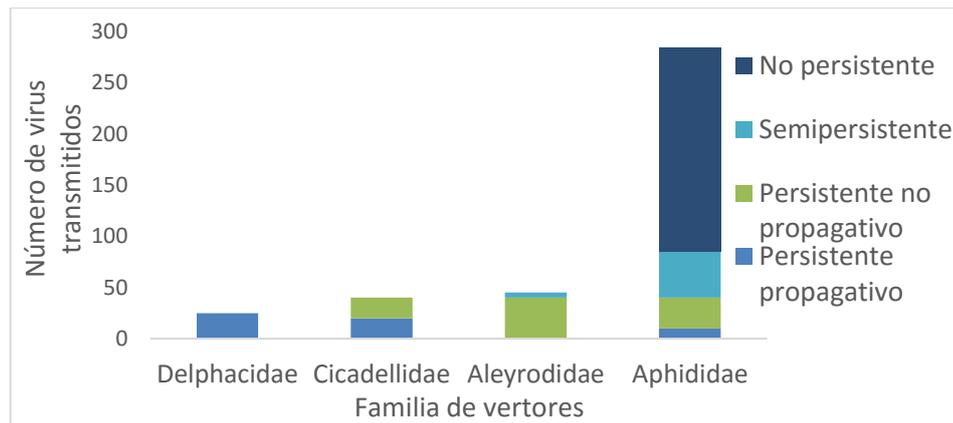


Figura 2. Cantidad de virus transmitido por las cuatro principales familias de vectores homópteros, dividido en las cuatro categorías de transmisión (Nault, 1997).

1.2 LOS PULGONES Y SU PAPEL COMO TRANSMISORES DE VIRUS

“Pulgón” o “áfido” son los nombres comunes empleados para denominar aquellos insectos que pertenecen a la superfamilia *Aphidoidea*, dentro del orden Hemiptera. Prácticamente no hay ninguna parte de las plantas terrestres que este insecto no pueda atacar, ya se encuentre ésta por encima, o por debajo de la tierra. Estos, incluso pueden alimentarse de la corteza. La razón radica en las sorprendentes características biológicas que estos diminutos insectos han desarrollado para maximizar su rendimiento como insectos fitófagos. La combinación entre la alimentación específica y hábitos reproductivos hacen de los pulgones uno de los grupos de plagas económicamente más importantes en la agricultura (Guerrieri y Digilio, 2008). Su ciclo vital tiene una alternancia de fases anfígónicas y partenogenéticas. La elevada tasa de crecimiento poblacional de estas últimas fases, junto con la eficaz ingestión de saliva, son los principales factores que los convierten en plaga (Pineda, 2008)

En climas templados se consideran la plaga de insectos más importante, especialmente en aquellos casos en que su ataque está asociado con la transmisión de virus fitopatógenos (Guerrieri y Digilio, 2008). También hay ciertas características de los áfidos que los predisponen a ser vectores de virus efectivos. La selección del huésped y el comportamiento de alimentación son factores particularmente importantes en la epidemiología del virus, y el rango de huéspedes y las características del ciclo de vida de las especies de áfidos también son clave (Katis et al, 2007).

Los pulgones son, en general, insectos de cuerpo globoso con un tamaño comprendido entre 1 y 5 milímetros. No obstante, suelen presentar polimorfismo intraespecífico (diferentes formas dentro de una misma especie) (Lorenzo, 2008). Normalmente los pulgones no poseen alas, sin embargo, cuando el alimento escasea, pueden desarrollarlas para desplazarse a nuevas áreas. Así, distinguimos entre pulgones alados y ápteros (Jiménez, 2015). En las formas ápteras, en el cuerpo de los insectos se pueden diferenciar claramente tres regiones: cabera, tórax y abdomen. Por otro lado, en los pulgones con alas, las regiones de la cabeza y el tórax están fusionadas (Lorenzo, 2008).

En la cabeza del pulgón se encuentran las antenas, insertadas directamente en la frente o sobre tubérculos antenales. Dichas antenas se componen de entre 3 y 6 artejos (Jiménez, 2015). Además

de los dos ojos compuestos que se observan en la cabeza de los pulgones ápteros, las formas aladas poseen 3 ocelos (Lorenzo, 2008).

Los pulgones son insectos fitófagos que se alimentan de la savia de las plantas. Tiene un tipo de alimentación muy especializada gracias a que poseen un aparato bucal en forma de estilete. La función del estilete es perforar la epidermis vegetal permitiendo así el acceso a la savia y posteriormente absorber los jugos celulares (Figura 3). Por lo tanto, los pulgones poseen un aparato bucal picador-succionador (Lorenzo, 2008).

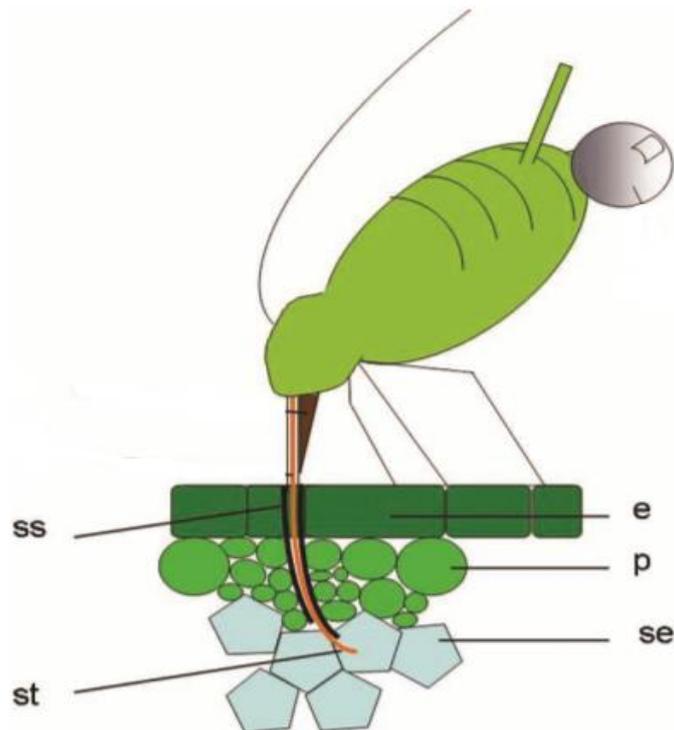


Figura 3. Representación esquemática de un pulgón alimentándose: (e): epidermis vegetal; (p): parénquima vegetal; (se): jugos celulares; (ss): estilete; (st): punta del estilete (Guerrieri y Digilio, 2008).

Tienen 6 patas alargadas insertadas en el tórax que les confiere la capacidad de desplazarse y en algunos casos, hasta de saltar. Cabe destacar que dichas patas son funcionales durante todo el ciclo biológico del insecto. En el caso de los pulgones alados, en el tórax encontramos además 2 pares de alas membranosas y transparentes (Llorens Climent, 1990).

En el abdomen de los pulgones sobresalen dos tubos llamados sifones o cornículos. Su función es la emisión de hemolinfa, una sustancia volátil de defensa. En caso de peligro, el pulgón emite, a través de los sifones, un líquido que se solidifica rápidamente en contacto con el aire, recubriendo y paralizando al enemigo, y avisando de su presencia a los demás miembros de la colonia. En la parte terminal de esta región también encontramos la vulva y el ano, además de una prolongación conocida como cauda (Llorens Climent, 1990).

Por lo común, los pulgones se alimentan del contenido de los tejidos vasculares (generalmente del floema) de los órganos tiernos de la planta, y suelen situarse en el envés de la hoja. Según si el

pulgón se puede alimentar de una sola especie vegetal o de varias, se clasifican en monófagos y polífagos, respectivamente (Llorens Climent, 1990).

Las formas aladas de los pulgones son capaces de desplazarse extensas distancias por el aire. A parte de estos vuelos migratorios, también se trasladan a cortas distancias sobre el cultivo o entre planta y planta (Lorenzo, 2008). Los pulgones migratorios seleccionan la planta a hospedar atendiendo a una gran variedad de estímulos sensoriales. Antes de aterrizar, los pulgones localizan el material vegetal respondiendo principalmente a estímulos de color. En esta primera etapa de selección también juegan un papel importante los estímulos químicos (Katis et al, 2007).

Pero el reconocimiento del huésped sigue incluso después de que el pulgón se haya posado sobre la planta. Antes de la inserción del estilete, y justo después del aterrizaje, el pulgón procede a realizar un reconocimiento mecánico y olfativo de la superficie de la planta. Sin embargo, e independientemente de si existen o no señales repelentes o disuasorias los pulgones, como respuesta al contacto con cualquier superficie sólida, tienen el reflejo de realizar pruebas cortas y superficiales sobre las células de la epidermis de la planta con el estilete (Katis et al, 2007).

Esta propensión de los pulgones a aterrizar sobre superficies verde e iniciar un comportamiento de sondeo explica la extraordinaria capacidad de estos insectos de transmitir virus vegetales.

La gran importancia como plaga de los afídidos recae, en parte, en su gran potencial biótico. Esta característica viene definida por su capacidad de reproducción mediante viviparidad y partenogénesis. (Lorenzo, 2016). En la reproducción mediante partenogénesis, todos los individuos de la colonia son capaces de procrear sin la necesidad de machos debido a que las larvas poseen huevos en formación desde su nacimiento. En la viviparidad las pulgonas adultas paren larvas sin que el huevo maduro fuera de la madre (Jiménez, 2015).

De esta especie es destacable su polimorfismo. En caso de producirse una superpoblación o una escasez de alimento, los pulgones desarrollan una hormona específica que les proporciona la capacidad de desarrollar alas para trasladarse a nuevas áreas y así aumentar su calidad de vida (Jiménez, 2015).

Ambas cualidades definen a los pulgones como comunidades con estrategias reproductivas tipo "r", lo que se manifiesta con un gran incremento de las poblaciones cuando le son propicias las condiciones del medio (Lorenzo, 2016).

Los pulgones presentan diferentes tipos de ciclos biológicos determinados por la vinculación con las plantas hospedadoras y por la alternancia entre generaciones sexuales y partenogenéticas. Las especies monoicas completan todo su ciclo vital sin cambiar de planta hospedadora. Aunque sí que pueden producirse dispersiones ninguna generación de esa especie se ve obligada a migrar a otra especie vegetal. Cuando la migración es necesaria para que se complete el ciclo se habla de ciclo dioico. Por otro lado, dependiendo de si existe o no generación anfigónica, podemos hablar de ciclos holociclos y anholociclos. En los ciclos holociclos existe generación anfigónica, tratándose por tanto de ciclos completos. Por el contrario, los ciclos anholociclos carecen de generación anfigónica (Lorenzo, 2016).

1.3. EL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (*Cucumber mosaic virus*, CMV)

El CMV (*Cucumber mosaic virus*), también llamado virus del mosaico del pepino es el miembro tipo del género *Cucumovirus*, de la familia *Bromoviridae* (Muñoz, 2008).

La familia *Bromoviridae* es una de las familias más importantes de virus vegetales, con miembros distribuidos por todo el mundo (Guiu, 2014). Dentro de la familia *Bromoviridae* se distinguen seis géneros (Tabla 1).

Tabla 1. Géneros de la familia *Bromoviridae* con su especie tipo (Guiu, 2014).

Familia <i>Bromoviridae</i>	
Género	Especie tipo
<i>Alfavirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)
<i>Anulavirus</i>	<i>Pelargonium zonale spot virus</i> (PZSV)
<i>Bromovirus</i>	<i>Brome mosaic virus</i> (BMV)
<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)
<i>Ilarvirus</i>	<i>Tobacco streak virus</i> (TSV)
<i>Oleavirus</i>	<i>Olive latent virus 2</i> (OLV-2)

El género *Cucumovirus* se desglosa en cuatro especies: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Peanut stunt virus* (PSV) *Tomato aspermy virus* (TAV) y el recientemente descrito *Gayfeather mild mottle virus* (GMMV). El miembro tipo del género es el CMV. A diferencia de este, la resta de miembros del grupo de los cucumovirus presenta un rango de hospedadores bastante reducido. CMV tiene un rango de huéspedes extremadamente amplio, que infecta 85 familias de plantas distintas y hasta 1000 especies experimentalmente. Las otras especies de cucumovirus tienen rangos de hospedadores más estrechos; El PSV se limita en gran medida a leguminosas y hospedadores solanáceos, y el TAV infecta predominantemente compuestos y plantas solanáceas. Todas las especies son transmitidas por los áfidos de manera no persistente (Guiu, 2014)

El CMV fue detectado por primera vez en 1916 en cultivos de pepino y melón en Estados Unidos (Guiu, 2014). Desde entonces se ha reportado su presencia en numerosos países de todo el mundo, tanto en zonas templadas como tropicales, convirtiéndose en uno de los virus de plantas con distribución geográfica más amplia (El-Borollosy, 2015). Particularmente en España, el virus ha sido citado en prácticamente todas las provincias. Es el virus con mayor rango de huéspedes infectando a más de 1300 especies vegetales pertenecientes a más de 100 familias botánicas distintas (monocotiledóneas y dicotiledóneas), lista a la que se añaden nuevas especies cada año (Buitrón y Morillo, 2017). Afecta principalmente a Crucíferas, Solanáceas, Compuestas, Papilionáceas y Cucurbitáceas, convirtiéndose así en el primer causante de pérdidas económicas en hortalizas y ornamentales cultivadas al aire libre (De Blas, 1993).

El síntoma más común inducido por el CMV es el cambio cromático en hojas y frutos (mosaico amarillo y verde). La infección por CMV también causa deformación en las hojas, enanismo en

plantas, y en algunos casos, hasta necrosis (Figura 4). En general, la sintomatología depende las condiciones climáticas, la presencia o no de ARN satélite, del aislado viral de la planta huésped y de las coinfecciones con otros virus. Es por esto, que la enfermedad puede no mostrar síntomas en algunos cultivos o puede causar la muerte de la planta huésped (Muñoz, 2008).

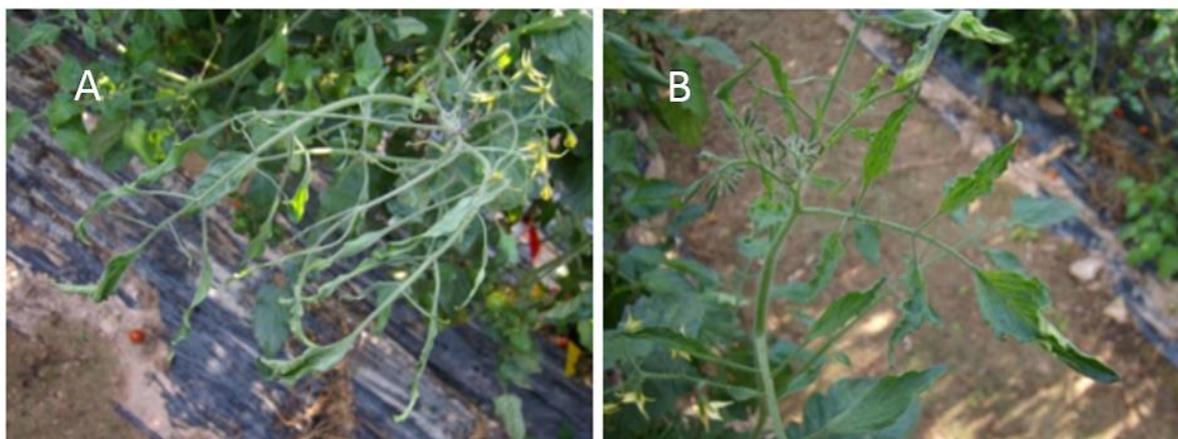


Figura 4. Hojas de tomate con filiformismo (A) y mosaico foliar (B), síntomas característicos de CMV en tomate (fotos propias).

Entre los mecanismos de transmisión del CMV destacan la infección a través de polen, por contacto, mediante plantas parásitas y, en algunas especies de plantas, por medio de semilla. En condiciones experimentales, la transmisión mecánica del virus resulta eficaz (Muñoz, 2008).

Además de los mecanismos citados anteriormente, cabe destacar que, en condiciones naturales, el CMV también es transmitido por varias especies de pulgones. Aunque hay más de 80 especies de pulgones vectores de CMV, *Aphis gossypii* y *Myzus persicae* son las dos especies más eficientes (Muñoz, 2008).

La transmisión vectorial de CMV tiene lugar de forma no persistente. A causa de ello, el vector solo puede transmitir el virus a corta distancia. En este caso, y a diferencia de lo que ocurren en la transmisión persistente, el virus únicamente se mantiene viable en las partes bucales del áfido por unas pocas horas (Muñoz, 2008).

La eficiencia de la transmisión se ve afectada por varios factores, tales como la cepa del virus, la especie de pulgón, la acumulación de partículas virales en la hoja de origen y la presencia de satélites de ARN (Pinto, 2008).

1.4 CONTROL DEL CMV

La mayoría de los virus vegetales transmitidos por pulgones se inoculan de forma no persistente y entre ellos el CMV. Los virus transmitidos de esta manera son muy difíciles de manejar por varias razones. Por un lado, el elevado número de especies de pulgones que pueden transmitir virus de forma no persistente dificultan las medidas de control. Por otra parte, una significativa cantidad de virus se propaga cuando los pulgones se mueven a través de los cultivos, buscando hospedadores atractivos. Durante este proceso, el pulgón tiene a realizar pruebas cortas con el estilete. Aunque el pulgón no se asiente o colonice el cultivo en cuestión, sí que lo infecta. De esta

manera, y a pesar de su eficiencia como portadores de virus, su presencia permanece generalmente sin detectar (Persley y Gambley, 2010).

Además, a pesar de la amplia gama de insecticidas disponible, no suelen ser eficaces en estos casos. Esto es debido a que el virus puede propagarse de una planta a otra en menos de un minuto, tiempo mucho menor al que requiere el insecticida para actuar. Por lo que, y aunque el pulgón sea eliminado por el insecticida, este seguramente ya habrá propagado una considerable cantidad de virus. Lo que es más, la presencia de insecticida en las hojas pueden inducir inquietud en los insectos, acelerando el movimiento de una planta a otra, lo que aumenta la transmisión del virus (Ferreles, 2015)

El control directo de las enfermedades virales no es posible y una vez infectadas por un virus, las plantas ya no pueden ser curadas. Por tanto, el control de la enfermedad se basa en prevenir o retrasar la infección y minimizar las pérdidas económicas en la medida de lo posible. En general, la adopción de un único método de control suele ser insuficiente, por lo que para un control efectivo es necesaria la integración de diferentes estrategias (Persley y Gambley, 2010).

Una manera de combatir las enfermedades virales, sobre todo aquellas causadas por virus no persistentes, es mediante el uso de cultivares resistentes o tolerantes al virus y/o a los vectores. Por ejemplo, se ha incorporado en los cultivares comerciales de melón la resistencia al CMV y al PRSV (Katis et al, 2007). Sin embargo, solo se dispone de fuentes de resistencia y de variedades resistentes de virus en unos pocos cultivos, y en muchos casos la resistencia se limita a determinadas cepas virales (Muñoz, 2008). Por otro lado, la resistencia a una o pocas especies de áfidos puede no impedir la transmisión de virus no persistentes, ya que los áfidos no colonizadores también los transmiten. Así genotipos de melón (*Cucurbita pepo*) resistentes a *A. gossypii*, siendo este un vector eficiente de PRSV, WMV y ZYMV, muestran resistencia a estos virus si *A. gossypii* es su vector principal pero no están protegidos contra ellos si otros pulgones vectores están involucrados (Katis et al, 2007).

Es importante evitar focos tempranos de infección, ya que, a partir de estos la diseminación secundaria a través de pulgones también ocurre en una etapa muy temprana del crecimiento de los cultivos, justo cuando las plantas están más susceptibles a la infección. Para ello es imprescindible el uso de semillas y órganos de propagación libres de virus. Los programas de certificación de semillas son una herramienta de gestión fundamental para el control de los virus (Persley y Gambley, 2010).

En esta fase inicial en la que el cultivo está especialmente susceptible, evitar las poblaciones altas de pulgones, puede disminuir considerablemente la incidencia del virus. Esto se puede conseguir mediante la manipulación de las fechas de siembra. Por ejemplo, la infección por BYDV de cultivos de cereales sembrados en otoño se puede evitar retrasando la siembra. También se podría conseguir esta reducción cultivando en zonas aisladas, rodeadas de campos desnudos y con condiciones climáticas desfavorables para los cultivos. Sin embargo, estas prácticas no son posibles en el caso de todos los cultivos (Katis et al, 2007).

La erradicación de malas hierbas puede contribuir a la prevención o eliminación de la infección ya que sirven tanto como reservorios de virus vegetales como de huéspedes para sus insectos vectores. Sin embargo, el control de malezas puede ser costoso y solo detendrá la propagación a corto plazo (Katis et al, 2007).

En algunos cultivos herbáceos anuales, la eliminación de plantas tan pronto como aparezcan los síntomas de infección, y a ser posible, antes de que lleguen los pulgones, ha conseguido controlar la propagación de algunas enfermedades víricas. No obstante, este enfoque se ha aplicado más ampliamente y con más éxito en cultivos leñosos perennes (Katis et al, 2007).

Además de la eliminación de fuentes de infección en y alrededor del cultivo y de los restos de plantas de una campaña anterior, es necesario el aislamiento de cultivos en el tiempo y / o en el espacio de fuentes de virus para una reducción útil de su incidencia. Estas operaciones reducirán el número de insectos virulíferos que llegan al cultivo.

La propagación de virus vegetales también puede verse afectada por la densidad de las plantas. Hay evidencias de que poblaciones más densas en los cultivos disminuyen la incidencia de algunas enfermedades virales, así como las poblaciones de pulgones. Sin embargo, conseguir una elevada densidad de plantas es costosa y además disminuye el rendimiento del cultivo. Se recomienda que la tasa de siembra alcance la cobertura del suelo completa lo antes posible sin reducir el rendimiento debido a la competencia (Katis et al, 2007).

Aunque el control biológico se ha empleado como estrategia alternativa para el control de pulgones, su efecto sobre la propagación de virus no está aún del todo claro. En un principio, se cree que los parasitoides tienen poco efecto sobre la transmisión y propagación del virus. Por otro lado, en algunos casos concretos los pulgones parasitados fueron incluso más eficientes en la transmisión del virus. Además, el parasitismo, al igual que la presencia de insecticidas, también puede causar un aumento en el movimiento del pulgón y tal vez exacerbar la propagación del virus en el campo (Katis et al, 2007).

Existe la posibilidad de utilizar diferentes coberturas para disuadir a los pulgones de aterrizar en cultivos susceptibles a virus. Los insectos, y, por lo tanto, los pulgones, son repelidos por las superficies reflectantes. Para ello, se han usado superficies reflectantes metálicas, cubiertas de paja o películas formadas por partículas de caolín. Otra forma de interferir con el aterrizaje vectorial es usando barreras físicas. Las redes a prueba de insectos o las de camuflaje reducen en gran medida el aterrizaje de insectos y también la infección por virus. Una de las formas más efectivas de interferir con el aterrizaje y la navegación de vectores es el uso de plásticos y redes que absorben los rayos UV. Las láminas y redes de polietileno que absorben la luz ultravioleta interfieren con la visión del insecto y, en consecuencia, reducen en gran medida la incidencia del virus. A pesar de ello, el uso de coberturas coloreadas o reflectantes tiene limitaciones. Su efectividad se reduce a medida que las plantas de cultivo crecen y cubren las coberturas. La colocación y la eliminación aumentan el coste del cultivo, y las coberturas no son efectivas en tiempo nublado. Por lo tanto, la práctica solo es económicamente justificable en cultivos de alto valor o en colecciones de germoplasma, e incluso en estos casos, solo como parte de un programa de control integrado (Katis et al, 2007).

Entre las prácticas culturales empleada para reducir o eliminar la propagación de virus no persistentes destaca el uso de cultivos como barreras. Son plantas secundarias que crecen dentro o que limitan con un cultivo comercial primario con el fin de protegerlo de enfermedades virales transmitidas por insectos. Con la mayoría de virus no persistentes, los pulgones empiezan a perder su capacidad de infectar inmediatamente después de adquirir el virus y se volverán no infectivos en cuestión de minutos mientras se alimentan. Además, cuando los áfidos buscan una planta huésped, generalmente pierden su capacidad de transmitir un virus después de realizar unas breves pruebas en una planta protectora sana o no susceptible. Si posteriormente, los pulgones se alimentan de un

cultivo comercial susceptible, no habrá oportunidad para la transmisión del virus, ya que las partículas del virus se habrán eliminado de la boca mientras se sondea la planta protectora. Estas plantas protectoras también actúan como barreras físicas reduciendo el número total de pulgones que entran en el cultivo. Usar plantas protectoras o cultivos de barrera es una técnica cultural que se integra perfectamente en la filosofía de la agricultura sostenible (Hooks, 2007).

En vista del impacto negativo de los insecticidas sintéticos en la salud humana y en el medio ambiente, y a que el control biológico, aunque más deseable, no es capaz de controlar muchas de las plagas debido a su alta tasa reproductiva y otros factores, ha surgido la necesidad de incorporar nuevas técnicas de control. Así han aparecido estudios que implicaban la posibilidad del uso de sustancias oleosas en la protección contra virus vegetales.

Se ha demostrado que la aplicación de aceites minerales o vegetales puede ser una forma muy efectiva de protección contra virus no persistentes. Actualmente, los aceites minerales se aplican comúnmente para la protección de cultivos de patata en muchos países europeos, incluso en Polonia, donde se usa cada vez más en el caso de cultivares susceptibles a PVY (Wróbel, 2014).

Los aceites tienen diferentes efectos sobre los insectos. Por una parte, su repelencia evita que los pulgones se asienten sobre el cultivo. Pueden bloquear los espiráculos a través de los cuales respiran, provocando su muerte por asfixia. En algunos casos los aceites también pueden actuar como sustancias tóxicas, interactuando con los ácidos grasos de los insectos e interfiriendo con su metabolismo normal. Pero la característica más importante y particularmente relacionada con la transmisión no persistente de virus es que pueden alterar la forma en la que se alimentan los pulgones, ya que pueden cubrir las partes de la boca que impiden la alimentación o transmisión de virus (El-Borollosy, 2015).

Estas sustancias tienen la ventaja de tener menos efecto fitotóxico tanto para las personas como para los enemigos naturales de las plagas de insectos. Además, dejan poco residuo ya que se disipan rápidamente a través de la evaporación. Esto permite que los aceites se integren bien con los métodos empleados en el control biológico. Por otra parte, los aceites minerales son fáciles de aplicar con los equipos de pulverización ya existentes y para ampliar su rendimiento, se pueden mezclar con otros productos (Cranshaw y Baxendale, 2005).

Otro insecticida natural con efectos similares es la tierra de diatomeas (Figura 5), que hasta ahora se ha utilizado principalmente contra plagas de productos almacenados. La tierra de diatomeas es un depósito de algas fosilizadas, sedimentadas en mares y lagos desde hace más de 40 millones de años y que hoy en día se encuentran como minúsculas partículas silíceas en minas a campo abierto (Vargas y Salazar, 2013). La tierra de diatomeas actúa destruyendo la cutícula a través de la absorción de grasa (Ulrichs et al., 2001). Los diminutos fragmentos, que son huecos y portadores de carga eléctrica negativa, taladran los cuerpos de los insectos de sangre fría provocándoles la muerte por deshidratación. Por lo tanto, su acción insecticida es estrictamente físico-mecánica, factor que no presenta el problema de resistencia que con el uso continuo se expresa en los pesticidas químicos. (Vargas y Salazar, 2013). En conclusión, es un polvo inerte, libre de residuos con efectos a largo plazo y es selectivo contra los artrópodos. También se ha demostrado la posibilidad de usar tierra de diatomeas contra pulgones (Ulrichs et al., 2001). Otro aspecto importante a destacar es que la tierra de diatomeas, además de su acción insecticida, aporta nutrientes (Vargas y Salazar, 20).

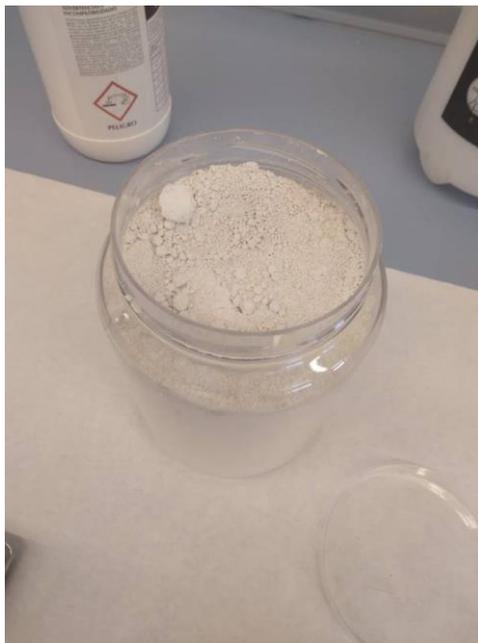


Figura 5. Tierra de diatomeas (foto propia).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los virus transmitidos por pulgones de manera no persistente representan una de las amenazas más peligrosas y difíciles de controlar causando grandes pérdidas en muchos cultivos por todo el mundo. El CMV es el virus con mayor rango de huéspedes y uno de los virus de plantas con distribución geográfica más amplia, siendo el primer causante de pérdidas económicas en hortalizas y ornamentales al aire libre. El control directo de las enfermedades virales no es posible y los insecticidas sintéticos no evitan esta transmisión rápida (no persistente) del virus, aunque puedan matar los pulgones y además tienen un impacto negativo en la salud humana y en el medio ambiente.

Con la intención de avanzar en el diseño de estrategias basadas en el uso de recursos naturales para la gestión de virus y sus vectores en cultivos hortalizas se han establecido en el presente trabajo final de grado los siguientes objetivos

1. Detectar virus vegetales que podemos encontrar en determinados cultivos hortalizas en una finca dedicada a la horticultura ecológica en el municipio de Alcàsser, Valencia.
2. Determinar la eficacia de *Macrosiphum euphorbiae* como transmisor de CMV.
3. Comprobar la eficacia del producto natural “tierra de diatomeas” para el control del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) transmitido por el pulgón *Macrosiphum euphorbiae* de modo no persistente en plantas de berenjena (*Solanum melongena*).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 TRABAJO DE CAMPO

Los diferentes muestreos para detectar virus vegetales en cultivos hortícolas y la presencia de pulgones, tuvieron lugar en la finca dedicada a la horticultura ecológica de la empresa SAIFRESC. Dicha finca se sitúa al norte del municipio de Alcàsser, en la Comarca de l’Horta Sud, a 13 Km aproximadamente del sur de Valencia.

La finca consta de una superficie total de 13,48 hectáreas, repartidas en 24 parcelas, ocupadas en su mayoría por cultivos hortícolas destinados al comercio local de verduras y hortalizas. En dicha finca se aplica una agricultura tradicional, recuperando variedades locales, empleando fertilización orgánica, así como productos fitosanitarios autorizados en agricultura ecológica.

A lo largo del año se realizan rotaciones en una misma parcela. Así mismo, para evitar desequilibrios en el suelo, dichas rotaciones se llevan a cabo con cultivos con requerimientos del suelo diferentes (humedad, cantidad de nutrientes, etc.)

Una vez situados en el plano de la finca y conocidos los diferentes cultivos existentes en cada parcela se procede a realizar los muestreos. De la totalidad de la plantación existente en la finca se toma la decisión de centrar los análisis en 5 cultivos concretos: tomate (*Solanum lycopersicum*), berenjena (*Solanum melongena*), pepino (*Cucumis sativus*), calabacín (*Cucurbita pepo*) y pimiento (*Capsicum annum*) (Figura 6).



Figura 6. Plano de las 24 parcelas que componen la finca dedicada a la horticultura ecológica de la empresa SAIFRESC y localización de las parcelas muestreadas.

Se hicieron dos muestreos con un mes de diferencia entre cada uno. El primer muestreo se hizo en la primera semana de Abril y el segundo en la primera de Mayo de 2018, ya que los pulgones presentan su mayor actividad en primavera. Cada muestreo se llevó a cabo en campo, observando particularmente cada una de las plantas de los cultivos seleccionados, buscando la presencia de pulgones o de síntomas que indicaran la acción del vector. Durante el análisis individual de cada planta, también se buscaron síntomas de posibles infecciones víricas. Si al examinar una planta se identificaba la presencia de síntomas indicadores de algún virus, se procedía a tomar una muestra para su posterior análisis en laboratorio. Para ello se recolecta con cuidado una porción del material vegetal, depositándolo en una bolsa de plástico. Síntomas diferentes de plantas distintas se ubicaron en bolsas distintas, rotulando cada una para su correcta identificación. Se evitó dar golpes a la muestra, así como su exposición directa y por un tiempo prolongado de los rayos solares. Es importante no recolectar en estado avanzado de descomposición o secas (muestras no representativas) (Figura 7). Se tomaron 8 muestras de tomate y 8 de pepino con síntomas causados de posiblemente por algún virus vegetales.



Figura 7. Recolección e identificación de una muestra en una planta de tomate con aparentes síntomas de ToMV (virus del mosaico del tomate).

En cuanto al cultivo de tomate, existen en la finca tres variedades distintas: tomate Pera, tomate “Cherry” y tomate Valenciano. Se distribuyen en la parcela en 5 dobles filas, con un total de 273 plantas en cada hilera, tal y como se muestra en la figura 8. Respecto al cultivo de pepino, se reparte en 4 filas en total, con 100 plantas en cada línea.

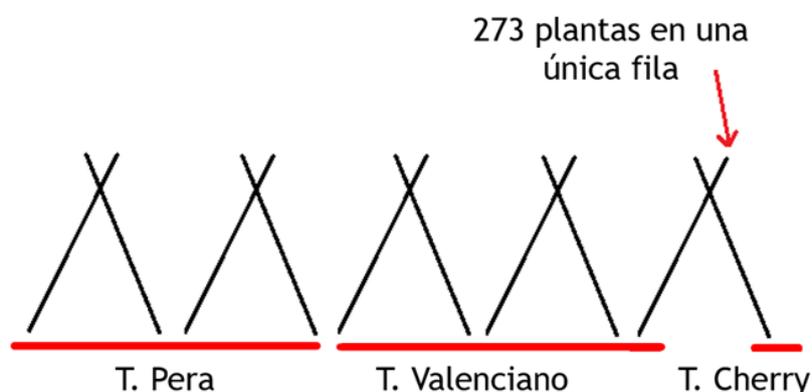


Figura 8. Orden en la parcela de las diferentes variedades de tomate de la finca SAIFRESC.

3.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Una vez recogidas las muestras vegetales en campo, se trasladaron en una nevera portátil al laboratorio de Virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universitat Politècnica de València para su posterior análisis (Figura 9).



Figura 9. Muestras de los cultivos de tomate (A) y pepino (B) preparadas para su procesamiento en laboratorio y análisis.

El análisis se llevó a cabo a través de pruebas serológicas de inmunocromatografía de flujo lateral, basadas en la reacción antígeno anticuerpo comercializadas por Agdia Inc. USA Biogenetic (Agdia ImmunoStrip®) y Bioreba AG, Suiza (Agri Strip). Es un ensayo rápido que sirve para confirmar, en unos 10 minutos, la presencia o no de determinados patógenos en muestras vegetales sospechosas (Figura 10).

El procedimiento consiste en tomar una parte de la muestra de planta sintomática y colocarla en una bolsa de extracción. Es recomendable tomar las muestras, en caso de ser posible, de áreas de la planta jóvenes y que presenten claros síntomas de la enfermedad. A continuación, se añade tampón de extracción con una pipeta desechable. En algunos casos el tampón viene ya directamente en las bolsas de extracción (Agdia ImmunoStrip®). Sobre una superficie plana, y utilizando un homogeneizador manual, se homogeneiza la muestra. De dicho extracto se transfieren un total de 4 gotas a una cubeta desechable. Finalmente se inserta la tira con el extremo marcado para identificar la muestra en el extracto y se observa la formación de bandas de colores.

Por último, se procede a retirar las tiras reactivas del extracto y a interpretar los resultados. Con muestras que contienen una alta concentración de patógenos se obtienen tanto una línea de prueba fuerte como una línea de control fuerte. Una línea de prueba que parece más débil que la línea de control es típica para muestras con baja concentración de antígeno (patógeno). Si solo aparece la línea de control, no hay antígeno detectable presente en la muestra. Una línea de prueba muy débil observada ocasionalmente después de 10-15 minutos debe interpretarse como una reacción negativa. Si ni la línea de prueba ni la línea de control se hacen visibles, la prueba no es válida y debe repetirse con una tira nueva (Figura 11).



Figura 10. Prueba serológica de inmunocromatografía de flujo lateral Agri Strip (Bioreba AG, Suiza) Agdia ImmunoStrip® (Agdia, Inc. USA Biogenetic).

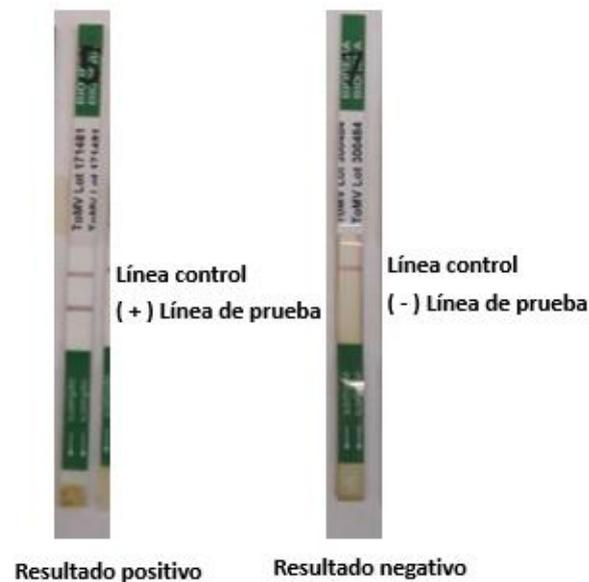


Figura 11. Interpretación de los resultados de la prueba serológica de inmunocromatografía de flujo lateral (BIOREBA AG, Suiza).

Atendiendo a los síntomas observados en el material vegetal recolectado en campo, se sospecha de la presencia de ciertos virus vegetales concretos. En cuanto al cultivo de tomate, los análisis se centraron en los siguientes virus: virus del mosaico del tomate (ToMV), virus del grabado del tabaco (TEV) y virus del mosaico del pepino (CMV). Por lo que corresponde al cultivo de pepino, los ensayos se dirigieron específicamente hacia estos virus: virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV), virus del mosaico verde jaspeado del pepino (CGMMV), virus del mosaico de la calabaza (SqMV) y el virus del mosaico del pepino dulce en tomate (PepMV).

3.3 CRÍA Y MANEJO DE PULGONES.

Los ensayos se realizaron con el pulgón verde de las solanáceas (*Macrosiphum euphorbiae*) procedente de los invernaderos de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) (Figura 12). La presencia de pulgones de esta misma especie, *Macrosiphum euphorbiae*, fue detectada en campo durante los muestreos. Las poblaciones recogidas se criaron en laboratorio y sobre estas crías se llevaron a cabo los distintos ensayos. La cría se mantuvo sobre plantas de berenjena (*Solanum melongena*) (Figura 13). Dichas plantas se dispusieron en el interior de unos “recipientes de cría” de confección propia. Los recipientes consistían en cajas de plástico transparente que permitían la entrada de luz con tapa de malla antitrips para facilitar la ventilación (Figura 14). Los recipientes de cría se mantuvieron en laboratorio en condiciones ambientales constantes.



Figura 12. Hoja de berenjena (*Solanum melongena*) con pulgones de la especie *Macrosiphum euphorbiae*.



Figura 13. Flor de berenjena (*Solanum melongena*) infestada con pulgones de la especie *Macrosiphum euphorbiae*.



Figura 14. Recipiente de cría de pulgones (*Macrosiphum euphorbiae*) en condiciones de laboratorio.

Para el mantenimiento de la cría de pulgones, las plantas se regaban dos o tres veces a la semana, según correspondiera. Si se observaba que la planta estaba en mal estado, a causa de una elevada población de pulgones, o por otras causas, se llevaba a cabo el traslado de dichos pulgones sobre una planta sana, y se eliminaba la planta enferma. El manejo de pulgones se hacía cuidadosamente y con ayuda de un pincel. Con el pelo del pincel se golpeaba ligeramente la cabeza del insecto provocando así que el pulgón, en caso de estar alimentándose, retirara el estilete insertado en los tejidos vegetales. El pulgón está quieto mientras se alimenta. Cuando el pulgón empezaba a moverse libremente sobre la planta, se consideraba seguro recogerlo y moverlo.

Aunque los recipientes de cría se mantuvieron en condiciones de laboratorio, la presencia de parasitoides fue inevitable. Los parasitoides adultos ponen los huevos dentro o sobre el cuerpo de los pulgones, de modo que sus larvas se alimentan a expensas de estos. Un pulgón parasitado recibe el nombre de momia (Figura 15). Aunque normalmente los parasitoides se emplean como método de control biológico en contra de las plagas de pulgones, en este caso, no eran deseados. Por eso, cada dos o tres días se inspeccionaban a fondo las plantas, eliminando todas las momias y parasitoides encontrados.



Figura 15. Hoja de berenjena (*Solanum melongena*) con parasitoides de pulgones, pulgones de la especie *Macrosiphum euphorbiae* sin parasitar y parasitados (momias).

3.4 ENSAYO: Eficacia de *Macrosiphum euphorbiae* como transmisor del CMV.

Para obtener individuos de *Macrosiphum euphorbiae* virulíferos (portadores del virus CMV) se seleccionaron pulgones de la cría disponible en el laboratorio y, ayudados, probaron libremente una planta fuente de virus.

La planta fuente de virus se consiguió a través de un proceso de Inoculación Mecánica Artificial (IMA) con CMV en laboratorio. La Inoculación Mecánica Artificial (IMA) consiste en poner en contacto el virus con células vegetales en las que se han producido microheridas en su pared celular con algún abrasivo para dejar la membrana plasmática accesible al virus en algunos puntos. El inóculo del virus puede ser obtenido de varias partes de la planta infectada, aunque preferiblemente tejido foliar ya que generalmente presenta un título viral, es decir, una mayor concentración de partículas virales que otros tejidos (Agrios, 1996).

El primer paso consiste en preparar la solución de inóculo y almacenar el preparado en nevera a 4 °C. La solución de inoculación se elaboró con Fosfato sódico-potásico pH a 7-7,2 (0,01 M), Bisulfito sódico (0, 2 %), Dietilcarbamato sódico (DIECA) (0,2 %) y agua destilada. El tampón fosfato sódico-potásico, a su vez se desarrolló mezclando 40 partes del Tampón I con 60 partes del Tampón II, ajustando el PH a 7-7,2 con los Tampones I (ácido) y II (básico). El tampón I respectivamente, se preparó disolviendo 13,61 g de KH_2PO_4 en 90 ml de agua destilada, manteniendo en agitación a una temperatura de 50 ° para evitar que precipite. Seguidamente se ajustó el pH a 4,9, con KOH y H_3PO_4 y se enrasó hasta un volumen final de 100 ml con agua destilada. Un procedimiento similar se siguió para preparar el Tampón II, solo que, en este caso, la disolución se hizo con 14,2 g de Na_2HPO_4 y el PH se ajustó a 9,6.

Posteriormente se homogeneizó en un mortero estéril material vegetal infectado con CMV (cedido por la Dra. Font) y se inocularon 10 plantas del cultivar tomate valenciano. Una vez homogeneizado se añadió solución de inóculo anteriormente preparada, fría en proporción 1:10 (g de material infectado/ml solución inóculo) (Figura 16). Para causar las microheridas en la pared celular se añadió una pequeña cantidad del abrasivo carborundo (carburo de silicio). Una vez bien homogeneizado el inóculo se moja una torula en el jugo homogeneizado y se frota la lámina foliar de las plantas a inocular (Figura 17).

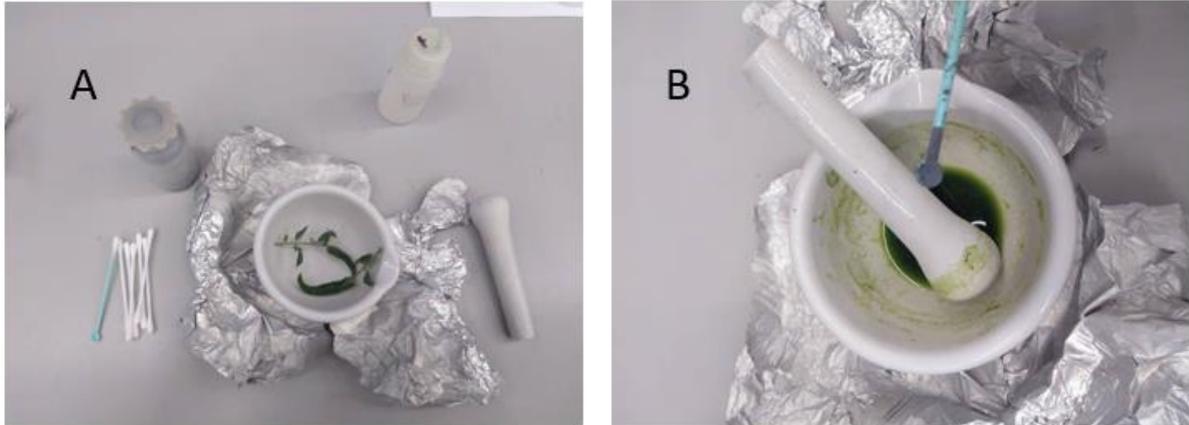


Figura 16. Material vegetal con el virus a inocular (CMV) sin homogeneizar (A) y una vez homogeneizado en un mortero estéril, con solución inóculo y carborundo añadido (B).



Figura 17. Inoculación mecánica artificial de una planta de tomate cv. valenciano (*Solanum lycopersicum*) con CMV en laboratorio.

Las plantas infectadas se mantuvieron en una cámara de cultivo o fitotrón del Laboratorio de Virología de IAM-UPV, con unas condiciones de temperatura de 25°C/ 18°C (día/noche), un fotoperiodo de 12 h y una humedad relativa del 60 %. Con el fin de asegurar la infección de CMV en las plantas que habían sido inoculadas se analizaron todas las plantas mediante la técnica DAS-ELISA. Para ello, transcurridos 30 días desde la inoculación, se procedió a la recogida de muestras tomando el foliolo terminal de la segunda hoja recién formada de cada planta en particular, guardándolas en bolsitas de plástico debidamente identificadas y almacenadas a 4°C hasta su posterior análisis (Figura 18).



Figura 18. Recogida de muestras tomando el foliolo terminal de la segunda hoja recién formada de cada planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) infectada, guardándola en una bolsa de plástico debidamente identificada.

La técnica serológica DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay o ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas*) se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, donde se detecta el antígeno, en este caso el virus a analizar, utilizando un anticuerpo específico de éste conjugado con el enzima fosfatasa alcalina (FA). Al añadir el sustrato específico (p-nitrofenilfosfato), se genera color en caso de producirse reacción enzima-sustrato, siendo cuantificable mediante un espectrofotómetro o colorímetro (Cambra *et al.*, 1996).

Los tampones de inoculación empleados para el E.L.I.S.A directo en la detección fueron los siguientes:

- Tampón de recubrimiento (coating buffer) pH 9,6: 0,186 g de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,296 g de NaHCO_3 y 100 ml de agua destilada.
- Tampón de lavado (wash buffer) pH 7,2-7,4: 8 g de NaCl , 0,2 g de Na_2HPO_4 , 0,2 g de KCl , 0,5 ml de Tween 20 y 11 ml de agua destilada.
- Tampón de extracción (sample extraction buffer) pH 7,4: 5 g de PVP, 0,5 g de BSA, 0,025 g de NaN_3 y 250 ml de Tampón de lavado.
- Tampón conjugado (conjugate buffer) pH 7,4: 2 g de PVP, 0,2 g de BSA, 0,01 g de NaN_3 y 100 ml de Tampón de lavado.
- Tampón sustrato (substrate buffer) pH 9,8: 9,7 ml de Dietanolamina, 0,02 g de $\text{MgCl}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 90,3 ml de agua destilada.

El primer paso consistió en diluir en antisuero (Ig) en tampón coating (recubrimiento) a la dilución que requiere el antisuero y mezclar bien. Seguidamente se tapizó la placa pipeteando 100 μ l/pocillo de la dilución anteriormente preparada. Para evitar el efecto borde durante la incubación de la placa, se pipeteó el mismo volumen de agua en los bordes de esta.

Poniendo dos placas usadas encima y debajo de la placa a analizar se incubó en nevera a 37 ° durante 3 horas. Una vez transcurrida la incubación con un golpe seco se vació la placa en la pila y se llevaron a cabo 4 lavados con tampón de lavado, siendo los dos primeros lavados rápidos, es decir, sin tiempo de espera entre los mismo. En cambio, en los dos últimos lavados se dejó actuar el tampón durante 3 minutos.

Previamente se machacaron las muestras por separado en el interior de una bolsa de plástico ELISA, cada una con su correspondiente etiqueta identificativa, añadiéndole tampón de extracción en una proporción 1:20 (peso/volumen) (Figura 19). De dicho extracto se añadieron 100 μ l por pocillo, aplicando la misma muestra en dos pocillos. Se añadieron también el positivo (material vegetal infectado por el virus a analizar), el negativo (material vegetal sano) y el blanco (tampón de lavado). Al igual que en el caso anterior, en los bordes de la placa se pipetearon el mismo volumen de agua para evitar el efecto borde. La placa a analizar se incubó durante 12 h en nevera a 4 °C, recubriéndola por abajo y por arriba por dos placas usada. Transcurrido el periodo de incubación se vació la placa con un golpe seco en la pila y se lavó 5 veces con tampón de lavado, dos rápidos y dejando actuar el tampón durante 3 minutos en los últimos lavados. Después de estos lavados, aun quedaron restos de extracto vegetal en los pocillos, por ello, se llevaron a cabo tantos lavados como fueron necesarios para para que queden completamente transparentes.



Figura 19. Muestras de material vegetal en bolsas de plástico ELISA (A) y durante el proceso de homogeneizado (B).

Posteriormente se prosigue a diluir el antisuero conjugado (Ig-AP) en tampón conjugado (conjugate) a la dilución que requiere el antisuero mezclando bien. Con dicha disolución se tapiza la placa (100 μ l/pocillo) y en los bordes se pipetea el mismo volumen de agua. La incubación se realiza a 37 °C durante 3 h. Luego se vacía la placa y se realizan 5 lavados (dos rápidos y dos dejando actuar el tampón de lavado durante 3 minutos). Una vez realizados los lavados se preparó una solución de p-nitrofenil fosfato a la concentración de 1 mg/ ml de tampón substrato. Para ello se calculó cuanto volumen se necesitaba para tapizar la placa y se pesó en la balanza de precisión la cantidad necesaria de p-nitrofenil fosfato. Una vez tapizada la placa con la solución, se tapó con una bandeja para protegerla de la luz y se mantuvo a temperatura ambiente.

Finalmente, transcurrido 1 hora se llevó a cabo la lectura de los resultados. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Titertek Multiskan MCC/340 a una longitud de onda de 405 nm. Se consideran resultados positivos aquellos cuyo valor de absorbancia sea igual o superior al doble del valor de la muestra control negativa. El espectrofotómetro está conectado a un ordenador que proporcionará los resultados gracias al software Ascent Software for Multiskan.

Una vez obtenidos los resultados, se seleccionaron las plantas positivas que servirían como fuente de virus para la obtención de *Macrosiphum Euphorbiae* virulíferos (portadores del virus CMV). Para ello, los pulgones obtenidos de la cría disponible en laboratorio se guardaron en placas Petri que posteriormente se sellaron con cinta Parafilm (Figura 20). Dichas placas se conservaron en nevera (sin congelar, a unos 8-10 °) durante 1 hora aproximadamente. Después de sacarlos de la nevera, con ayuda de un pincel, se colocaron cuidadosamente los pulgones sobre una hoja de la planta virosada. Gracias al aturdimiento provocado por las bajas temperaturas y a que los insectos estaban hambrientos por no haber comido durante tanto tiempo, las posibilidades de que se alimentasen y adquiriesen el virus eran mayores. Para evitar su desplazamiento, se sellaron tanto la hoja como los pulgones que sobre ella se alimentaban con ayuda de una placa Petri anteriormente modificada. La modificación consistía en un pequeño orificio que permitía el paso del peciolo de la hoja (pero no de los pulgones), evitando así su separación de la planta madre mientras duraba el proceso de alimentación (Figura 21). Los pulgones se alimentaron libremente durante 5 minutos de la planta fuente de virus.

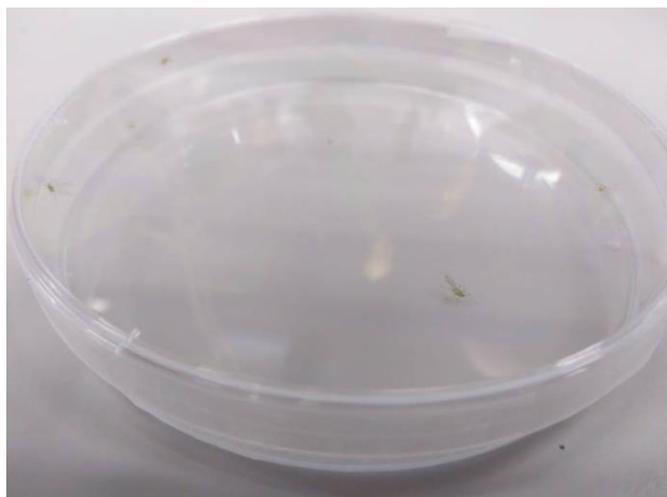


Figura 20. Placa Petri sellada con cinta Parafilm conteniendo en su interior ejemplares de *Macrosiphum euphorbiae* obtenidos de la cría disponible en laboratorio.

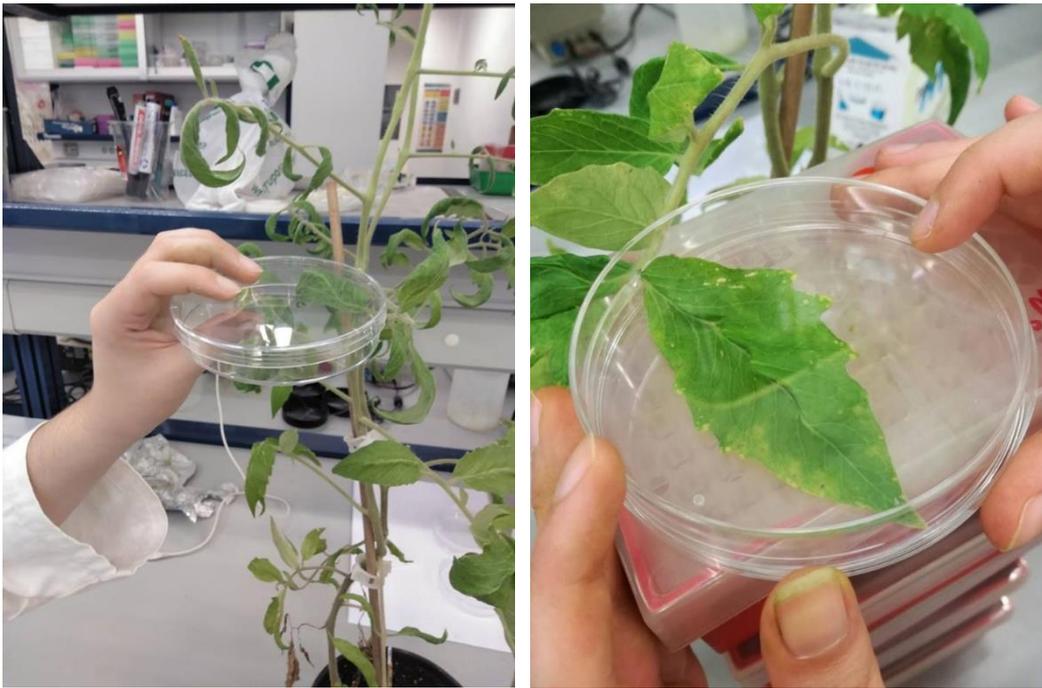


Figura 21. Ejemplares de *Macrosiphum euphorbiae* alimentándose libremente de una hoja de planta virosada con CMV, contenidos dentro de una placa Petri modificada.

A continuación, los pulgones virulíferos, con ayuda de un pincel, eran transferidos a plantas test y se les permitía probarlas durante 24 horas (Figura 21). Se emplearon 50 plantas test en estado de 2-4 hojas verdaderas y 3 pulgones virulíferos por planta. Finalmente fueron eliminados, a mano y con ayuda de un pincel. Dichas plantas se mantuvieron en el fitotrón del Laboratorio de Virología de IAM-UPV, en las mismas condiciones anteriormente explicadas.

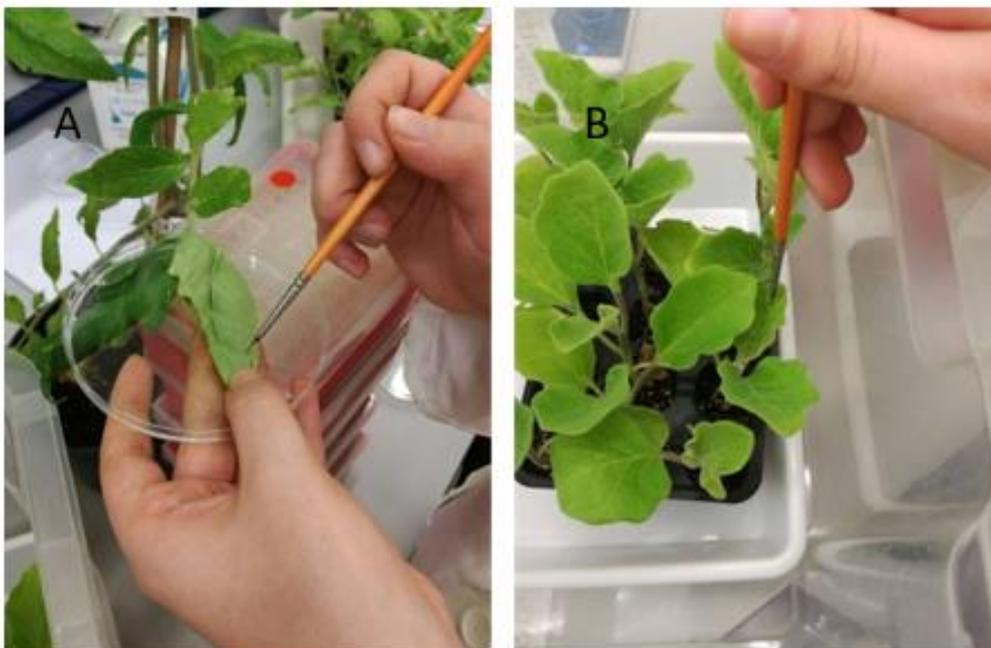


Figura 22. Transferencia de ejemplares de *Macrosiphum euphorbiae* virulíferos desde la planta virosada (A) a las plantas test (B).

Por último, para conocer el número total de plantas infectadas con CMV se analizaron mediante la técnica DAS-ELISA. Para la realización de la técnica DAS-ELISA se siguió el mismo protocolo anteriormente detallado.

La eficacia (%) de *Macrosiphum euphorbiae* como transmisor del CMV se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{N^{\circ} \text{ plantas infectadas}}{N^{\circ} \text{ plantas totales}} \right) \times 100 / \left(\frac{N^{\circ} \text{ pulgones}}{\text{planta}} \right)$$

3.5 ENSAYOS CON TIERRA DE DIATOMEAS.

En el presente estudio se evaluó el efecto del producto natural conocido como tierra de diatomeas contra el pulgón verde de las solanáceas (*Macrosiphum euphorbiae*). El pulgón polífago *Macrosiphum euphorbiae* es un importante vector del virus CMV. Transmite el virus de manera no persistente. Los experimentos se llevaron a cabo en uno de los laboratorios de la Unidad de Patología Vegetal en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Rural (UPV).

Se efectuaron un total de tres ensayos para finalmente determinar la actividad de repelencia o mortalidad que el producto causa sobre los pulgones.

3.5.1 Ensayo 1: Toxicidad de la tierra de diatomeas en aplicación directa sobre *Macrosiphum euphorbiae*.

La evaluación se llevó a cabo comparando la eficacia de la tierra de diatomeas con un producto insecticida comercial de efectividad ya comprobada. Para ello se seleccionaron pulgones de la cría en laboratorio y se colocaron sobre una serie de portaobjetos modificados de tal manera que los insectos se quedaran fijos sobre él y no pudieran desplazarse. En cada portaobjetos se disponía de 4 individuos (Figura 23).

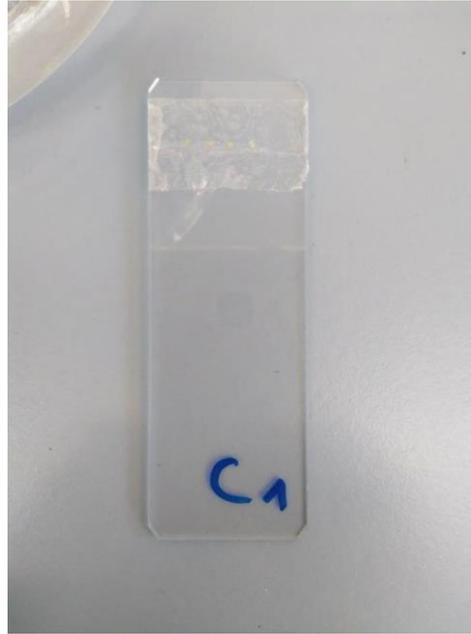


Figura 23. Portaobjetos modificado con cuatro pulgones de la especie *Macrosiphum euphorbiae* adheridos.

La sustancia objeto de evaluación se preparó en agua con la dosis requerida (2%). Una vez agitada la mezcla, se depositó en el interior de un frasco estéril. De igual manera se preparó el insecticida comercial, depositándolo en un segundo frasco. Un tercer frasco se llenó de agua. A continuación, los portaobjetos (4 por cada tratamiento), junto con los 4 pulgones adheridos a cada uno, fueron sumergidos en dichos frascos rellenos de sustancia durante unos segundos. Como resultado se obtuvieron tres grupos de cuatro placas cada uno: un grupo testigo o control sin ningún tratamiento insecticida, un grupo tratado con producto comercial de acción insecticida de eficacia comprobada y un grupo tratado con tierra de diatomeas. Las placas fueron depositadas sobre una grada y se mantuvieron en condiciones de laboratorio.

La supervivencia por tratamiento se determinó contando en cada portaobjeto el número de pulgones vivos y muertos pasada 1, 24, 48 y 72 horas. El recuento se llevó a cabo con ayuda de una lupa.

3.5.2 Ensayo 2: Eficacia de distintas dosis de tierra de diatomeas sobre *Macrosiphum euphorbiae*.

Se trataba de determinar si al incrementar la dosis el producto en prueba intensificaba su eficacia como insecticida. En el presente ensayo se usaron 3 dosis crecientes de tierra de diatomeas con un factor de 1/10 entre cada dosis. Concretamente las dosis evaluadas fueron las siguientes: 0,1% - 1% y 10 %.

El procedimiento empleado es similar al aplicado en el ensayo 1. La aplicación del producto se realizó mediante la inmersión de los portaobjetos modificados, ya con los cuatro pulgones fijados, en solución de producto en agua de concentración conocida durante unos segundos. Se realizaron 4 repeticiones por dosis. Al igual que en los anteriores ensayos, los insectos se extrajeron de la cría de pulgones en laboratorio. Tras el tratamiento, los portaobjetos se dejaron secar al aire libre sobre una grada, en condiciones de laboratorio (Figura 24).



Figura 24. Portaobjetos modificados con cuatro pulgones de la especie *Macrosiphum euphorbiae* fijados a cada uno, sobre una grada, una vez han sido sumergidos en solución de producto en agua de concentración conocida (cuatro repeticiones por dosis).

En cuanto a la evaluación, se efectuó mediante un recuento en cada portaobjetos y con ayuda de un microscopio del número de pulgones vivos y muertos pasadas 1, 24, 48 y 72 horas.

3.5.3 Ensayo 3: Repelencia de la tierra de diatomeas sobre *Macrosiphum euphorbiae*.

Se evaluó la respuesta de los pulgones expuestos simultáneamente a hojas tratadas con tierra de diatomeas y hojas no tratadas. Con ese fin, plantas de berenjena fueron pulverizadas hasta el punto de goteo con la sustancia de prueba ya preparada (con una dosis del 2 %) mojando bien tanto el haz como el envés de las hojas (Figura 25). Una vez secas fueron transferidas a unas cajas de plástico transparentes.



Figura 25. Pulverización de una planta de berenjena con una solución de tierra de diatomeas preparada al 2%.

En cada caja de plástico, además de la planta tratada también se colocaron una planta de berenjena infestada de pulgones y otra sin tratar (control), procurando que las hojas de las tres plantas se tocaran entre sí (Figura 26). De esta manera los pulgones podían moverse libremente entre las tres plantas. La planta plagada de pulgones se extrajo de la cría en laboratorio, ya que esta también se mantenía sobre plantas de berenjena. Se efectuaron un total de cinco repeticiones conservadas en condiciones de laboratorio.



Figura 26. Caja de plástico con tres plantas de berenjena: planta tratada con una solución de tierra de diatomeas preparada al 2 %; planta sin tratamiento (control) y una planta plagada de pulgones.

La evaluación se efectuó contando tanto en la planta tratada como en la planta testigo el número de pulgones que se habían desplazado desde la planta infestada. Cada recuento tuvo lugar pasadas 1, 24, 48 y 72 horas.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante el programa Statgraphics Centurion XVII (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA Simple) para cada variable, considerando como factor el tratamiento utilizado o la dosis empleada, según corresponda. Se siguió el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu_i + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Siendo Y_{ij} = variable independiente; μ_i = media general; α_i = tendencia de la concentración de AA al desviarse de la media global, según el factor al que pertenezca; ϵ_{ij} = error residual.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS TOMADAS EN CAMPO.

Los resultados del análisis de las 16 muestras de material vegetal recogidas en el municipio de Alcàsser, concretamente en la finca dedicada a la horticultura ecológica de la empresa SAIFRESC, 8 de ellas pertenecientes a cultivos de tomate y el resto a cultivos de pepino, mediante la técnica serológica de inmunocromatografía de flujo lateral se recogen en la tabla 3 y la tabla 4. Las muestras de tomate número 4, número 5 y número 6 resultaron positivas a la infección con ToMV (Figura 27). Los síntomas observados en las muestras positivas a ToMV fueron alteraciones de la forma y color de los folíolos, alternándose áreas cloróticas con otras de color verde normal y verde oscuro (mosaicos). La presencia de los restantes virus, TEV y CMV, no fue detectada (Figura 28). Por otra parte, no se encontró presencia de virus en ninguna de las muestras de pepino (Figura 29).



Figura 27. Resultados positivos a la infección con ToMV en las muestras N.º 4, N.º 5 y N.º 6 de tomate.

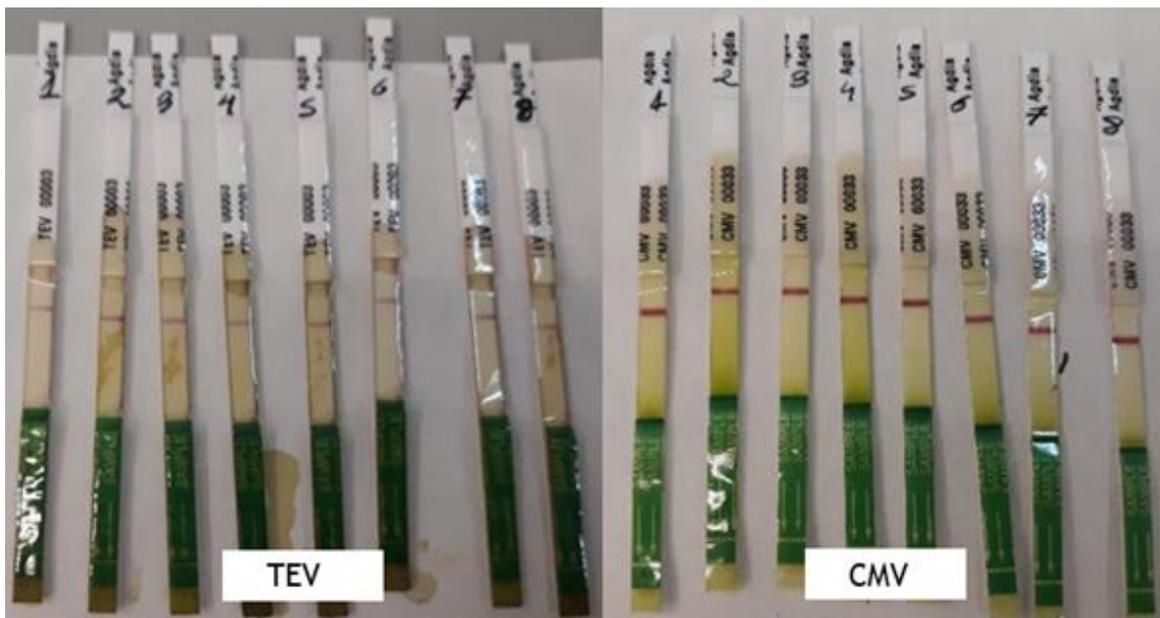


Figura 28. Resultados negativos a la infección con TEV y CMV en las muestras de tomate.

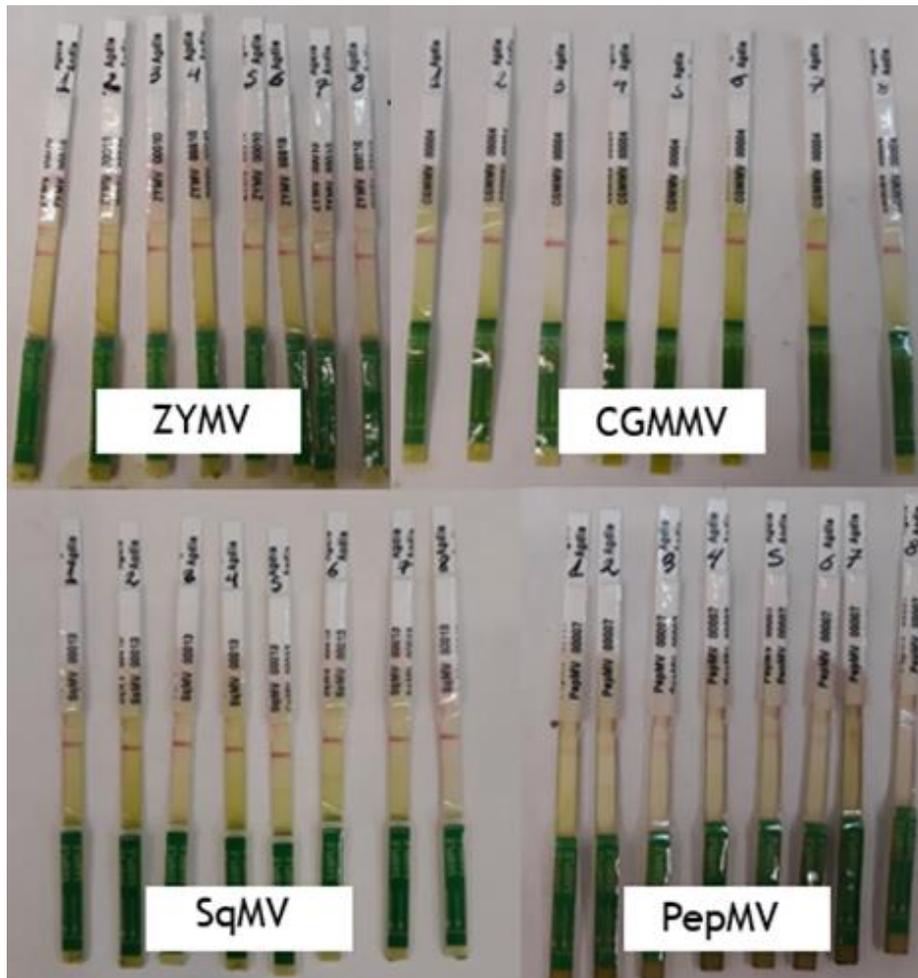


Figura 29. Resultados negativos a la infección con ZYMV, CGMMV y SqMV en las muestras de pepino. y PepMV en las muestras de tomate.

Tabla 2. Resultados obtenidos al analizar las muestras de tomate mediante la técnica serológica de inmunocromatografía de flujo lateral (BIOREBA AG, Suiza) para TEV, CMV, ToMV y PepMV.

MUESTRA TOMATE	RESULTADOS PRUEBA SEROLÓGICA DE INMUNOCROMATOGRAFÍA DE FLUJO LATERAL			
	TEV	CMV	ToMV	PepMV
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	+	-
5	-	-	+	-
6	-	-	+	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-

Tabla 3. Resultados obtenidos al analizar las muestras de pepino mediante la técnica serológica de inmunocromatografía de flujo lateral (BIOREBA AG, Suiza) para ZYMV, CGMMV y SqMV.

MUESTRA PEPINO	RESULTADOS PRUEBA SEROLÓGICA DE INMUNOCROMATOGRAFÍA DE FLUJO LATERAL		
	ZYMV	CGMMV	SqMV
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-

La razón por la que en esta finca de la empresa SaiFresc en particular dedicada a la producción ecológica y ubicada en el término municipal de Alcàsser no se ha detectado presencia de virus, a excepción del ToMV, es debido principalmente a las prácticas de manejo que se llevan a cabo, tanto en el campo de cultivo como en el paisaje en el que se encuentra inmerso. Se ha conseguido de esta manera crear un entorno de relaciones estables entre cultivo, plaga y enemigos naturales.

En la finca objeto de estudio podemos encontrar una gran diversidad de cultivos hortícolas en agricultura ecológica. Aunque la cantidad puede variar según las exigencias de demanda del mercado, en abril de 2017 se alcanzó el número máximo de cultivos, siendo este de 41. En los bordes o laterales de las parcelas, junto los cultivos hortícolas, también se cultivan frutales (*Punica granatum*, *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. y *Cydonia oblonga* Mill) (Benlloc, 2018). A lo largo del año, se realizan rotaciones de cultivos en una misma parcela, y se van alternado las diferentes plantas. También se hacen coincidir en una misma parcela y al mismo tiempo varios cultivos. Esta práctica se denomina asociación de cultivos (Jiménez, 2015).

La diversidad de vegetación adventicia alrededor de las parcelas y en los bordes de caminos de la finca también constituye un factor a destacar. Se han llegado a identificar hasta 31 adventicias pertenecientes a 16 familias diferentes (Benlloc, 2018).

Este policultivo, es decir, las rotaciones, alternativas y asociaciones de cultivos, junto con la presencia de adventicias específicas, limitan tanto en el suelo, como en la parte aérea, los problemas de plagas y enfermedades favoreciendo el mantenimiento de poblaciones de insectos beneficiosos para el control de plagas (Benlloc, 2018)

Aun así, aunque en un porcentaje más reducido, en la explotación aún se manifiesta la incidencia de ciertas plagas. En cuanto a los pulgones, de las seis especies que Lorenzo (2016) halló en las parcelas experimentales, cuatro (*Aphis fabae*, *Aphis gossypii*, *Macrosiphum euphorbiae* y *Myzus persicae*) son consideradas polífagas y vectores de virus de plantas (Blackman y Eastop 2006). En los cultivos donde se encontraron estas especies, se hallaron también parasitoides (Lorenzo, 2016).

Por lo tanto, gracias al tipo de manejo agroecológico que se lleva a cabo en la explotación, basado en rotaciones de cultivo con ciclos de producción cortos en parcelas de dimensiones más pequeñas que en agricultura convencional, no se permite el establecimiento de las especies de pulgones específicas de los cultivos, pero si la proliferación de especies polífagas que si se pueden mantener en el tiempo debido a que se pueden alimentar de distintos cultivos.

A pesar de la presencia de estos insectos vectores de virus, como se ha comprobado, la incidencia de virus en la explotación es mínima. Ello es debido a que, en un policultivo, al estar formado tanto por especies susceptibles como resistentes al virus, la dispersión del virus por la parcela es mucho más lenta que en un monocultivo. En un monocultivo, cuando aterrizan en la parcela los áfidos que transportan el virus, van infectando a las plantas conforme se van alimentando sobre ellas. De esta forma, cada planta infectada se convierte en fuente de virus incluso para aquellos áfidos que habían llegado “limpios” a la parcela, que comienzan a transmitirlos a otras plantas sanas conforme se alimentan de ellas. En cambio, en un policultivo, la dispersión es más lenta debido a que los áfidos adquieren el virus si se alimentan de alguna planta infectada del cultivo hospedero y lo pierden cuando se alimentan del otro cultivo, en el cual no es capaz de prosperar el virus. Es decir, sólo se produce transmisión de la enfermedad de una planta a otra, si las dos son hospederas del virus, y la primera en proporcionar alimento al áfido estuviera infectada. Si el áfido es preferencialmente atraído por el cultivo no hospedero del virus, esta segunda especie puede actuar como cultivo trampa tanto del vector como del patógeno. El cultivo barrero está basado en este principio (ECOagricultor, 2018).

Además de todo esto, la finca se encuentra en una zona bastante asilada, rodeada de cítricos principalmente, donde no hay positivos virales de los cuales los pulgones puedan alimentarse y adquirir virus que puedan transmitir posteriormente.

Finalmente, en cuanto al único virus detectado, el ToMV (virus del mosaico del tomate), hay que tener en cuenta que es uno de los principales virus que se transmiten por semilla en el cultivo de tomate. Las variedades autóctonas, como en este caso el tomate valenciano, son apreciadas por el consumidor local y son producidas por grupos de pequeños agricultores que ellos mismos se encargan de realizar una selección masal a partir de sus frutos, extrayendo las semillas para posteriores cultivos (El Huerto, 2018). Como medida de gestión se recomienda para el próximo año eliminar los restos de cultivo infectado y utilizar semilla desinfectada previamente con un tratamiento de termoterapia a 82-85 °C durante 24 horas.

4.2 EFICACIA DE *MACROSIPHUM EUPHORBIAE* COMO TRANSMISOR DE CMV.

De las 50 plantas analizadas mediante la técnica DAS-ELISA, 15 resultaron positivas a CMV. Teniendo en cuenta que se emplearon un total de 3 pulgones virulíferos por planta, la eficacia de *Macrosiphum euphorbiae* como transmisor del CMV es del 10 %.

$$\left(\frac{N^{\circ} \text{ plantas infectadas}}{N^{\circ} \text{ plantas totales}} \right) \times 100 \Bigg/ \left(\frac{N^{\circ} \text{ pulgones}}{\text{planta}} \right) = \left(\frac{15}{50} \right) \times 100 \Bigg/ (3) = 10 \%$$

Efectivamente, el pulgón *Macrosiphum euphorbiae* sí que transmite el CMV de manera no persistente, aunque su eficiencia como transmisor es relativamente baja. Gildow y col. en 2008 determinaron que los cuatro vectores más eficientes ($p > 0,05$), en cuanto a la transmisión de CMV en plantas de frijol son *Aphis gossypii*, *A. glycines*, *Acyrtosiphon pisum* y *Therioaphis trifolii*. Los vectores moderadamente eficientes ($0.01 < p < 0.04$) fueron *A. spiraeola*, *A. craccivora*, *Rhopalosiphum maidis*

y el pulgón empleado en el presente estudio, *Macrosiphum euphorbiae*. Los vectores pobres ($p < 0.01$) incluyeron *A. fabae*, *Nearctaphis bakeri* y *Myzus persicae*.

4.3 ENSAYO 1: TOXICIDAD DE LA TIERRA DE DIATOMEAS EN APLICACIÓN DIRECTA SOBRE *MACROSIPHUM EUPHORBIAE*.

En aplicación directa sobre los pulgones, como era de esperar, el producto insecticida comercial mostró un comportamiento tóxico significativamente superior al de la resta de tratamientos a corto plazo. Después de 24 horas de su aplicación la totalidad de individuos fueron eliminados. En cambio, entre el tratamiento con tierra de diatomeas y el control (agua) no se detectaron diferencias significativas con referencia a la cantidad de pulgones muertos independientemente del tiempo de exposición. Por lo tanto, la tierra de diatomeas, en comparación con el insecticida empleado como patrón de comparación, presenta una menor eficiencia y una menor toxicidad sobre el pulgón *Macrosiphum euphorbiae* (Figura 30).

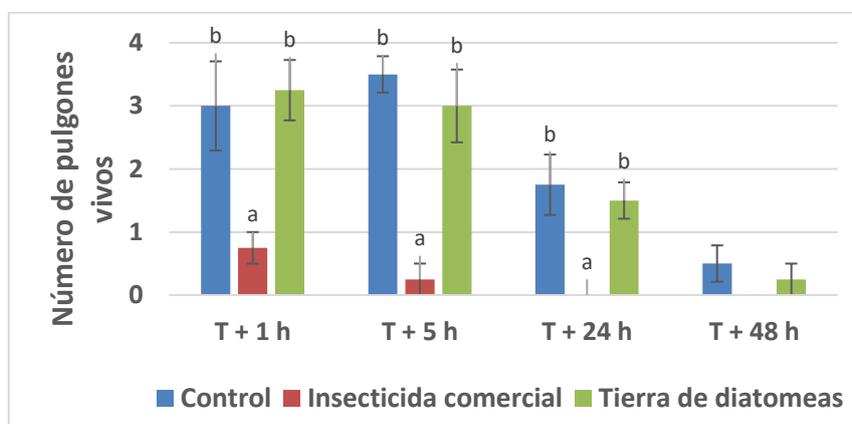


Figura 30. Número de pulgones (*Macrosiphum euphorbiae*) vivos a distintos tiempos desde la aplicación de los diferentes tratamientos: control (agua); tierra de diatomeas (dosis del 2%); producto insecticida comercial de efectividad ya comprobada. Letras distintas indican diferencias significativas a nivel estadístico. Diferencias significativas según ANOVA ($P \leq 0,05$).

4.4 ENSAYO 2: EFICACIA DE DISTINTAS DOSIS DE TIERRA DE DIATOMEAS SOBRE *MACROSIPHUM EUPHORBIAE*.

En este ensayo, los análisis estadísticos muestran claramente que no se registraron diferencias significativas entre las dosis de producto ensayadas. Todas produjeron un bajo y similar control sobre el pulgón, con independencia del tiempo de exposición (Figura 31).

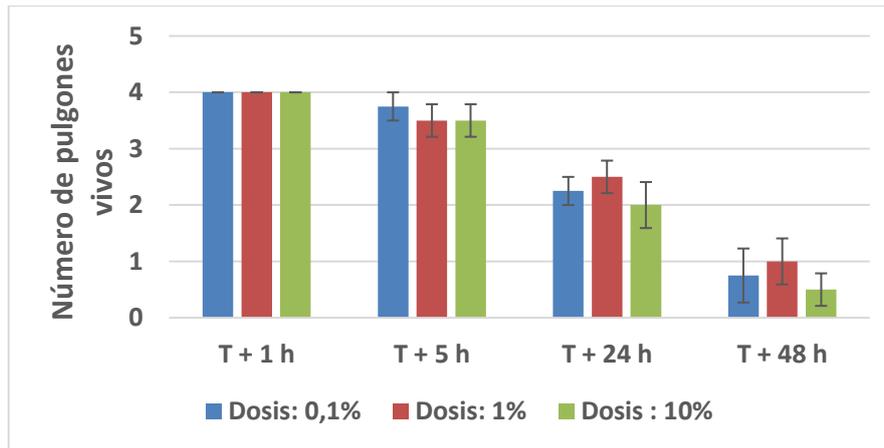


Figura 31. Número de pulgones (*Macrosiphum euphorbiae*) vivos a distintos tiempos después de un tratamiento con tierras de diatomea a distintas dosis. Dosis evaluadas (%): 0,1- 1- 10. Prueba ANOVA (nivel de significación de $P \leq 0,05$).

4.5 ENSAYO 3: REPELENCIA DE LA TIERRA DE DIATOMEAS SOBRE *MACROSIPHUM EUPHORBIAE*.

Los análisis estadísticos muestran que no se registraron diferencias significativas con respecto a la presencia de *Macrosiphum euphorbiae* entre las plantas testigo, pulverizadas únicamente con agua y las plantas tratadas con tierra de diatomeas con una dosis del 2% en ninguno de las pruebas realizados. En la figura 28 se observa como la tierra de diatomeas no ejerce ningún tipo de repelencia sobre los pulgones, ya que estos no mostraron ninguna preferencia en cuanto a situarse y alimentarse sobre plantas no tratadas y plantas tratadas (Figura 32).

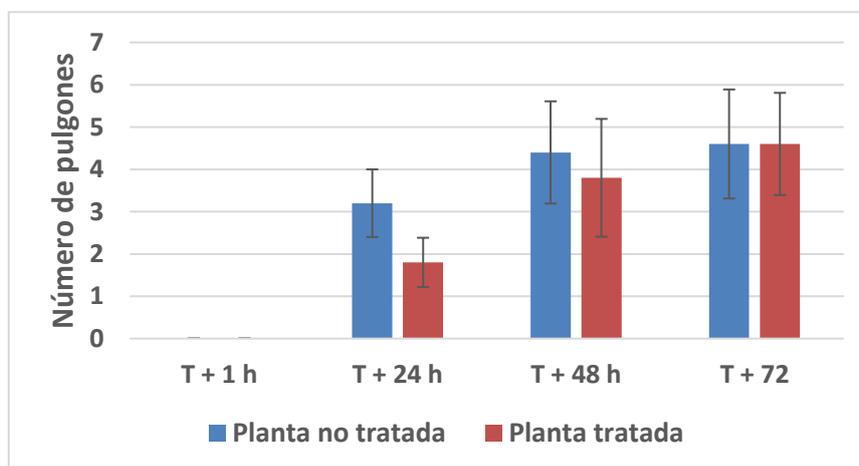


Figura 32. Número de pulgones (*Macrosiphum euphorbiae*) que eligen situarse sobre plantas de berenjena (*Solanum melongena*) tratadas con el producto de prueba (tierra de diatomeas pulverizada con una dosis del 2%) y sobre plantas control (pulverización con agua) a distintos tiempos desde su aplicación. Prueba ANOVA (nivel de significación de $P \leq 0,05$).

En nuestro caso, la tierra de diatomeas no ha demostrado poseer eficacia de control o repelencia sobre el pulgón *Macrosiphum euphorbiae*. Sin embargo, estos resultados no están en concordancia con los obtenidos por otros autores como Vargas y Salazar en 2013, que observaron una incidencia favorable del producto en cuanto a la presencia de plagas y enfermedades, dando resultados positivos como insecticida y fungicida. En este caso los ensayos se llevaron a cabo en un vivero (Vivero de ASOHECA vereda Itarka del Municipio de la Montañita Departamento del Caquetá) sobre plantas de Caucho Natural (*Hevea bresiliensis*).

Resultados similares fueron obtenidos en otro estudio, en el que se evaluaron los efectos del insecticida biológico del neem (*Azadirachta indica*) y de la tierra de diatomeas solos o en combinación contra el pulgón *Myzus persicae* y sobre los depredadores asociados. También se estudiaron los efectos indirectos de los compuestos ensayados sobre los parámetros de crecimiento y rendimiento de la alcachofa (*Cynara scolymus*). El neem en combinación con la tierra de diatomeas se clasificó primero para aliviar los efectos adversos de los áfidos en las plantas de alcachofa y para mejorar el crecimiento vegetativo y el rendimiento del brote, seguido del aceite solo, mientras que la tierra de diatomea aplicada sola dio los peores resultados. Este experimento se realizó en campo, concretamente, en un campo de la Estación de Producción e Investigación del Centro Nacional de Investigación, El-Nobaría, El-Behira (El-Wakeil et al, 2009). Además, en una evaluación del efecto de la tierra de diatomeas sobre población de insectos en semillas de maíz almacenado, la tierra de diatomeas tuvo efecto positivo para control de insectos a partir de la dosis probada de 4 kg/t, aunque la mayor dosis presentó efectos similares (Faggi y Titievsky, 2012).

La diferencia entre las conclusiones obtenidas en el presente ensayo y los obtenidos por los otros autores pueden ser debidas a que los resultados alcanzados pueden variar en gran medida según la metodología empleada. Los ensayos realizados en laboratorio con colonias procedentes de capturas en campo pueden no ser representativos de la forma de actuar de los pulgones en su hábitat natural. Parece evidente que hay un número de factores que influyen de manera importante en el éxito del control de insectos, que van desde las condiciones ambientales hasta las condiciones del material vegetal. Es muy difícil reproducir estas mismas condiciones en el laboratorio.

Es por esta misma razón que se piensa que las tierras de diatomeas podrían tener cierto efecto sobre la transmisión no persistente de virus, tanto en el proceso de adquisición como en el de inoculación. En el ensayo de repelencia de la tierra de diatomeas sobre *Macrosiphum euphorbiae*, los pulgones están aislados en cajas y obligados a alimentarse de la dos únicas plantas disponibles, la planta tratada y la planta control. Aunque el análisis estadístico no muestra diferencias significativas con respecto a la presencia de *Macrosiphum euphorbiae* entre las dos plantas, testigo y tratada, esto puede ser causado por dichas condiciones restringidas. Es más, a simple vista, a las 24 horas, parece que los pulgones preferían situarse y alimentarse sobre plantas no tratadas, ya que se registraron casi la mitad del número de pulgones sobre las plantas tratadas que sobre plantas control. En campo, donde el pulgón sería libre de elegir de qué planta preferiría alimentarse y pudiendo elegir entre muchas más plantas, existe la posibilidad de que el insecto prefiera a las plantas no tratadas. Por lo tanto, en dichas condiciones naturales habría un mayor porcentaje de plantas virosadas sin tratar que plantas tratadas con tierra de diatomeas, pudiendo este producto reducir sensiblemente la incidencia de virus.

Por lo tanto, los ensayos en laboratorio constituyen un método rápido y muy orientativo, pero que, sin embargo, debe ser corroborado con otros ensayos en campo.

5. CONCLUSIONES

A continuación, se presentan las conclusiones obtenidas a partir de los resultados obtenidos en el presente Trabajo Fin de Grado.

1. De las 16 muestras de material vegetal recogidas en la finca hortícola de la empresa de productos ecológicos SAIFRESC ubicada en el municipio de Alcàsser, 8 de ellas pertenecientes a cultivos de tomate y el resto a cultivos de pepino, se detectó únicamente la presencia de ToMV en 3 muestras de tomate. La ausencia de positivos virales se atribuye al tipo de manejo agroecológico que se lleva a cabo en la explotación, basado en rotaciones, alternativas y asociaciones de cultivos y a la elevada diversidad de vegetación. Se recomienda, para la gestión del único virus detectado (ToMV) el uso de semilla desinfectada previamente con un tratamiento de termoterapia para el próximo año.
2. La especie de pulgón *Macrosiphum euphorbiae* tiene una eficacia en la transmisión del CMV del 10%.
3. Los ensayos realizados con "Tierra de diatomeas" determinaron que este producto natural no es eficiente para el control *Macrosiphum euphorbiae* para evitar la transmisión de modo no persistente del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) en plantas de berenjena (*Solanum melongena*). Sin embargo, estos resultados deben ser corroborados con otros ensayos en campo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (1996). Enfermedades de las plantas causadas por virus. En: Agrios, G. N. (Ed.), *Fitopatología* (pp. 648-733). Editorial Limusa, México.
- Benlloc, J. (2018). *Diseño de ecosistemas agrícolas sostenibles a través del manejo del hábitat como herramienta para incrementar su biodiversidad* (Trabajo fin de Grado). Universitat Politècnica de Valencia, Valencia.
- Boletín “El Huerto” - Cajamar Caja Rural». Accedido 12 de noviembre de 2018. <https://www.cajamar.es/es/agroalimentario/innovacion/investigacion/documentos-y-programas/boletines-el-huerto/>.
- Buitrón-Bustamante, J. L., Morillo-Velastegui, L. E. (2017). Standardization of a molecular diagnostic method for *Cucumber mosaic virus* (CMV) in Ecuadorian bananas. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria, Mosquera (Colombia)*, 18(1):113-124.
- Cambra, M., Gorris, M. T. y Terrada, M. E. (1996). Caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus. En: Llácer, G., López, M. M., Trapero, A. y Bello, A. (Eds.), *Patología Vegetal-Tomo I* (pp. 2017-254). Ediciones Mundi-Prensa, Barcelona.
- Cranshaw, W.S., Baxendale, B. (2005). Insect control, horticultural oils. Recuperado de: <https://extension.colostate.edu/docs/pubs/insect/05569.pdf>.
- Dáder, B., Then, C., Berthelot, E., Ducouso, M., James, C.K.Ng., Drucker, M. (2017) Interact transmission of plant viruses: Multilayers interactions optimize viral propagation. *Insect Science* 24, nº 6: 929-46. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12470>.
- De Blas, C., Carazo, G., Castro, S., Romero, J. (1993) Estudios epidemiológicos sobre el virus del mosaico del pepino en diferentes cultivos y provincias españolas: identificación serológica de los subgrupos DTL y ToRS. *Bol. San. Veg. Plagas*. 19:345-353.
- Eastop, V. (1983). The biology of the principal aphid virus vectors. In: Plumb, R.T. and Thresh, J.M. (eds) *Plant Virus Epidemiology*. Blackwell, Oxford, pp. 115–132.
- ECOagricultor. Técnicas de la Agricultura Ecológica: La Biodiversidad. *ECOagricultor*. Accedido 12 de noviembre de 2018. <https://www.ecoagricultor.com/tecnicas-de-la-agricultura-ecologicabiodiversidad/>.
- El-Borollosy, A.M. (2015). Aphid-Transmission Efficiency of *Cucumber mosaic cucumovirus* and *Zucchini yellow mosaic potyvirus* on Squash and Their Control Using Essential Plant Oils. *J. Basic. Appl. Sci. Res.*, 5(1) 18-26.
- El-Wakeil, N.E., Saleh, S.A. (2009). Effects of neem and diatomaceous earth against *Myzus persicae* and associated predators in addition to indirect effects on artichoke growth and yield parameters. *Archives of Phytopathology And Plant Protection*, 42:12,1132 – 1143.

- Faggi, G. M., Titievsky, T.T. (2012). Evaluación del efecto de la tierra de diatomeas sobre población de insectos en semillas de maíz almacenado. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. Accedido 12 de noviembre 2018. <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:ADJiTxwavCkJ:https://inta.gov.ar/documentos/evaluacion-del-efecto-de-la-tierra-de-diatomeas-sobre-poblacion-de-insectosen-semillas-de-maiz-almacenado+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=es>
- Fereres, A., Raccah, B. (2015). Plant virus Transmission by Insects. In: else. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000760.pub3.
- Gildow, F.E., Shah D.A., Sackett W.M., Butzler, T., Nault, B.A., Fleischer, S.J. (2008). Transmission efficiency of Cucumber mosaic virus by aphids associated with virus epidemics in snap bean. *Phytopathology*, 98(11):1233-41
- Guerrieri, E., Digilio, M.C. (2008). Aphid -plant interactions: a review. *Journal of Plant Interactions* Vol. 3, No. 4, 223- 232.
- Guiu, C.A. (2014). *Study of Cucumber mosaic virus infection in the resistant melon accession PI 161375* (Tesis doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Hooks, C.R., Fereres, A., Wang K. (2007). Using protector plants to guard crops from aphid-borne non-persistent viruses. *Soil and Crop Management SCM-18*.
- Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*, 4th edn. Academic Press, London, 1001 pp.
- Jiménez, I.P. (2015). *Estudio de las especies de pulgones y sus enemigos naturales en una finca de horticultura ecológica en Alcàsser, Valencia* (Trabajo final de carrera). Universitat Politècnica de Valencia, Gandía.
- Katis, N.I., Tsitsipis J.A., Stevens M., Powell, G. (2007). Transmission of Plant Viruses. In: van Emdem, H.F., Harrington, R., Eds.) *Aphids as Crop Pests*. CABI Publishing, Wallingford.
- Llorens Climent, J. (1990). *Homóptera II. Pulgones de los cítricos y su control biológico*. Valencia, España: Pisa Ediciones.
- Lorenzo, D. F. (2016). *Manejo integrado de pulgones en cultivos hortícolas al aire libre* (Trabajo Fin de Máster). Universitat Politècnica de Valencia, Valencia.
- MAGRAMA, (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente), 2018. Encuesta sobre superficies y producción de cultivos. <http://www.magrama.gob.es>(consultado en septiembre 2018).
- Moreno, A.L. (2005). *Incidencia y dispersión de virus transmitidos por pulgones hortícolas de invierno y sus relaciones virus-vector* (Tesis Doctoral). Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- Muñoz, J. I. (2008). *Factores que determinan la evolución de la virulencia del virus del mosaico del pepino (CMV) en Arabidopsis thaliana* (Tesis Doctoral). Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- Nault, L.R. (1997). Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America*, Volume 90, Issue 5, Pages 521–541. <https://doi.org/10.1093/aesa/90.5.521>

- Persley, D., Gambley, C. (2010). Aphid-transmitted viruses in vegetable crops – Integrated virus disease management. *Department of Employment, Economic Development and Innovation (DEEDI), Agri-Science Queensland*.
- Pimentel, D. (2009). Pesticides and Pest Control. *Integrated Pest Management: Innovation Development Process: Volume 1*, editado por Rajinder Peshin y Ashok K. Dhawan, 83-87. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8992-3_3.
- Pineda, A. (2008). *Los sírfidos (Diptera, Syrphidae) en el control integrado de plagas de pulgón en cultivos de pimiento de invernadero* (Tesis doctoral). Universidad de Alicante, Alicante.
- Pinto, Z.V.; Rezende, J.A.M.; Yuki, V.A.; Piedade, S.M.S. (2008). Ability of *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* to Transmit Cucumber mosaic virus in single and mixed infection with two potyviruses to zucchini squash. *Summa Phytopathologica Summa Phytopathologica*, v.34, n.2, p.183-185, 2008.
- Rongling, Y. (2013). Study of CMV - plant - aphid interactions focusing on *Myzus persicae* in vegetable crops (Tesis doctoral). Universite de Liege-Gembloux Agro-Biotech.
- Sousa Timossi, M. (2015). *Efecto de la infección por virus persistentes y no persistentes sobre el comportamiento alimenticio, la preferencia, tasa de aterrizaje y asentamiento y la eficacia biológica de Aphis gossypii Glover*. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- Ulrichs, C. Mewis, I., Schnitzler, W.H. (2001). Efficacy of neem and diatomaceous earth against cowpea aphids and their deleterious effect on predating Coccinelidae. *J. Appl. Ent.* 125, 571±575
- Vargas, M.V., Salazar J.R. (2013). *Prueba de la actividad biológica de “tierra de diatomeas” en viveros de caucho en Itarka la Montañita Caqueta* (Trabajo fin de Grado). Universidad nacional abierta y a distancia. Escuela de ciencias agrícolas, pecuarias y de medio ambiente, Florencia.
- Viteri, D., Gordillo, L.F. (2009). Modelling and control of non-persistent plant virus transmission for annual production cycles. *Eur J Plant Pathol.* 125: 435-444.
- Wróbel, S. (2014). Efficacy of mineral-oil insecticide mixtures for protection of potato tubers against PVY and PVM. *Am. J. Potato Res.* 91:706–713