

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**  
**GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y**  
**AGROAMBIENTAL**



***Planococcus citri* (Risso) y *Planococcus ficus* (Signoret)**  
**(Hemiptera: Pseudococcidae). Prospección en cultivos**  
**de Alicante y Murcia e identificación morfológica y**  
**mediante PCR**

**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**SEPTIEMBRE-2014**

Autor: Manuel Cantó Tejero  
Tutor: Pedro Guirao Moya

## **Resumen:**

*Planococcus ficus* (Signoret) 1875 y *Planococcus citri* (Risso) 1813 (Hemiptera: Pseudococcidae) son importantes plagas agrícolas, muy semejantes morfológicamente que coexisten en España. El objetivo del presente trabajo es aclarar la situación, en cuanto a la distribución de ambas especies, en los cultivos de nuestro entorno. Para ello se han tomado muestras en las provincias de Alicante y Murcia de cochinillas algodonosas sobre diferentes plantas cultivadas y se han identificado las especies mediante métodos morfológicos, a partir de preparaciones microscópicas de hembras adultas, y métodos moleculares, mediante la amplificación por PCR de un fragmento en el ADN mitocondrial del gen que codifica la subunidad I de la enzima Citocromo Oxidasa (COI). Se ha detectado la presencia de *P. citri* en naranjo dulce, limonero, granado, jatrofa y Schefflera y de *P. ficus* se ha encontrado en cultivo de vid e higuera.

**Palabras clave:** *Planococcus citri*, *Planococcus ficus*, Pseudococcidae, caracterización morfológica, caracterización molecular, ADN mitocondrial.

## **Abstract:**

*Planococcus ficus* (Signoret) 1875 and *Planococcus citri* (Risso) 1813 (Hemiptera: Pseudococcidae) are important agricultural pests, morphologically very similar coexisting in Spain. The aim of this study is to clarify the situation, regarding the distribution of both species, in the cultures around us. For it has been sampled in the provinces of Alicante and Murcia on different crops and species were identified by morphological methods, from slides of adult females, and molecular methods, by PCR amplification of a DNA fragment of mitochondrial gene encoding the subunit I of the enzyme cytochrome oxidase (COI). It has been detected the presence of *P. citri* in lemon, pomegranate, orange, jatropha and schefflera and *P. ficus* in vineyard and fig.

**keywords:** *Planococcus citri*, *Planococcus ficus*, Pseudococcidae, molecular characterization, morphological characterization, mitochondrial DNA

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi director el Dr. Pedro Guirao Moya por todo el tiempo dedicado a la elaboración de este trabajo, la excelente dirección y la imprescindible ayuda durante la realización y redacción del mismo.

Agradecer también a la Dr. Ana María Ortega por la ayuda ofrecida y los buenos momentos en el laboratorio.

Al departamento de Producción Vegetal y Microbiología de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela por permitirme realizar este trabajo final de grado.

A mis padres, Gracia y Manolo por todos los esfuerzos y apoyo que me han dado.



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. LA FAMILIA PSEUDOCOCCIDAE.....	1
1.1.1. POSICIÓN SISTEMÁTICA .....	2
1.1.2. MORFOLOGÍA.....	2
1.1.3. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA.....	10
1.1.4. ESPECIES PLAGA A NIVEL MUNDIAL Y EN ESPAÑA.....	12
1.2. <i>PLANOCOCCUS CITRI</i> (RISSO) Y <i>PLANOCOCCUS FICUS</i> (SIGNORET) .....	13
1.2.1. MORFOLOGÍA.....	15
1.2.2. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA.....	21
1.2.3. ENEMIGOS NATURALES .....	23
1.2.4. DAÑOS.....	25
1.2.5. MÉTODOS DE CONTROL.....	27
1.3. MÉTODOS MOLECULARES EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE PSEUDOCÓCCIDOS.....	32
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	38
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
3.1. MUESTRAS TOMADAS. ....	39
3.2. PREPARACIÓN Y MONTAJE .....	42
3.2.1. DIGESTIÓN .....	42
3.2.2. TINCIÓN.....	43
3.2.3. MONTAJE SEMIPERMANENTE .....	43
3.3. CLAVES EMPLEADAS Y CARACTERES CONSIDERADOS .....	44
3.4. ANÁLISIS PCR.....	45
3.4.1. EXTRACCIÓN DE ADN.....	45
3.4.2. REACCIÓN PCR .....	46
3.4.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	48
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	49
4.1. ESTUDIO MORFOLÓGICO .....	49
4.1.1. CARACTERES DIAGNÓSTICO DEL GÉNERO <i>PLANOCOCCUS</i> .....	51
4.1.2. CARACTERES DIFERENCIADORES ENTRE <i>P. CITRI</i> Y <i>P. FICUS</i> .....	56
4.2. ESTUDIO MOLECULAR ENTRE <i>PLANOCOCCUS CITRI</i> Y <i>P. FICUS</i> .....	63
4.3. RESULTADOS POR ESPECIES CULTIVADAS .....	65
4.3.1. LIMONERO .....	65
4.3.2. NARANJO DULCE .....	66
4.3.3. NARANJO AMARGO.....	67
4.3.4. VID .....	67
4.3.5. GRANADO .....	68
4.3.6. HIGUERA .....	69
4.3.7. SCHEFFLERA .....	69
4.3.8. JATROFA.....	70
4.3.9. TOMATE.....	70
4.3.10. OTROS CULTIVOS .....	71
5. CONCLUSIONES .....	72
6. BIBLIOGRAFÍA .....	73
ANEJO 1: ESPECIES DE PSEUDOCÓCCIDOS CITADAS EN ESPAÑA PENINSULAR.....	80
ANEJO 2: COMPARACIÓN DE SECUENCIAS AMPLIFICADAS CON LOS CEBADORES JERRY Y PAT .....	84

## 1. INTRODUCCIÓN

*Planococcus citri* y *Planococcus ficus* son dos especies, pertenecientes a la familia Pseudococcidae, morfológicamente muy similares, lo que ha motivado que tradicionalmente, en su papel de plaga agrícola, se hayan confundido ambas especies, sobre todo en vid, creyendo que *P. ficus* era *P. citri* (García Marí *et al.*, 1989). Por ejemplo en viñedos de Sudáfrica y España siempre se ha citado como plaga a *P. citri*, mientras que otros estudios han puesto de manifiesto que la especie predominante es *P. ficus*, siendo *P. citri* raro en los viñedos (Annecke and Moran 1982; en Saccaggi 2006). En la presente revisión bibliográfica se analiza en particular las diferencias morfológicas y genéticas existentes entre ambas especies, y en su rango de hospedantes.

### 1.1. LA FAMILIA PSEUDOCOCCIDAE

La familia Pseudococcidae fue descrita por Heymons en 1915 y son comúnmente llamados cochinillas harinosas. Estos insectos constituyen la segunda mayor familia de los cóccidos (Coccoidea). Son de distribución mundial, con más de 2000 especies descritas pertenecientes a 296 géneros, habiendo en España 40 especies descritas (Ben-Dov *et al.*, 2001) (En anejo 1). Algunas especies son importantes plagas agrícolas en muchos cultivos de todo el mundo. Se caracterizan por tener el cuerpo con secreciones cerasas que le dan un aspecto blanquecino. Entre estas destacan las especies que ocupan el presente trabajo *P. citri* y *P. ficus* como plagas de muchos cultivos debido a sus hábitos alimenticios: debilita a las plantas por la succión de la savia y segregan melaza sobre la que aparecen otras plagas o crecen hongos formándose la negrilla que reduce la capacidad fotosintética de la planta, además de ser vectores de virus en algunos cultivos como la vid.

### 1.1.1. POSICIÓN SISTEMÁTICA

La posición sistemática de *P. citri* (Risso) y *P. ficus* (Signoret) es la siguiente: Clase: Insecta. Orden: Hemíptera. Suborden: Homóptera. Serie: Sternorrhyncha. Superfamilia: Coccoidea. Familia: Pseudococcidae. Subfamilia: Pseudococcinae. Género: *Planococcus* Ferris. Especies: *Planococcus citri* (Risso 1813) y *Planococcus ficus* (Signoret 1875).

### 1.1.2. MORFOLOGÍA

Muchas especies del género *Planococcus* son muy similares morfológicamente, mostrando al mismo tiempo una variabilidad significativa (Danzig *et al.*, 2010).

Debido a que las claves existentes para poder diferenciar las especies se basan en caracteres morfológicos de la hembra adulta, a continuación se presentan detallados estos caracteres según Cox (1989), Danzig *et al.*, (2010) y Williams *et al.*, (1992) (Figura 1). También se describen, aunque más brevemente, otros de los estados y estadios por los que pasan la hembra: huevo, larva I, larva II y larva III, y los estados y estadios del macho: huevo, larva I, larva II, prepupa, pupa y macho adulto (Figura 7)

#### 1.1.2.1. MORFOLOGÍA DE LA HEMBRA

##### 1.1.2.1.1. ASPECTO GENERAL

Normalmente el cuerpo es blando, alargado y ovalado, de menos de 3 mm, pero a menudo varía en forma después de la muda final, cuando la hembra adulta puede agrandarse durante la producción de huevos. Segregan sustancias cerosas de las que se recubren dándoles un aspecto blanquecino. Presentan lateralmente una serie de filamentos (cerarios) recubiertos por la cera secretada. Bajo la cera, se encuentra la epidermis, cuya coloración varía en función de las especies entre amarillenta, grisáceas, blanquecinas, etc. La hembra adulta es áptera, conservando la forma de los estados juveniles y pasando por tres estadios ninfales. A continuación se describen las diferentes estructuras corporales a partir de los trabajos de Ramos Portilla (2004), Miller *et al.*, (2007) y Cox (1989).

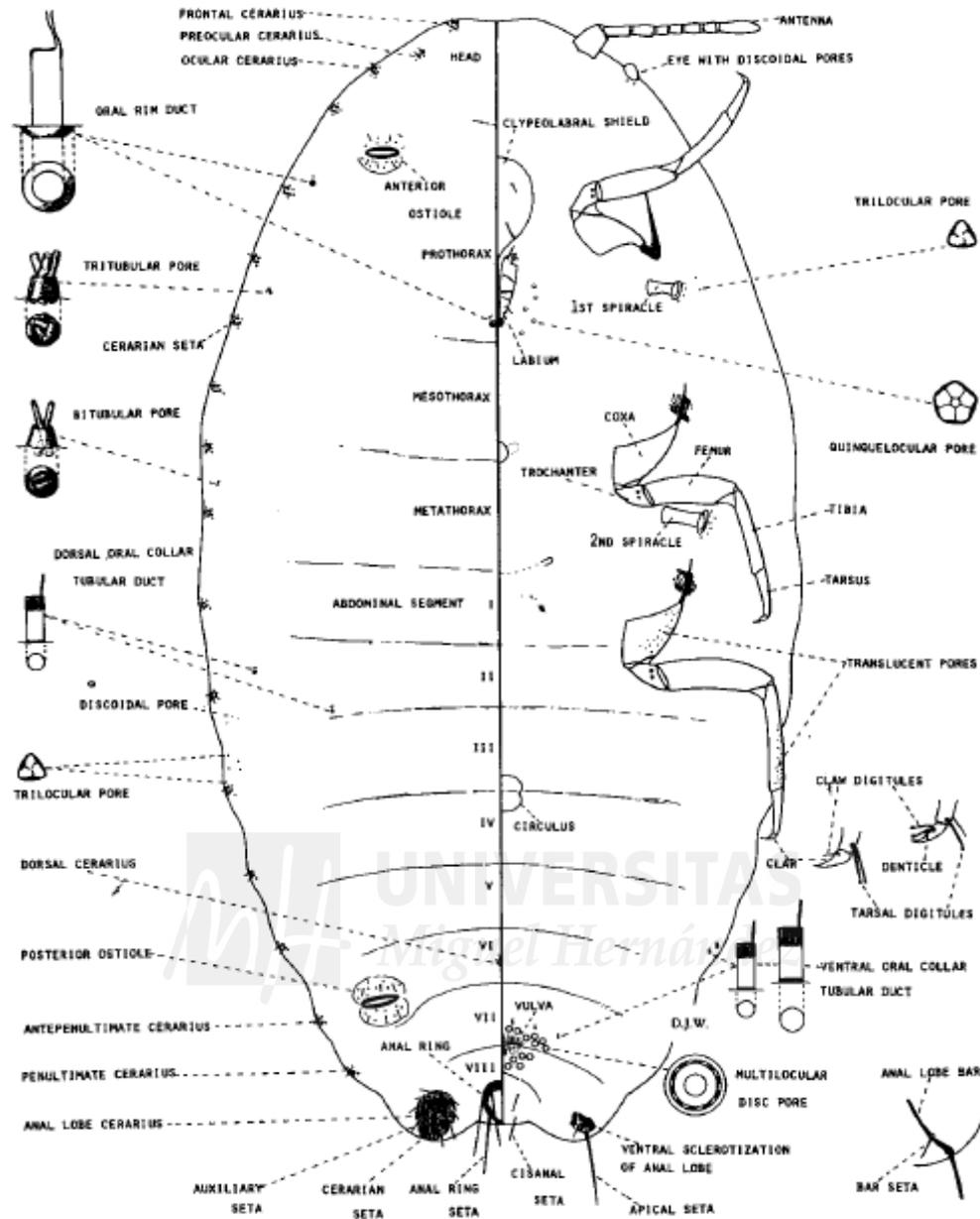


Figura 1 Morfología general de hembra adulta de Pseudococcidae, dorso (parte izquierda) y vientre (parte derecha) (Granara de Willink, 1992).

#### 1.1.2.1.2. CABEZA

Antenas. Los pseudocócidos presentan entre 6-8 segmentos antenales (ocasionalmente 9, como es el caso del género *Phenacoccus*), con el segmento apical un poco más grueso y alargado (Chandler y Watson, 1999; en Moreno, 2011).

Ojos. Posee un par de ojos simples situados en el margen del cuerpo, tras las antenas (Castillo y Belloti, 1990; en Ramos *et al.*, 2004).

Aparato bucal. Posee piezas bucales con el fin de perforar tejido vivo y succionar el alimento en forma líquida. Consta de dos pares de estiletes y una cubierta protectora, conformada por el labio. El labio se encuentra entre el primer par de coxas, varía en longitud y en proporción al tamaño de la placa clipeolabral (Chandler y Watson, 1999; en Moreno, 2011).

#### 1.1.2.1.3. TÓRAX

Patas. Se encuentran bien desarrolladas y están formadas por coxa, trocánter, fémur, tibia, un tarso no segmentado y una uña. Cerca del ápice de cada tarso se encuentra un par de estructuras parecidas a setas con el ápice un poco espatulado, denominada digitíngulas o setas digitales; otro par se encuentran cerca de la base de la uña la cual puede presentar un pequeño diente o “denticulo” en la superficie plantar (ventral). Las patas suelen presentar poros translúcidos, los que probablemente emiten feromonas (Williams 1985a; en Granara de Willink 1992), que pueden encontrarse en la coxa, trocánter, fémur (rara vez) y en la tibia.

Espiráculos. Solo están presentes dos pares de espiráculos torácicos; el primer par entre el protórax y el mesotórax y el segundo par entre el mesotórax y el metatórax.

#### 1.1.2.1.4. ABDOMEN

Formado por 8 segmentos. El primer segmento que se manifiesta en el vientre es en realidad el segundo, pues el primero sólo se manifiesta lateralmente a la altura de las patas traseras.

Anillo anal: Normalmente está rodeado por un anillo esclerosado, por lo regular con dos hileras de poros diminutos y con tres o más pares de setas largas.

Lóbulos anales. El segmento abdominal VIII por lo general se forma por dos lóbulos, uno a cada lado del anillo anal. En el ápice de cada lóbulo termina en una seta larga (seta apical). Ventralmente en cada lóbulo puede haber un área esclerosada que varía en forma y algunas veces se desarrolla una barra anal que se extiende hacia delante desde la base de la seta apical y en la mitad de esa elongación hay una seta.

Círculo. Área de cutícula delgada sobre tejido glandular en el vientre del abdomen, usualmente entre los segmentos abdominales III y IV. La forma varía desde circulares hasta cuadrados, en forma de reloj de arena. Esta estructura es probablemente un órgano adhesivo (Pesson (1939) y Lloyd & Martini (1957); en Granara de Willink, 1992), pero en otras especies posiblemente tenga otra función.

Vulva. La vulva o abertura genital está ubicada en el vientre, entre los segmentos VII y VIII.

#### 1.1.2.1.5. OTRAS ESTRUCTURAS DISTRIBUIDAS POR TODO EL CUERPO

Cerarios. Se ubican en el dorso y son los encargados de formar y dar soporte a los filamentos marginales de cera. Cada cerario consiste en un grupo de dos o más setas de tipo cónico o lanceolado y rodeado por unos pocos poros triloculares, también pueden presentar setas filiformes (setas auxiliares). Los cerarios se enumeran convencionalmente desde atrás hacia delante. El número de pares de cerarios varía entre 0 y 18, según las especies. Cuando presentan 18 pares, como es el caso de *Planococcus*, se sitúan: 4 pares en la cabeza (un par frontal, uno preocular, uno ocular y otro postocular), 6 pares torácicos (2 pares por segmento) y 8 pares abdominales (1 par por segmento).

Conductos tubulares. Son estructuras internas conectadas a un orificio en la superficie. Los conductos varían en forma y tamaño, aunque solo se distinguen dos tipos principales (

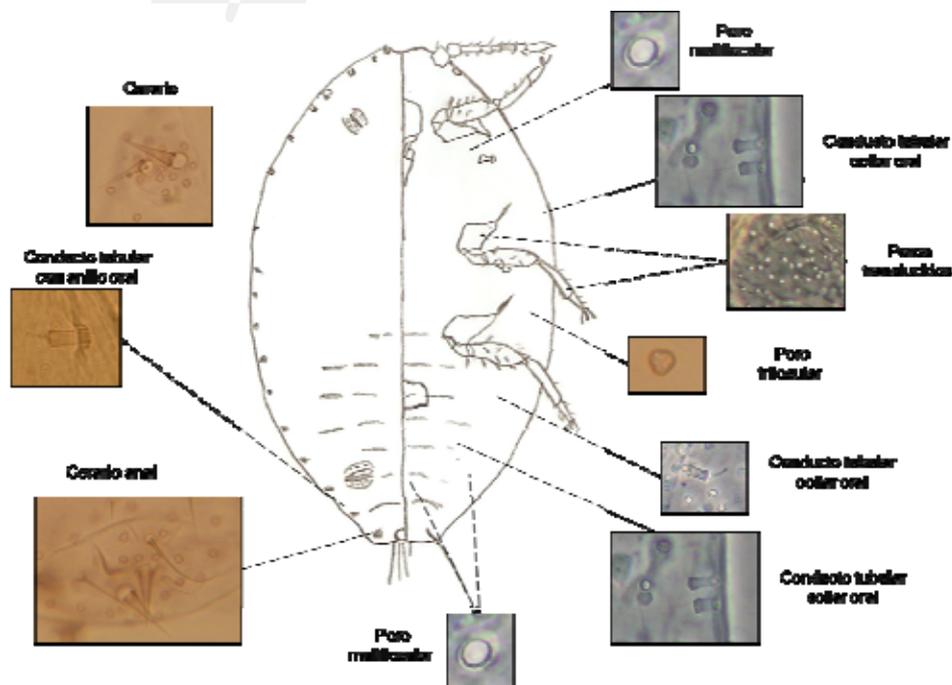
#### **Figura 2):**

1. Conductos tubulares tipo collar oral: la base del orificio del conducto presenta un ensanchamiento muy leve, casi inapreciable; posee la forma de un cilindro (en ocasiones doblado, según la preparación microscópica) la presencia o ausencia de setas en el anillo es un carácter taxonómico importante.
2. Conductos tubulares tipo anillo oral: poseen un anillo muy bien definido alrededor del orificio o extendiéndose internamente para formar una pestaña, presentes principalmente en la región ventral. Estos conductos producen cera para la formación del ovisaco; las especies con pocos de estos conductos son usualmente vivíparas.

Poros. Se presentan principalmente cuatro tipos de poros (

**Figura 2):**

1. Poros triloculares: constan de tres lóculos formando un triángulo, con los lóbulos algo torcidos respecto al eje central. Sólo se conoce en familia Pseudococcidae. Este poro produce la cera que cubre al insecto. Los poros se encuentran distribuidos sobre la región dorsal y ventral, y en ocasiones varían ligeramente en forma y tamaño de la misma especie, siendo más grandes en el dorso que en el vientre.
2. Poros multiloculares: cada uno contiene 10 aberturas (lóculos) alrededor del perímetro. Son numerosos sobre el dorso y el vientre, aunque pueden estar ausentes. Se suelen localizar en la región ventral alrededor de la vulva y secretan cera para la formación del ovisaco.
3. Poros pentaloculares o quinqueloculares: Presenta 5 lóculos y se sitúan solo en la superficie ventral, muy raramente en el dorso. La función de estos poros probablemente sea la misma que la de los poros triloculares.
4. Poros discoidales o simples: son los más pequeños y la relación del tamaño entre los ventrales y dorsales puede tener significancia taxonómica. A veces pueden ser tan grandes como los poros triloculares y visibles en los segmentos posteriores del dorso y junto a los ojos. La función de estos poros se desconoce.



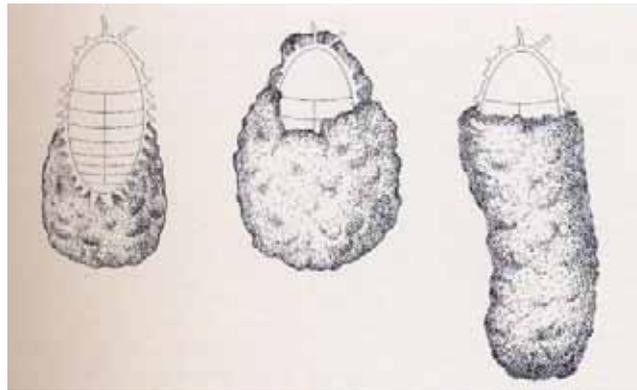
**Figura 2. Aspecto y distribución de poros y conductos tubulares en las distintas zonas de cuerpo (lado izq. zona dorsal y lado dcho. zona ventral).**

Sedas. Las sedas presentes en otros lugares del cuerpo distintos a los cerarios, pueden ser flageladas, lanceoladas o cónicas. En el anillo anal suelen haber tres pares de sedas, y sobre la superficie ventral existen dos pares de sedas cercanas al ápice posterior, las sedas anales en posición anterior, y las sedas cisanales, cercano al ápice. En ocasiones ambos pares de setas están desplazadas hacia a la superficie dorsal. A menudo la longitud de las sedas del anillo anal es comparada con el resto de sedas.

Ostiolos. Hendiduras pareadas situadas en el área dorsal. Un par en protórax y otro sobre el segmento abdominal VI. A veces están ausentes por completo o están representados por sólo el par posterior. Tiene forma de labios y suele llevar poros y setas como el resto del cuerpo. Cada ostiolo posee una válvula muscular con la que puede abrirse y cerrarse a manera de labios. La función de los ostiolos probablemente sea de defensa, ya que cuando son molestados algunos pseudocóccidos abren los ostiolos para exudar pequeñas gotas de líquido que se endurecen con el aire, así que cualquier depredador que entre en contacto con las secreciones pasará tiempo tratando de limpiarse o si las piezas bucales se inmovilizan, el depredador puede morir de inanición.

#### 1.1.2.2. MORFOLOGÍA DE OTROS ESTADO DE DESARROLLO

**Huevos:** (Figura 4) Según Llorens (1990) son de color amarillo pálido, liso, brillante y elíptico midiendo 0,3 mm de longitud. (Figura 4). La hembra adulta de los pseudocóccidos deposita del orden de 500 huevos, el número varía según la especie (Meyers, 1932, citado por Mckenzie, 1976; en Arriola, 2009) y el hospedante (Manichote, 1958, citado por Mckenzie, 1976; en Arriola 2009). Se encuentran unidos en el ovisaco, formado por filamentos algodonosos secretados por la madre. Según el género hay 4 tipos de ovisaco que pueden estar: bajo el abdomen, cubriendo el cuerpo entero, cubriendo casi el cuerpo entero y con forma de túnel, o se encuentra bajo el abdomen y está formado por pocos filamentos céreos (pseudovisaco). En las especies vivíparas, como es evidente, no existe el estado de huevo ni se produce ovisaco.



**Figura 3.** Distintos tipos de ovisacos de pseudocóccidos: ovisaco bajo el cuerpo (izq.), cubriendo el cuerpo (centro) y de túnel (dcha.) (Beltrà y Soto, 2012).



**Figura 4.** Ovisaco con huevos de pseudocóccidos sobre brote de higuera.

**L.1:** (Figura 5) Emergen de tres a seis días después de la oviposición. Son muy activas y móviles, dispersándose con facilidad mediante el viento u otros insectos y usualmente emigran a otros hospederos o a otras áreas de donde se encuentran. Las patas y antenas son proporcionalmente más largas en comparación con el cuerpo (Granara de Willink, 1990; en Arriola 2009). Es de forma elíptica alargada, posee dos antenas, ojos salientes de color oscuro y tres pares de patas. El color de la larva es amarillo limón o rosa pálido.

Tras emerger se alimenta del material vegetal clavando su estilete.

**L.2:** (Figura 5) Emergen a través de una hendidura de salida ubicada en medio del dorso de la cabeza y tórax de las L1. Las patas y antenas son proporcionalmente más largas respecto del cuerpo. En esta etapa se puede distinguir el sexo del insecto, ya que al final del estadio los machos producen un saco filamentososo sobre su cuerpo (rostrum) (MacGuillivray, 1921, Mckenzie, 1967, en Arriola, 2009).

**L.3:** (Figura 5) La ninfa L2 muda de igual forma que la L1. Este estadio se presenta sólo en las hembras, comenzando a tomar la forma adulta. Las patas y antenas son aproximadamente del mismo tamaño comparadas con la del adulto. Los segmentos antenales generalmente son iguales en número que los de las formas adultas (Mckenzie, 1967; en Arriola, 2009).



**Figura 5.** Distintos estados larvarios de pseudocócidos sobre raíz de higuera.

**Prepupa:** En el interior de un capullo el estadio larvario L2 del macho realiza la muda pasando a prepupa o prenina, con forma oval y alargada, con las patas escasamente funcionales e inicio de rudimentos de antenas. En este estadio se empieza a diferenciar la cabeza del cuerpo.

**Pupa:** Tras otra muda el macho pasa a pupa, con tres pares de patas antenas e inicio de muñones alares.

**Macho:** (Figura 6) Presenta el cuerpo dividido en tagmas, pudiendo ser alado o áptero. El aparato bucal está atrofiado o no existe, siendo su vida de corta duración (Soria y Viñuela, 2003; Williams, 1991; en Ramos *et al.*, 2004). Protórax triangular y convexo, mesotórax muy desarrollado en el que se insertan las alas, observándose en ellas dos nerviaciones casi paralelas y una tercera que arranca de la anterior y diverge. Se encuentran diferencias significativas entre las distintas especies, pero no son utilizados todavía debido a su diminuto tamaño (1-2 mm) y que rara vez se encuentran en el material recolectado (Castillo y Bellotti, 1990; en Ramos 2003).



**Figura 6. Macho adulto sobre hoja de buganvilla.**

### 1.1.3. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

Los pseudocóccidos se han adaptado a un gran número de hospedantes desde herbáceos a leñosos, destacando las familias de las compuestas, gramíneas y leguminosas (Beltrà y Soto, 2012). Entre estos hospedantes hay un elevado número de plantas cultivadas y ornamentales, causando importantes pérdidas de cosechas. Pueden encontrarse en casi cualquier parte de la planta, aunque muchas especies adquieren una posición característica. Relativamente pocas especies se encuentran en situación expuesta, tales como el haz de las hojas. Muchas especies viven debajo de la corteza, en envolturas de hojas y axilas, en brácteas, debajo de los cálices o en las raíces (Cox, 1987; en Ramos 2003).

Se alimentan principalmente del floema o del parénquima, y sus rangos de asociación con hospederos van de monófago a polífago. Produce daños directos a la planta por la extracción de savia y transmitiendo patógenos y toxinas a que pueden reducir el vigor de la planta o incluso matarla. Además produce otros daños indirectos a causa de la segregación de melaza que atrae a otras plagas (Gullan y Martin, 2003; en Ramos 2003).

Respecto a su ciclo biológico, tanto hembras como machos pasan por dos estadios iniciales idénticos. Después de esto la hembra pasará por otro estadio más y posteriormente llegará al estado adulto que se suele subdividir en tres estadios H1, H2 y H3 en función de su estado reproductivo. En cambio el macho tras el segundo estadio larvario segregará una capsula cerosa y permanecerán en su interior durante dos estadios más y por último emergerá el macho (Figura 7). Los machos adultos viven entre 1 y 7 días sin alimentarse (Franco *et. al.*, 2000; en García Marí 2012).

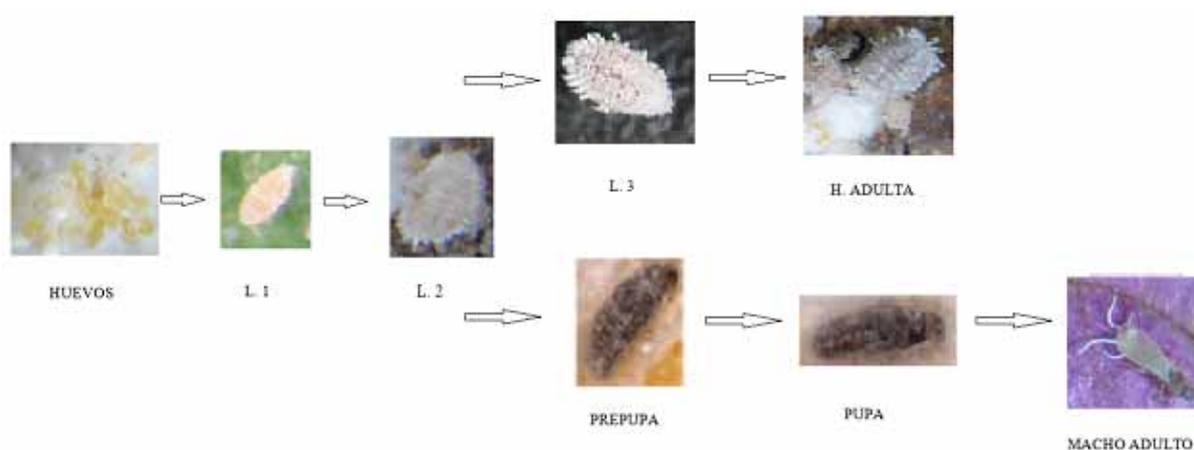


Figura 7. Ciclo biológico de los pseudocóccidos.

En lo que se refiere a enemigos naturales de los pseudocóccidos se han citado un gran número de especies (Tabla 1).

Tabla 1. Enemigos naturales de los pseudocóccidos (Jacas *et al.*, 2008; Prado 1991)

Orden; Familia	Género y especie	Asociación
Neuroptera; Hemerobiidae	<i>Hemerobius hageni</i> Navás <i>Nomerobius psychodoides</i> (Bl.) <i>Sympherobius maculupennis</i> Kim	Depredador
Coleoptera; Coccinelliade	<i>Cryptolaemus montrouzieri</i> Muslant* <i>Scymus apetzi</i> Muls*	Depredador
Diptera; Chamaemyiidae	<i>Leucopis griseola</i> Fll*	Depredador
Diptera; Syrphidae	<i>Ocyptamus confusus</i> (Goot)	Depredador
Hymenoptera; Encyrtidae	<i>Leptomastix dactylopii</i> (Howard)* <i>Leptomastoidea abnormis</i> Girault* <i>Coccidoxenoides perminutus</i> Girault <i>Anagyrus pseudococci</i> * <i>Anagyrus bohemani</i> West*	Parasitoides

\*Presentes en España.

## 1.1.4. ESPECIES PLAGA A NIVEL MUNDIAL Y EN ESPAÑA

Los pseudocóccidos se encuentran en todas las regiones zoogeográficas del mundo, estando las regiones de Australasia, Afrotropical, Neártica, Neotropical, Oriental y la Paleártica, que es en la que se encuentra España.

A parte de *P. ficus* y *P. citri* normalmente suelen haber presentes otros pseudocóccidos que a simple vista pueden dar lugar a confusión con las especies que ocupan el presente trabajo. En los cítricos aparte de *P. citri* también se pueden encontrar *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti, *Pseudococcus calceolariae* (Maskell) y *Pseudococcus viburni* (Signoret) (Franco *et al.*, 2004; en García Marí 2012). Como se ha indicado antes, en España se han descrito del orden de unas 40 especies (Anexo 1) de las cuales de importancia económica son las de la Tabla 2

**Tabla 2. Especies de pseudocóccidos con importancia económica, que viven en plantas cultivadas, presentes en España Peninsular (USDA, 2014; Beltrà y Soto, 2012; García-Marí 2012).**

Especie	Hospedantes	Citas*
<i>Hypogeococcus pungens</i>	6 fam. botánicas	6
<i>Dysmicoccus grassii</i>	24 fam. botánicas	--
<i>Phenacoccus madeirensis</i>	49 fam. botánicas	6
<i>Phenacoccus peruvianus</i>	9 fam. botánicas	7
<i>Phenacoccus solani</i>	32 fam. botánicas	6
<i>Planococcus citri</i>	257 hospedantes de 87 familias botánicas	4
<i>Planococcus ficus</i>	24 fam. botánicas	13,1,4, 8
<i>Planococcus vovae</i>	Araceae, Cupressaceae, Lauraceae y Taxaceae	10, 8, 22
<i>Pseudococcus longispinus</i>	85 fam. botánicas	5, 23,4, 8
<i>Pseudococcus calceolariae</i>	49 fam. botánicas	4, 5, 8
<i>Pseudococcus viburni</i> (Sin. <i>Ps. maritimus</i> , <i>Ps. affinis</i> )	98 fam. botánicas	13,4, 8, 11

\*Las citas bibliográficas se encuentran en el Anejo 1.

## 1.2. *PLANOCOCCUS CITRI* (RISSO) Y *PLANOCOCCUS FICUS* (SIGNORET)

El género *Planococcus* fue descrito por Ferris en 1950. El género está compuesto por 35 especies según la revisión efectuada por Cox (1989), y según Danzig *et al.*, (2014), por unas 40 especies, distribuidas principalmente en zonas tropicales y subtropicales. Solo *P. vovae* (Nasonov, 1908) y *P. matesovae* Danzig, 1986 habitan en zonas boreales. Muchas especies del género son importantes plagas en cultivos y plantas ornamentales. Se citan en 69 familias botánicas. Su distribución es cosmopolita en todas las regiones biogeográficas del mundo (SEL, 2003; en Ramos 2004). El género *Planococcus* es un género próximo a *Pseudococcus*, que ha motivado la existencia de numerosas sinonimias entre ambos. Ferris (Según Williams, 1962) considera que los caracteres esenciales que definen a *Planococcus* y lo diferencia de otros géneros próximos son:

- Barra anal en la superficie ventral de cada lóbulo anal: Presente en *Planococcus* y ausente en *Pseudococcus*
- Cerarios: 18 pares de cerarios sin seda auxiliar en *Planococcus* y 16 o 17 pares con sedas auxiliares en *Pseudococcus*. También se diferencia de otros géneros (*Crisicoccus*, *Delottococcus* y *Planococcoides*) por este carácter (Cox, 1989).
- Conductos tubulares con anillo: Ausente en *Planococcus* y presente en *Pseudococcus* al menos en el dorso.

Según Masten Millek *et al.*, (2008) tanto *P. citri* como *P. ficus* son originarias de la región Paleártica.

*P. citri*, según Pellizzari *et al.*, (2010) es una especie originaria de Asia tropical que se estableció en Europa durante el siglo XIX. Fue observado por primera vez en Francia en el año 1813, donde fue descrita por primera vez por Risso con el nombre de *Dorthisia citri*, a partir de muestras tomadas en cítricos en el departamento francés de los Alpes Marítimos. Posee diferentes sinónimos (Cox, 1989): *Dorthisia citri* Risso, 1813; *Phenacoccus spiriferus* (Hempel, 1900); *Planococcoides cubanensis* (Ezzat & McConnell, 1956); *Planococcus cucurbitae* (Ezzat & McConnell, 1956). En España apareció en 1879, donde se considera una de las plagas más importantes de cítricos

desde mediados del siglo XIX por lo que la distribución es también muy amplia extendiéndose por toda el área peninsular, Baleares y Canarias.

En cambio *P. ficus* es una especie nativa de la cuenca mediterránea incluyendo España. Fue descrita por Signoret en 1875. Posee diferentes sinónimos (Cox, 1989): *Dactylopius ficus* Signoret, 1875; *Dactylopius subterraneus* (Hempel, 1901); *Dactylopius vitis* (Lichtenstein, 1870); *Pseudococcus ficus* (Fernald, 1903); *Pseudococcus subterraneus* (Fernald, 1903); *Pseudococcus vitis* (Fernald, 1903); *Pseudococcus citrioides* (Ferris, 1922); *Planococcus citrioides* (Ferris, 1950); *Planococcus vitis* (Ezzat & McConnell, 1956). Es una especie dominante en los viñedos del área mediterránea peninsular. También está muy extendida en el continente americano (en países con importancia vitivinícola) y en otras áreas geográficas como India, Pakistán y Sudáfrica (Beltrà y Soto 2010).



Figura 8. Distribución *P. citri* (Plantwise, 2014)



Figura 9. Distribución *P. ficus*. Elaborado a partir de los datos del USDA (2014)

Actualmente son cosmopolitas, es decir están distribuidas mundialmente (Figura 8 y Figura 9) y poseen gran importancia en el área mediterránea.

Durante mucho tiempo no se tenía claro si *P. citri* y *P. ficus* eran la misma o dos especies distintas, pero actualmente esta distinción es aceptada universalmente (Ezzat & McConnell, 1956; De Lotto, 1975; Danzig, 1977; Cox, 1981; en Cox 1989). El aspecto general a nivel macroscópico de las hembras de ambas especies es similar: cuerpo oval, plano, color anaranjado; patas naranja-amarillentas, en la mayoría de casos mismo color que el cuerpo; cuerpo recubierto por una capa de cera polvorienta muy débil; 18 pares setas céreas ligeramente arqueadas, más largas en zona anal; con 1 línea longitudinal más oscura que atraviesa su dorso (Moreno Salmerón, 2011). Aunque en las descripciones proporcionadas por Cox (1983) se describa una variabilidad de tamaño y ciertas estructuras microscópicas fáciles de apreciar entre ambas especies, sin embargo caen dentro del rango de variación normal y no se pueden considerar como una clave para distinguir entre *P. citri* y *P. ficus* (Tranfaglia *et al.*, 1982; Cox 1983).

### 1.2.1. MORFOLOGÍA

#### 1.2.1.1. MORFOLOGÍA DE LAS HEMBRAS ADULTAS DE *P. CITRI*

Según Cox (1989), los especímenes montados poseen forma oval, de 1,6-3,2 mm de longitud y 1,0-2,0 mm de anchura (Figura 10). El margen del cuerpo con la serie completa de 18 pares de cerarios, cada uno con dos setas cónicas, excepto el preocular que puede tener 1 o 3.

Patas alargadas, el trocánter + fémur del tercer par mide entre 220-350  $\mu\text{m}$ , y la tibia + tarso 260-420  $\mu\text{m}$ . El ratio tibia+tarso/trocánter + fémur es de 1.1-1.3. Poros translúcidos presentes en coxa y tibia posteriores. Lado interno de los ostiolos moderadamente esclerotizados. Circulus cuadrado con 120-200  $\mu\text{m}$ . Seda cisanal más corta que las sedas del anillo anal. Cerario del lóbulo anal situado en una pequeña área esclerotizada.

Ventre con poros multiloculares: alrededor de la vulva, en una fila simple o doble a lo largo del borde posterior del segmento abdominal III-VII, en una fila simple a lo largo del borde anterior de los segmentos V-VII, en grupos marginales de los segmentos abdominales IV-VII y a veces unos pocos dispersos sobre el área media del

tórax y cabeza pero no más de un total de 6 detrás las coxas anteriores. Poros triloculares numerosos y regularmente distribuidos. Conductos tubulares de tipo collar oral de dos tamaños, los menores distribuidos en filas a través de las áreas medias de los segmentos abdominales I-VII y los mayores en grupos marginales de tamaño variable por todo el vientre, incluido cabeza y tórax, y dispersos por las zonas medias del tórax. Poros simples o discoidales del mismo tamaño que los poros triloculares, escasos pero regularmente distribuidos

Dorso sin poros multiloculares. Conductos tubulares sin anillos aparentes y ligeramente más largos que los ventrales, a menudo presentes junto a los cerarios, 1 o 2 presentes en áreas medias. Los poros triloculares se encuentran por el vientre. Poros simples de dos tamaños, los pequeños menores que los pequeños de la zona ventral, dispersos por todo el dorso, y los poros más grandes alrededor del doble de los poros triloculares presentes en grupos pequeños a lo largo de la línea media del tórax y segmentos abdominales anteriores. Sedas flageladas de longitud moderada, las más largas en los segmentos abdominales VI-VII de 30-35  $\mu\text{m}$



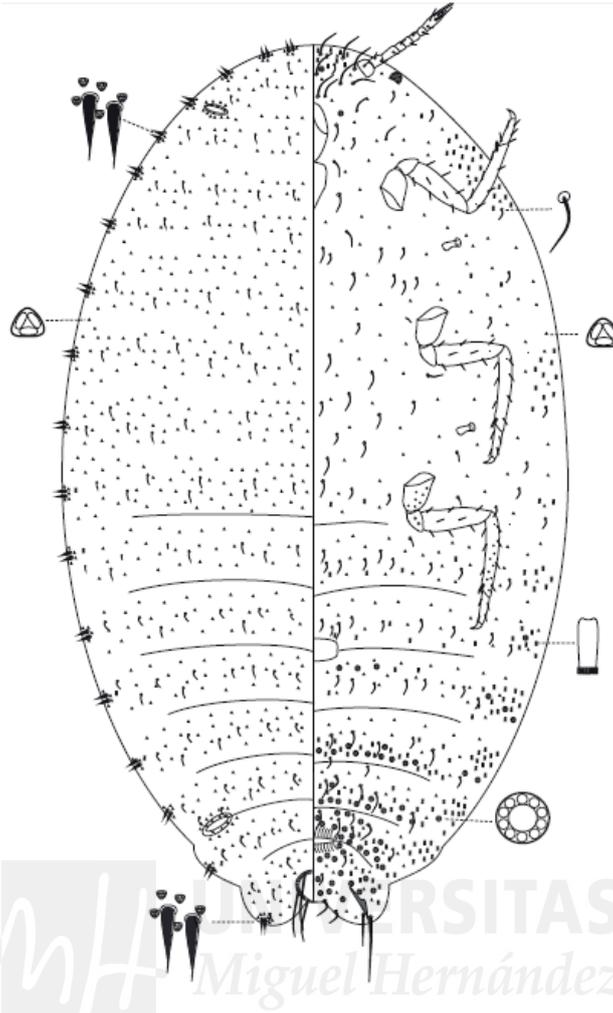


Figura 10. Hembra adulta de *P. citri* (Danzig, 2010).

#### 1.2.1.2. MORFOLOGÍA DE LAS HEMBRAS ADULTAS DE *P. FICUS*

Según Cox (1989), los especímenes montados poseen forma oval, de 1,4-3,2 mm de longitud y 0,8-2,2 mm de anchura (Figura 11). El margen del cuerpo con la serie completa de 18 pares de cerarios, cada uno con dos setas cónicas, más delgadas hacia la zona anterior del cuerpo. Patas alargadas, el trocánter + fémur del tercer par mide entre 235-355  $\mu\text{m}$ , y la tibia + tarso 275-395  $\mu\text{m}$ . El ratio tibia+tarso/trocánter + fémur es de 1.01-1.17. Poros translúcidos aparentes en coxa y tibia posteriores y a menudo también en el fémur. Lado interno de los ostiolos moderadamente esclerotizados. Circulus cuadrado con 115-150  $\mu\text{m}$ . Seda cisanal más corta que las sedas del anillo anal. Cerario del lóbulo anal situado en una pequeña área esclerotizada.

Vientre con poros multiloculares: alrededor de la vulva, en una fila simple o doble a lo largo del borde posterior del segmento abdominal III-VII o II-VII, en una fila simple a lo largo del borde anterior de los segmentos V-VII, en grupos marginales de

los segmentos abdominales posteriores como máximo hasta el segmento II y a menudo en grupos de hasta 12 poros detrás de cada coxa anterior dispersos sobre el área media del tórax. Poros triloculares moderadamente numerosos y regularmente distribuidos. Conductos tubulares de tipo collar-oral de dos tamaños, los menores distribuidos en filas a través de las áreas medias de los segmentos abdominales V-VII y los mayores en escasos en filas en las zonas medias de los segmentos abdominales II-VII, en grupos marginales de los segmentos II-VIII, disperso por las zonas media del tórax. Poros simples o discoïdales a veces presentes en la cabeza y a veces hasta 3 poros presentes en cada margen de los segmentos torácicos. Poros simples ligeramente mayores a los poros triloculares, escasos pero distribuidos regularmente.

Dorso sin poros multiloculares. Conductos tubulares más largos que los ventrales, y frecuentemente con anillos distintos, en general solitarios y raramente en parejas a menudo presente junto algunos o a la mayoría de cerarios. Los poros triloculares se encuentran por el vientre. Poros simples de dos tamaños, los pequeños son minúsculos escasos y dispersos por todo el dorso, y los poros más grandes, aparentemente mayores que los poros triloculares presentes en grupos de 1-3 largo de la línea media del tórax y segmentos abdominales. Sedas largas y flageladas, las más largas en los segmentos abdominales VI o VII de 23-50  $\mu\text{m}$

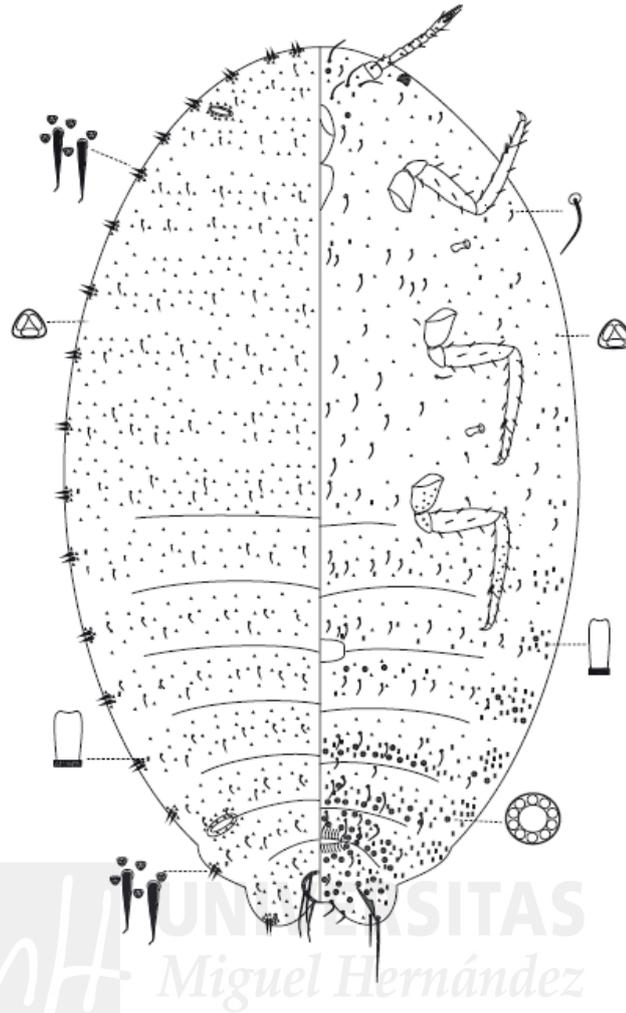


Figura 11. Hembra adulta de *P. ficus* (Danzig, 2010).

### 1.2.1.3. DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS ENTRE AMBAS ESPECIES

Según se desprende de Cox (1989); Tranfaglia *et al.*, (1982); Carnero (1986); Miller *et al.*, (2007); Danzig *et al.*, (2010), los caracteres que permiten la diferenciación de ambas especies son:

**Sedas de los cerarios:** Según Cox (1989) y Danzig *et al.*, (2010) *P. citri* presenta todos los cerarios con setas cónicas mientras que *P. ficus* presenta sedas más delgadas y con el ápice flagelado.

**Poros discoidales:** Según Cox (1989) tanto *P. citri* como *P. ficus* presentan la ausencia de poros discoidales junto al ojo, pero tan solo *P. citri* puede presentar poros discoidales junto al ojo.

**Conductos tubulares con anillo oral:** Según Cox (1989) ambas especies no poseen conductos con anillo oral junto al cerario frontal, sin embargo *P. citri* puede presentar alguno en ocasiones.

**Conductos tubulares collar-oral:** Este carácter sirve para diferenciar ambas especies en distintas zonas del cuerpo:

Según Cox (1989) y Danzig *et al.*, (2010) *P. citri* puede presentar entre las antenas más de 5 conductos collar-oral (hasta 35) mientras que *P. ficus* o en ocasiones *P. citri* no puede tener más de 5 conductos. Normalmente estos conductos se encuentran en grupos en la cabeza estando presentes la mayoría al lado de los 2 pares de cerarios frontales, habiendo en *P. citri* una media de 2,4-2,9 conductos junto a cada cerario y una media de 0 en *P. ficus* (Tranfaglia *et al.*, 1982).

Según Cox (1989) *P. citri* puede presentar más de conductos collar-oral entre la coxa media y el margen del cuerpo (sumando ambos lados) mientras que *P. ficus* o en ocasiones *P. citri* no puede tener más de 5 conductos.

Según Cox (1989) tanto *P. citri* como *P. ficus* presentan conductos collar-oral entre la coxa del primer par de patas y el margen del cuerpo, pero tan solo en *P. ficus* pueden estar ausentes estos conductos.

**Poros translucidos:** Normalmente tanto *P. citri* como *P. ficus* presentan poros translucidos en coxa y tibias de las patas traseras, pero tan solo *P. ficus* puede presentar en ciertas ocasiones poros translucidos en coxa, fémur y tibia.

**Setas dorsomediales:** Según Cox (1989) la longitud de las setas dorsales abdominales (entre los segmentos II-VII) son iguales o menores a  $40\mu\text{m} = 0,04\text{ mm}$  en ambas especies, pero únicamente se puede dar el caso de que estas sedas sean mayores a  $40\mu\text{m}$  en *P. ficus*. Para este carácter se puede tener como referencia la longitud de las sedas del cerario anal si son más cortas que las dorsomediales.

**Poros multiloculares:** Según Trafanglia *et al.*, (1982) y Carnero (1986) *P. citri* presenta una media de 0,6 poros en el protórax mientras que *P. ficus* presenta 3,3 (a cada lado).

## 1.2.2. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

*P. citri* se adapta muy bien a diferentes climas, por lo que su distribución mundial es muy amplia, estando en más de 120 países del mundo

Ambas especies son importantes plagas agrícolas en según qué cultivos. *P. ficus* comprende un rango de más de 20 hospedantes, encontrándose principalmente sobre vid, higuera y algunas plantas ornamentales entre otras. *P. citri* posee un enorme rango de hospedantes que comprende más de 200 especies, destacando cítricos, caqui, granado y un gran número de plantas ornamentales entre otras especies (Tabla 3 y Tabla 4).

**Tabla 3. Algunos cultivos hospederos de *P. citri* y *P. ficus* (Ben-Dov et al., 2001).**

Familia	Planta hospedante	<i>P. citri</i>	<i>P. ficus</i>
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i>	Presente	Presente
Annonaceae	<i>Annona cherimola</i>	Presente	
Apocynaceae	<i>Nerium oleander</i>	Presente	
Araliaceae	<i>Schefflera arboricola</i>	Presente	
Arecaceae	<i>Phoenix dactylifera</i>	Presente	Presente
Brassicaceae	<i>Brassica oleracea capitata</i>	Presente	
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Presente	
Convolvulaceae	<i>Ipomoea batatas</i>	Presente	
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita sp.</i>	Presente	Presente
Ebenaceae	<i>Diospyros kaki</i>	Presente	
Euphorbiaceae	<i>Jatropha curcas</i>	Presente	
Fabaceae	<i>Glycine max</i>	Presente	
Fabaceae	<i>Medicago sativa</i>	Presente	
Fabaceae	<i>Phaseolus vulgaris, Pueraria thunbergiana</i>	Presente	
Lamiaceae	<i>Ocimum basilicum</i>	Presente	
Lauraceae	<i>Persea americana</i>	Presente	Presente
Moraceae	<i>Ficus carica</i>	Presente	Presente
Musaceae	<i>Musa sapientum</i>	Presente	
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i>	Presente	
Oleaceae	<i>Olea europea</i>	Presente	Presente
Punicaceae	<i>Punica granatum</i>	Presente	Presente
Rosaceae	<i>Cydonia oblonga</i>		Presente
Rosaceae	<i>Malus domestica</i>	Presente	Presente
Rosaceae	<i>Malus pumila</i>	Presente	Presente
Rosaceae	<i>Pyrus communis</i>	Presente	
Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i>	Presente	
Rutaceae	<i>Citrus spp.</i>	Presente	
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Presente	
Solanaceae	<i>Solanum tuberosum</i>	Presente	Presente
Umbelliferae	<i>Apium graveolens</i>	Presente	
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i>	Presente	Presente

Tabla 4. Importancia de *P. ficus* y *P. citri* sobre cultivos en España (Beltrà y Soto, 2012).

	<i>P. citri</i>	<i>P. ficus</i>
Cítricos	***	
Vid	**	***
Higuera		***
Caqui	***	
Granado	**	
Otros frutales	***	
Hortícolas	**	
Ornamentales	***	*
Principales hospedantes en España	Naranja, Clementino, Caqui	Vid, Higuera

Las condiciones climáticas más favorables para su desarrollo son calor y humedad. Los estados inmaduros son muy sensibles a la desecación. Las larvas son muy móviles hasta estados más avanzados.

En otros países mediterráneos se observan de cuatro a seis generaciones anuales (Avidov y Harpaz. 1969; Santorini. 1977; Longo y Russo. 1986; Barbagallo *et al.*, 1993; en García Marí, 2012). En España tiene cuatro a cinco generaciones anuales (Gómez Clemente. 1943; en García Marí, 2012). Martínez Ferrer *et al.*, (2003) detectan cinco generaciones al año en el este de la Península Ibérica y calculan por observaciones de capturas de machos en campo, que la temperatura umbral de desarrollo de *P. citri* es de 8,3 °C y la integral térmica es de 562 grados días. Según este estudio, cada generación dura de 50 a 55 días, excepto la tercera, en agosto, que dura 40 días. Hay un gran solape de estados de desarrollo debido a que no invernán en ninguna forma en especial, sino que se detienen o se ralentizan su crecimiento durante la época fría en cualquier forma móvil. Este solape de generaciones hace el cálculo de los parámetros térmicos y el número de generaciones anuales complicado. El invierno lo pasan normalmente en el mismo árbol, escondidas en hojas, ramas o corteza del tronco, y también en hormigueros o en el suelo.

La reproducción es siempre bisexual y los machos son especialmente abundantes en otoño. El número de huevos que pone cada hembra es variable con la época del año y el sustrato sobre el que se desarrolla, oscilando en general entre 100 y 400 huevos por hembra según los autores (Franco *et al.*, 2000; en García Marí. 2012). Cuando tiene repleto su ovisaco, se desprende de él y comienza a elaborar otro para ir depositando los

huevos y así sucesivamente. Es máximo en primavera y mínimo en otoño (Bodenheimer, 1951; en García Marí, 2012). La temperatura a la que se observa mayor fecundidad es de 18-20°C (Franco *et al.*, 2000). Las hembras desarrolladas sobre frutos en crecimiento son de mayor tamaño y más fecundadas (300 huevos por hembra) que las desarrolladas sobre hojas (200 huevos por hembra) (Franco *et al.*, 2000; en García Marí 2012).

Ambas especies poseen feromonas sexuales específicas. La feromona sexual de *P. citri* fue identificada por Tremblay *et al.*, (1982b) como acetato de (1R,3R)-cis-2,2-Dimetil-3—isopropenilciclobutanometanol y la de *P. ficus* por Zada *et al.*, (2003) como (S)-5-Metil-2-(prop-1-en-2-yl)-hex-4-enyl 3-metilbutanoato. Tranfaglia *et al.*, (1982) consiguió en condiciones de laboratorio el cruzamiento de ambas especies utilizando extractos de feromonas sexuales de las hembras vírgenes como “inductores del apareamiento”, y concluye que no se podía descartar la aparición de híbridos en los hospedantes en los que conviven ambas especies (p.ej. en vid). También observó que la descendencia híbrida mostraba caracteres diferentes dependiendo de cuál era la especie que actuaba como madre y como padre. Recientemente en estudios sobre los patrones de atracción a las feromonas sexuales en poblaciones naturales de *P. ficus* y *P. citri*, se ha puesto de manifiesto la existencia de atracción en machos de *P. citri* a la feromona de *P. ficus*. Al secuenciar los fragmentos del gen ITS-2 se ha observado la existencia de secuencias híbridas en hembras de *P. citri*, habiendo evidencias de la existencia de flujo genético entre ambas especies Kol Maimon *et al.* (2014).

### 1.2.3. ENEMIGOS NATURALES

En España no existe un gran número de enemigos naturales contra *P. citri* y *P. ficus*, siendo necesario emplear otros métodos a parte de esta lucha biológica. Entre los parasitoides destacan *Anagyrus pseudococci* (Figura 12), que parasita hembras jóvenes y L3, *Leptomastidea abnormis*, parasitoide de L1 y L2 y *Leptomastix dactylopii*, entre otros. En España son las especies más comunes (Ripollés, 1993; Martínez Ferrer, 2003; en García Marí 2012), siendo *Leptomastix dactylopii* (Figura 14) la más importante para el control biológico en cítricos.



**Figura 12. Adultos de *Anagyrus pseudococci*, hembra (izq.) y macho (dcha.) (Foto del IVIA).**

*Leptomastix dactylopii* actúa sobre L3 y hembras jóvenes de *P. citri*. El insecto no se establece permanentemente en campo por lo que es necesario criarlo en insectarios.

Los principales depredadores de pseudocócidos pertenecen a los grupos de los coccinélidos, neurópteros, dípteros cecidómidos y chamaeídos y lepidópteros licénidos, siendo de mayor importancia en España *Cryptolaemus montrouzieri* Muslant (Figura 13).



**Figura 13. Adulto de *Cryptolaemus montrouzieri* junto a colonia de *P. citri* (izq.) (Foto de J. Catalán, IVIA).**



**Figura 14. Adulto de *Leptomastix dactylopii* (Foto del IVIA).**

*C. montrouzieri* se alimenta de huevos (en estado de larva) y hembras (en estado adulto) de *P. citri* pero en cambio no tiene la misma eficacia con *P. ficus*. De hecho hay autores que citan una ineficacia de *C. montrouzieri* sobre *P. citri* en parral cuando todavía se pensaba que la única especie sobre vid era *P. citri*. *C. montrouzieri* presenta el inconveniente de que no resiste bien el frío en la zona del mediterráneo español, teniendo que criarlo en insectarios. Además es bastante sensible a los tratamientos fitosanitarios (tabla 5) por lo que es necesario realizar sueltas 15 días después de cualquier tratamiento.

#### 1.2.4. DAÑOS

*P. citri* y *P. ficus* son muy polípagos atacando a un amplio rango de hospedantes. Debido a la importancia de los cítricos y de la uva de mesa en la zona que ocupa el presente trabajo este apartado estará enfocado sobre todo a los daños producidos en estos cultivos.



**Figura 15. Algodoncillo formado por cochinillas entre limones.**

Los hábitos alimenticios del insecto provocan la reducción de vigor en la planta, emisión de melaza y desecación de órganos, en vid esto se traduce en brotes más cortos, ligero arropollamiento y disminución de la cosecha al año siguiente (MAGRAMA. 2004).

Sobre la melaza excretada se desarrollan hongos “negrilla” que dificultan la respiración, la fotosíntesis, el control químico y el control biológico. Esta además sirve de cobijo a otras plagas como los lepidópteros pirálidos *Apomyelois Zeller* y

*Cryptoblabes gnidiella* Millière (“barreneta”) (Beltrà y Soto 2010). También otras plagas, tales como diaspinos y ácaros, se refugian bajo la negrilla, siendo más difícil su control (Martínez, 2003).



**Figura 16.** Negrilla producida por la secreción de melaza de *P. citri*.

Otros daños atribuidos a la alimentación son la aparición de manchas cloróticas, decoloraciones e hipertrofias en la corteza del fruto (Franco 2000; en Martínez, 2003). Debido a que en cítricos se sitúa en el cáliz de frutos recién cuajados puede provocar su caída prematura (Bdenheimer. 1951; en Martínez. 2003). Se ha demostrado que elevadas densidades pueden provocar disminuciones de producción, peso y calibre (Silvia y Mexia. 1997; en Martínez, 2003).



**Figura 17. Daños directos producidos por pseudocócidos a la izq. (Foto del IVIA) y hembra adulta de *P. citri* bajo el cáliz sobre naranjo.**

Aunque el rajado de los frutos en cítricos es un trastorno fisiológico, la presencia de densas poblaciones puede favorecerlo debido a sus hábitos alimenticios (Franco 2000; en Martínez, 2003).

Todos estos daños atribuidos a la alimentación del insecto resultan en una depreciación del fruto, perdiendo gran parte de su valor comercial cuando está destinado a consumo en fresco, sobre todo en uva de mesa.

Por otra parte, es especialmente importante su potencial como agente de transmisión de virus en viñedos, entre ellos los virus del enrollado de la vid GLRaV-3 y GLRaV-5 y el complejo de madera rugosa (Engelbrecht y Kasdorf, 1990; Charles, 1993; Cabaleiro y Segura, 1997; Petersen y Charles, 1997; en Beltrà y Soto, 2012). *P. citri* actúa como vector del virus del brote hinchado del cacao (Cox, 1989).

Cabaleiro y Segura (2006) estudiaron en España la transmisión por *P. citri* del virus del enrollado de la hoja Grapevine Leafroll-associated Virus Tipo 3 (GLRaV-3), aunque posteriormente la especie fue identificada como *P. ficus* (Ben-Dov *et al.*, 2001). Otro virus de la vid transmitido por *P. ficus* es el Grapevine virus A (GVA). (Rosiglionne *et al.*, 1983; en Saccaggi, 2006).

#### 1.2.5. MÉTODOS DE CONTROL.

Para el control de esta plaga es fundamental tratar los primeros focos para evitar que se extienda, ya que es muy difícil alcanzarla posteriormente debido a la masa algodonosa y a los lugares donde se ubica el insecto.

### 1.2.5.1. MUESTREO Y UMBRALES

Se puede llevar a cabo mediante diferentes metodologías, destacando la observación directa de los frutos u otras partes de los órganos vegetales así como el uso de trampas con feromonas para la captura de machos adultos.

El umbral para la intervención con insecticidas específicos se sitúa en el 5-10% de frutos contaminados por larvas jóvenes en pequeñas colonias en verano y el 15% en otoño (Llorens 1990). Más recientemente, estudios realizados en España en cítricos, los umbrales de tratamiento se han estimado en función del órgano muestreado y del tipo de muestreo. Los umbrales y muestreos a tener en cuenta en cada mes son (Beltrà y Soto 2012):

- En julio se recomienda un muestreo bajo el cáliz, enumerativo (50 frutos al azar) o binomial (180 frutos al azar). Los umbrales en este caso serían de 2,5 insectos por fruto o 50% de cálices invadidos, respectivamente.
- A partir del mes de agosto y en meses posteriores el número de frutos a muestrear es mucho más elevado, entre 110-300 frutos para el muestreo enumerativo y más de 300 para el binomial, estimando un umbral de una población de 0,2 a 1 insecto por fruto o de 10-30% de frutos ocupados, respectivamente.

Las trampas de machos también pueden ser utilizadas en el muestreo con valores variables en los umbrales según el mes en que éste se realiza. En la actualidad se dispone de feromona sintética tanto para *P. citri* como para *P. ficus* (De Liñán, 2014)

### 1.2.5.2. TÉCNICAS CULTURALES:

En el caso de que aparezcan focos de cochinillas hay que actuar de manera adecuada y eficaz tras su detección evitando de esta manera problemas futuros. Tras localizar un foco es conveniente eliminar el foco si no es muy grande y desecharlo con precaución de no facilitar la dispersión del insecto. Se deben controlar las plantas que puedan actuar de reservorio de cochinillas como por ejemplo las convolvuláceas y por el contrario preservar plantas que puedan servir como reservorio para la fauna útil (*C. montrouzieri* y *L. dactylopii*). También es conveniente el saneamiento de las herramientas de cultivo para evitar la propagación a otras plantas de cochinillas que puedan quedar sobre estas (Tanwar *et al.*, 2.007).

El descortezado en el caso de la viña también puede contribuir al control de las cochinillas, pues estas quedan desprotegidas y los tratamientos posteriores con pesticidas tendrán una mayor eficacia.

La fertilización debe estar ajustada a las necesidades del cultivo, ya que el exceso de nitrógeno puede facilitar la proliferación de altas poblaciones de pseudocóccidos pues aumenta el tamaño de las hembras y el número de huevos en el ovisaco y por otro lado favorece el aumento del follaje de la planta dándole un mejor cobijo al insecto (Hogendorp *et al.*, Raupp *et al.*, 2010 ; en Beltrà y Soto 2012). Algunas técnicas como la solarización también pueden dar resultado contra las cochinillas presentes en las raíces.

El control de las hormigas también influye sobre las poblaciones de Pseudococcidos, ya que establecen relaciones simbióticas con las cochinillas (Gulla, 1997). Estas obtienen una importante fuente de alimentación al consumir la melaza segregada por las cochinillas y a cambio benefician a las cochinillas proporcionándole transporte a nuevas áreas de la planta, defensa frente a la acción de depredadores y parasitoides y la limpieza de melaza que puede causar la muerte de los estados juveniles cuando las concentraciones aumentan en exceso. Por todo ello, la presencia de hormigas entre las colonias de pseudocóccidos puede alterar notablemente su control biológico (Campos *et al.*, 2006; Mgocheki y Addison, 2009).

### 1.2.5.3. CONTROL QUÍMICO

Según el MAGRAMA (2014), las materias activa permitidas para el control químico de cochinillas son: clorpirifos, aceite de parafina, fosmet, dimetoato, metil clorpirifos, clorpirifos, azadiractin, piriproxifen, tiametoxam, abamectina + piretrinas, abamectina + tiametoxam, acetamiprid, polisulfuro de calcio, aceite de colza + piretrinas, deltametrin, spirotetramat

Entre los insecticidas utilizados para el control de los pseudocóccidos destacan las familias de los organofosforados (clorpirifos) y neonicotinoides (imidacloprid, tiametoxam) (Daane *et al.*, 2006; Castle and Prabhaker, 2011; en Beltrà y Soto 2012). Últimamente ha destacado el spirotetramat perteneciente a la familia de los inhibidores de la acetil CoA carboxilasa.

También es frecuente el uso de aceites minerales y jabones potásicos, pero estos se utilizan más para los primeros estadios de desarrollo.

Los enemigos naturales de los pseudocóccidos son muy sensibles a los tratamientos fitosanitarios, por lo que se han de tener muy en cuenta a la hora de elegir la materia activa. En la

**Tabla 5** se señala efecto secundario que tienen algunos fitosanitarios sobre dos enemigos naturales de los pseudocóccidos. La pérdida de esta fauna auxiliar puede conducir a la necesidad utilizar una mayor cantidad de productos fitosanitarios favoreciendo la aparición de resistencias.

**Tabla 5. Efectos secundarios de plaguicidas sobre fauna útil. 1.- Inocuo; 2.- Ligeramente tóxico; 3.- Moderadamente tóxico; 4.- Tóxico (IVIA, 2014).**

Materia activa	C. montrouzieri			L. dactylopii
	Larva	Pupa	Adulto	Adulto
Abamectina	4	1	3	4
Aceite parafinico	1-2	1	1	2
Acetamiprid	3	2	3-4	2
Azadiractin		1-2	1-2	3
Bacillus	1	1	1	1
Clofentezin	2	1	1	
Clorpirifos	1	2	3	3-4
Etofenprox			4	
Etoxazol				
Fenpiroximato			1	
Hexitiazox	1-2	1-2	1-2	
Imidacloprid	4	4	4	3-4
Lambda cihalotrin			2	
Lufenuron		1	1	
Metilclorpirifos		1		3-4
Pimetrozina		2	2	
Piridaben				
Pirimicarb	2	2	2-3	1
Piriproxifen	4	4	4	2
Spinosad (cebo)			1	3-4
Spirodiclofen				
Tebufenpirad	2	1	1	
Tiametoxam	4	4	4	

#### 1.2.5.4. CONTROL BIOLÓGICO

En España el control biológico se realiza por inoculación o inundación, que consiste en la liberación de estos enemigos naturales. Se realizan sueltas a final de primavera de *C. montrouzieri* y *L. dactylopii* en los meses de septiembre y octubre en los que *C. montrouzieri* es menos eficaz. Este control se considera parcial pues *C. montrouzieri* no resiste el frío y *L. dactylopii* no se establece de forma permanente. Según que agente se utilice para el control biológico de esta plaga es necesario conocer si es *P. ficus* o *P. citri*, pues como se ha dicho anteriormente algunos tan solo presentan eficacia contra una de las especies, como por ejemplo *L. dactylopii* que solo actúa sobre *P. citri*.

Recientemente también se han iniciado experiencias para el control de *P. ficus* en uva de mesa con *Anagyrus pseudococci* (Beltrà y Soto 2012).

#### 1.2.5.5. CONTROL MEDIANTE FEROMONAS

El uso de feromonas hasta ahora se ha limitado para realizar monitoreo de machos utilizando feromonas sexuales (Franco *et al.*, 2009; en Beltrà y Soto 2010). En la actualidad se han realizado experiencias de trapeo de masivo de machos y confusión que pueden desarrollarse como métodos efectivos de control (Walton *et al.*, 2006; Teshiba *et al.*, 2009; en Beltrà y Soto 2012). En Italia se ha empleado el uso de feromonas de *P. ficus* con resultados prometedores (Pasqualini y Pradolesi, 2013).

A priori algunos de los principales inconvenientes que presentan estas técnicas son la identificación de la especie que se tiene en el cultivo, pues en campo no es igual de efectivas las feromonas de *P. ficus* para *P. citri* y viceversa, requiriendo los servicios de un experimentado taxónomo para su identificación. Otro inconveniente es la poca eficacia que puede presentar en ciertas ocasiones ya que se puede dar el caso de colonias en que ambas especies se encuentran mezcladas.

### 1.3. MÉTODOS MOLECULARES EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE PSEUDOCÓCCIDOS

En las especies plaga es necesario realizar una identificación rápida, precisa y una identificación incorrecta de una especie plaga puede ocasionar la aplicación de sistemas de monitoreo o de control basados en el uso feromonas erróneos, o a la liberación de enemigos naturales inadecuados, ya que estos métodos suelen ser muy específicos, o a la aplicación de tratamientos fitosanitarios o de otras medidas de control ineficaces e incluso a infravalorar o sobrevalorar su capacidad de vector de enfermedades. La identificación correcta de cochinillas algodonosas es problemática, costosa en tiempo y requiere de taxónomos expertos, además, en la mayoría de los casos para una identificación fiable sólo las hembras adultas pueden emplearse, mientras que los inmaduros, macho y especímenes dañados no pueden identificarse (Saccaggi, 2006).

Las técnicas moleculares, sobre todo las basadas en el ADN, permiten una identificación rápida y precisa de una especie y se ha utilizado con éxito en especies crípticas, biotipos o incluso poblaciones. Las regiones del ADN nuclear más usadas por su capacidad informativa en estudios filogenéticos y de diferenciación e identificación de especies de insectos son: los genes que codifican las diferentes subunidades de los ribosomas (28S, 18S) y sus espaciadores internos transcritos (ITS); y los genes relacionados con el aparato de traslación como el factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ). Cuando se trata de identificar especies próximas o en estudios a niveles intraespecíficos, se suele recurrir al ADN mitocondrial (ADNm) (Caterino *et al.*, 2000). En el ADNm resulta más fácil encontrar marcadores específicos. Las razones están en su evolución más rápida, su tasa de mutación es 5-10 veces mayor que la del ADN nuclear. Ello es debido al ambiente oxidante de la mitocondria, a los radicales libres generados en la respiración, a la ausencia de histonas que lo protejan, y a la menor eficiencia en los mecanismos de reparación del ADN de estos orgánulos. El ADNm es una molécula de unas 14-17 kpb en animales. Se hereda por vía materna, se encuentra en estado haploide, no se recombina, y se presenta en numerosas copias en la célula. Se conocen con detalle las regiones codificantes de los genes que contiene y se han desarrollado diferentes cebadores a partir de zonas de los genes que por intervenir en funciones esenciales del metabolismo se mantienen muy conservados, denominándose cebadores universales al ser válidos para diversas especies (Kocher *et al.* 1989, Behura 2006). Una excelente compilación de cebadores universales en animales en general, y de insectos en



conservada, y ha sido muy usada en estudios filogenéticos y taxonómicos de identificación de especies, siendo incluso propuesta para desarrollar un “código de barras genético universal” para la identificación de todos los organismos (Hebert *et al.*, 2003a y b, en Saccaggi 2007).

Se revisan a continuación algunos de los trabajos de marcadores moleculares realizados con especies de pseudocóccidos en general y de especies de *Planococcus* en particular.

Hay dos trabajos básicos que abordan a gran escala las relaciones filogenéticas dentro de la familia de los Pseudococcidae, son los trabajos de Downie y Gullan (2004) y de Hardy *et al.* (2008). En el conjunto de ambos trabajos se secuencian, en 101 especies de la familia, tres genes nucleares: factor de elongación 1 $\alpha$  (EF 1 $\alpha$ ) en concreto los fragmentos no contiguos EF-1 $\alpha$  50 y EF-1 $\alpha$  30; las regiones de expansión D2 y D10 de la subunidad mayor (28S) de los ribosomas y una región de la subunidad menor (18S) de los ribosomas. El árbol filogenético de la familia muestra que *P. citri* y *P. ficus* están estrechamente relacionados.

Ulubaş Serçe *et al.* (2007) mediante la técnica RAPD-PCR, basada en el uso de cebadores de secuencia arbitraria que amplifican zonas al azar distribuidas por todo el genoma, estudian las relaciones de seis especies de Turquía, entre ellas *P. citri* y *P. ficus*. Aunque encuentra cebadores para distinguir entre las especies, las diferencias entre *P. citri* y *P. ficus* son bajas, y el análisis cluster de los datos moleculares los encuadran en el mismo grupo. Demontis (2007) emplea también la misma técnica con machos capturados en trampas de feromonas, encontrando diferencias clara entre *P. ficus* y *P. citri* con el cebador OPL-12.

Mediante PCR-RFLPs, que consiste dígir con enzimas de restricción un fragmento de ADN amplificado previamente con PCR, Cavallieri *et al.* (2008) diferencian *P. ficus* y *P. citri* con esta técnica al aplicarla a un fragmento del COI y comprueba que son varias las enzimas de restricción que permiten la identificación, aunque a diferenciación más clara la obtienen con Hinf I. Rung *et al.* (2009), a partir de la amplificación de COI desarrolla un esquema en el que se emplean hasta 3 enzimas de restricción (BspH1, BsmH1, y HphI) que le permite diferenciar *P. citri*, *P. minor* y una línea de *P. citri* de Hawai diferenciada genéticamente.

Son abundantes los trabajos de secuenciación. Rung *et al.* (2008), secuencian el COI y el EF-1 $\alpha$  de poblaciones del complejo de especies formado por *P. citri* y *P. minor* (Maskell), intentando buscar caracteres para una identificación fiable, sin embargo obtiene información diferente a partir de cada marcador y encuentra la existencia en Hawai de un tercer grupo morfológicamente simia a *P. citri* pero genéticamente distinto.

Malausa *et al.* (2010), con 11 especies plaga de la familia, entre ellas *P. citri* y *P. ficus*, prueba la amplificación con diferentes marcadores usados en estudios previos y secuencian cinco regiones que muestran buenas amplificaciones: 2 regiones del ADNm que codifican el gen COI, las regiones del ADN nuclear 28S-D2 e ITS-2 y la región rpS15-16S de la bacteria endosimbionte *Tremblaya princeps*. Observa que con estos marcadores, además de permitir inferir relaciones filogenéticas entre especies, puede identificarlas todas. Observa también la existencia de variación intraespecífica en la secuencias de *P. citri*, *P. ficus* y en otras especies.

Similares trabajos de secuenciación, también en los que interviene Malausa, con resultados semejantes, son los de Abd-Rabou *et al.* (2012), Beltrá *et al.* (2012), Correa *et al.* (2012) y Pacheco da Silva *et al.* (2014). Abd-Rabou *et al.* (2012) secuencian fragmentos de las regiones 28S-D2; COI (LCO-HCO) e ITS-2 en 17 especies de 10 géneros. Beltrá *et al.* (2012) y el de Pacheco da Silva *et al.* (2014) en el que secuencian fragmentos de las regiones COI (regiones 2183–2568 y LCO), 28S-D2 e ITS2, y la región LeuA-16 S del ADN de la bacteria endosimbionte *Tremblaya princeps*. En el trabajo de Beltrá *et al.* (2012) emplean 10 especies, entre ellas *P. citri*, pero no *P. ficus*, obtenidas sobre plantas ornamentales en el Este de España. Pacheco da Silva *et al.* (2014) emplean muestras de viñedos de Brasil, detectando 17 especies, entre ellas *P. citri* y *P. ficus*. Correa *et al.* (2012), secuencian una región del COI y el ITS-2 con muestras procedentes de viñedos de Chile, encuentra 3 spp del gen *Pseudococcus* y consideran sorprendente la ausencia de *P. ficus*.

Kol-Maimon *et al.* (2014) secuencian fragmentos de ITS2 y del COI de *P. ficus* y *P. citri* para caracterizar las poblaciones, a fin de demostrar la existencia de hibridación entre poblaciones salvajes de las dos especies, encuentra secuencias híbridas en hembras con la morfología de *P. citri*, existiendo evidencias de la existencia de flujo genético entre ambas especies.

La secuenciación no resulta práctica para diferenciar especies de modo rutinario, pues es lenta de realizar y cara. Para la identificación rutinaria de especies resulta mucho más interesante la PCR múltiple o *Multiplex PCR*. Es un método rápido que permite la identificación de múltiples especies a la vez, pues se basa en el empleo, en una misma reacción PCR, de tres o más cebadores, una pareja por cada especie a identificar, o uno por especie y otro común a todas. Los cebadores son diseñados de forma que los fragmentos amplificados tienen un tamaño diferente para cada especie y por tanto pueden ser diferenciados en una electroforesis. Sin embargo la puesta a punto de esta modalidad es difícil, los cebadores son complejos de diseñar pues deben tener propiedades termodinámicas semejantes, sus secuencias de bases han de ser suficientemente diferentes como para que sólo anillen con la especie para la que están diseñados y no han de interaccionar entre sí (Saccaggi, 2006).

Uno de los primeros trabajos para diferenciar especies de pseudocóccidos es el de Beuning *et al.* (1999) que pone a punto el método para 4 especies del género *Pseudococcus* que afectan a la vid en Nueva Zelanda, diseñando a partir de secuencias de ITS una pareja de cebadores para cada especie.

Para identificar especies asociadas a la transmisión de virus en vid en Sudáfrica *Pseudococcus longispinus* y *P. ficus* y la especie con la que se confunde *P. citri* Saccaggi (2006) y Saccaggi *et al.* (2007) secuencian parte del COI y diseñan un cebador específico para cada especie que emplean junto con el cebador reverso universal Pat. Es el primero trabajo de identificación de *P. ficus* y *P. citri* mediante ésta técnica.

Demontis *et al.* (2007) desarrolla una pareja de cebadores específica para *P. ficus* y otra para *P. citri* a partir de las secuencias del COI de Saccaggi (2006). Daane *et al.* (2011), para identificar 7 especies de pseudocóccidos asociados a los viñedos Norteamericanos, entre ellas *P. ficus* y *P. citri*, desarrollan también a partir del COI un cebador específico para cada especie, que al combinar con un cebador reverso común, generan fragmentos comprendidos entre los 150 y 600 pb. Pacheco Da Silva *et al.*, (2014) también desarrolla parejas de cebadores para cinco especies de importancia económica en la vid en Brasil, entre ellas *P. ficus* y *P. citri*.

Otra técnica es la PCR de microsatélites. Martins *et al.* (2012) desarrollan y caracterizan 15 microsatélites polimórficos para *P. citri*. Comprueba la existencia de amplificaciones cruzadas con *P. ficus* en 8 microsatélites y en 3 de *Pseudococcus calceolariae*. Los microsatélites permiten fácilmente detectar variabilidad genética a

niveles intraespecíficos siendo una valiosa herramienta para estudios de la estructura genética de poblaciones, de flujos genéticos, y sistema reproductivos, etc. que sin duda contribuirán permitirán ahondar en el conocimiento de estas dos especies.



## 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La semejanza morfológica entre *P. citri* y *P. ficus* ha dado lugar a identificaciones erróneas. El objetivo del presente trabajo es aclarar la situación, en cuanto a la distribución de ambas especies en los cultivos de nuestro entorno. Para ello se han tomado muestras en las provincias de Alicante y Murcia de cochinillas algodonosas sobre diferentes plantas cultivadas y se han identificado mediante métodos morfológicos, a partir de preparaciones microscópicas de hembras adultas, y moleculares, mediante la amplificación por PCR de un fragmento en el ADN mitocondrial del gen que codifica la subunidad I de la enzima Citocromo Oxidasa (COI).



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MUESTRAS TOMADAS.

El estudio realizado se ha centrado en cultivos y plantas ornamentales de la zona del sureste Español, más concretamente en las provincias de Alicante y Murcia (Tabla 6).

El período de muestreos durante el año 2014 va desde marzo hasta julio. En cítricos el muestreo se ha realizado desde primeros de abril apareciendo las primeras muestras a primeros de marzo bajo la corteza y en zonas resguardadas del árbol a nivel del suelo, posteriormente han aparecido en la parte aérea en el envés de las hojas y en frutos desde mediados de mayo. Los especímenes se han buscado en zonas del tronco con la corteza levantada, en agrupaciones de frutos, en zonas con de la parte aérea con presencia de hormigas, síntomas de negrilla y colonias de moscas blancas en la que se pueden refugiar las cochinillas. En vid el muestreo se ha realizado desde marzo apareciendo las primeras muestra bajo la corteza al nivel del suelo en mayo y más adelante en la parte aérea resguardadas en el racimo de uva a últimos de junio. Para el muestreo en vid se ha buscado zonas del tronco con la corteza oscurecida, como mojada, con presencia de hormigas, y en zonas de la parte aérea con mucho follaje o racimos de uva en zonas con poca aireación y elevada humedad. En higuera y granado el muestreo va desde primeros de abril y últimos de junio respectivamente. Para el muestreo en estos cultivos se han observado las raíces y los chupones que han ido apareciendo a nivel del suelo junto al tronco del árbol. Otra parte de los muestreos se ha realizado en distintos viveros de plantas ornamentales en los que se dan unas condiciones óptimas de humedad y temperatura para la aparición de las cochinillas. El muestreo realizado va desde abril hasta principios de julio.

**Tabla 6. Muestras empleadas, con indicación del cultivo, lugar y provincia (A = Alicante, Mu = Murcia) y fecha de recogida. Las 3 muestras señaladas con \* se han mantenido en cría en laboratorio hasta su uso.**

Referencia	Cultivo	Lugar	Prov.	Fecha recogida
12007	Vid	Alhama de Murcia	A	11/05/2012
12009	Pimiento	Campo de Cartagena	Mu	14/05/2012
12016	Ciprés	Orihuela	A	15/05/2012
12033	Vid*	Orihuela-EPSO	A	06/06/2012
13014	Vid*	Elche - Estación Experimental del IVIA	A	20/09/2012
13015	Tomate*	Molina del Segura	A	07/09/2012
13051	Jatrofa	Santomera–Estación Experimental del CEBAS	Mu	01/10/2013
MC00	Phittosporum	Orihuela	A	02/04/2014
MC01	Limonero	Orihuela-EPSO	A	03/04/2014
MC02	Mandarino	Orihuela-EPSO	A	03/04/2014
MC03	Higuera	Orihuela-EPSO	A	03/04/2014
MC04	Naranja amargo	Orihuela-EPSO	A	09/04/2014
MC05	Cactus	Orihuela	A	09/04/2014
MC06	Higuera	Orihuela-EPSO	A	09/04/2014
MC07	Schefflera	San Vicente del Raspeig	A	10/04/2014
MC08	Margarita silvestre	San Juan de Alicante	A	13/04/2014
MC09	Malva silvestre	Orihuela-EPSO	A	14/04/2014
MC10	Malva silvestre	Torrellano	A	17/04/2014
MC11	Higuera	San Juan de Alicante	A	19/04/2014
MC12	Naranja amargo	Muchamiel	A	20/04/2014
MC13	(Ornamental)	Villafranca	A	24/04/2014
MC14	Limonero	Águilas	Mu	26/04/2014
MC15	Vid	Orihuela-Desamparados	A	29/04/2014
MC16	Ciprés	Orihuela-EPSO	A	30/04/2014
MC17	Schefflera	Villajoyosa	A	03/05/2014
MC18	Naranja amargo	Orihuela-EPSO	A	20/05/2014
MC19	Limonero	Orihuela-EPSO	A	20/05/2014
MC20	Vid	Orihuela-Desamparados	A	21/05/2014
MC21	Limonero	Orihuela	A	21/05/2014
MC22	Higuera	Orihuela-EPSO	A	29/05/2014
MC23	Schefflera	San Vicente del Raspeig	A	30/05/2014
MC24	Limonero	Orihuela-EPSO	A	02/06/2014
MC25	Naranja amargo	Orihuela-EPSO	A	02/06/2014
MC26	Buganvilla	La Alberca	Mu	05/06/2014
MC27	Hiedra	La Alberca	Mu	05/06/2014
MC28	Ficus elástica	San Juan de Alicante	A	06/06/2014
MC29	Naranja dulce	Murcia - Santa Cruz	Mu	12/03/2014
MC30	Vid	Alhama de Murcia	Mu	12/06/2014
MC31	Limonero	Orihuela-EPSO	A	13/06/2014
MC32	Naranja amargo	Orihuela-EPSO	A	16/06/2014
MC33	Granado	Orihuela-EPSO	A	23/06/2014
MC34	Vid	Orihuela-EPSO	A	23/06/2014
MC35	Limonero	Librilla	Mu	26/06/2014
MC36	Granado	Elche	A	26/06/2014
MC37	Naranja amargo	Orihuela-EPSO	A	30/06/2014
MC38	Naranja amargo	Orihuela-EPSO	A	31/06/2014
MC39	Granado	Orihuela-EPSO	A	02/07/2015
MC40	Limonero	Cartagena	Mu	09/07/2014
MC41	Jatrofa	Santomera–Estación Experimental del CEBAS	Mu	16/07/2014
MC42	Naranja dulce	Alhama de Murcia- Casas Nuevas	Mu	10/07/2014



## 3.2. PREPARACIÓN Y MONTAJE

Para la recolección de las cochinillas se utiliza el método llamado la recolección directa, que consiste en capturar los individuos directamente del hospedante. Con la ayuda de un pincel mojado en alcohol de 70° para que la cochinilla quede adherida y se guarda en un vial con alcohol de 70° hasta su preparación en el laboratorio. El alcohol además de conservarlas, facilita la eliminación de las ceras de las que están recubiertas.

### 3.2.1. DIGESTIÓN

El propósito de la digestión es eliminar los órganos internos y hemolinfa de la cochinilla. El cuerpo de la cochinilla queda completamente transparente, con el fin de que las estructuras de la parte ventral y dorsal sean visibles al microscopio.

La digestión se lleva a cabo en un proceso de varios días. El primer día, con ayuda de una lupa binocular, microespátula y pocillo, se coloca la cochinilla patas arriba, en el borde del pocillo y se perfora en el lado derecho, entre el 2° y 3er par de patas con una aguja entomológica del 00 (0,25 mm de diámetro). El agujero se ha de realizar siempre en el mismo sitio para no confundirlo cuando se observen las preparaciones al microscopio. Se introduce en un bote de cristal hermético con KOH al 10% para eliminar las ceras y se colocan sobre una placa calefactora a unos 37 °C durante 24 horas.

Al día siguiente se colocan dos gotas de KOH al 10% en un portaobjetos y se coloca un ejemplar encima con el dorso hacia arriba para dañar el insecto lo menos posible y no romperle las patas al manipularlo. Se aplica calor con un mechero bunsen, hay que prestar especial atención para no calentarlo excesivamente ya que si hierve la cochinilla puede salir despedida y perderse. A continuación ayudado por dos microespátulas y una lupa binocular, se presiona el ejemplar para que salgan los fluidos internos por el orificio realizado anteriormente y también por el ano. Repetir este proceso hasta que la cochinilla quede totalmente vacía (2 o 3 veces).

Una vez vaciado el ejemplar se coloca 1 gota de KOH al 10% sobre este y se coloca encima otro portaobjetos cruzado formando una X para que luego resulte más fácil separar ambas partes. Se calientan con un mechero bunsen realizando varios pases de unos segundos, hasta que se forman pequeñas burbujas pero sin llegar a ebullición y se ejerce presión para eliminar los restos que pudieran quedar en el interior del cuerpo.

### 3.2.2. TINCIÓN

Se coloca un par de gotas de agua destilada sobre el portaobjeto con el ejemplar durante varios minutos. A continuación se pasa a fucsina ácida al 1% (diluída en etanol al 70%), durante unos 15 minutos. Y luego se pasa a otro pocillo con agua destilada durante 5 minutos.

### 3.2.3. MONTAJE SEMIPERMANENTE

Sobre un portaobjetos, con la ayuda de una varilla fina de vidrio, se coloca una gota de unos 6-7 milímetros de diámetro del medio montante, líquido de Hoyer (agua destilada 25 g, goma arábica 15 g, hidrato de cloral 100 g, glicerina 10 g). Se alejan las burbujas de aire del centro para que no queden sobre la cochinilla que dificulte posteriormente su observación al microscopio. En cada preparación se colocan entre 2 y 3 individuos de la misma muestra. Se colocan siempre empezando por la izquierda, y una vez puestas todas se orientan en una misma dirección con las patas hacia arriba. Para disminuir el problema de que cambien la posición al dejar caer el cubre, se espera unos minutos antes de poner el cubre, con lo que el montante comienza a secarse y el movimiento de las cochinillas es menor. Posteriormente se limpia y se coloca el cubreobjetos de vidrio sin presionarlo con la ayuda de unas pinzas.

Finalizado el montaje, se rotulan y dejan las preparaciones sobre la placa calefactora en torno a un mes, para que el líquido Hoyer se quede bien seco. A continuación se sellan los bordes del cubreobjetos con laca de uñas transparente.

Las preparaciones microscópicas, se han realizado con la ayuda de una lupa binocular OLYMPUS SZ-60 con un ocular de 10x con zoom hasta 6,3 x. La identificación de las cochinillas y las fotografías se han realizado con un microscopio óptico LEICA DM 1000, equipado con un ocular 10x, objetivos 4x, 10x, 40x y 100x e iluminación mediante contraste de fases.

### 3.3. CLAVES EMPLEADAS Y CARACTERES CONSIDERADOS

En lo referente a diferenciación morfológica no existe mucha bibliografía, habiéndose empleado principalmente la clave interactiva de Miller et al. (2007) del Systematic Entomology Laboratory, ARS, USDA. Esta clave se basa fundamentalmente en Cox (1989), sirve para la identificación de especies de pseudocóccidos presentes en EEUU, que pertenece a la región Neártica y aunque España pertenece a la Paleártica, sus similitudes en cuanto a latitud y condiciones ambientales hacen que sean de gran utilidad. También han sido de gran utilidad las claves de otros autores, Tranfaglia *et al.*, (1982); Carnero (1986); Danzig *et al.*, (2010). Todas las claves basadas en la morfología de la hembra adulta.

A partir de las claves anteriores, para la identificación hasta el género *Planococcus*, se ha elaborado la siguiente lista de caracteres diagnóstico resumidos en la en la Tabla 7.

Con aquellos especímenes identificados como *Planococcus*, la identificación a nivel de especie se ha realizado considerando los caracteres descritos en el apartado 1.2.1.3, resumidos en la Tabla 8.

**Tabla 7. Caracteres para la identificación del genero *Planococcus*.**

	<b>Hembra adulta</b>
Nº artejos de la antena	8
Dentículo en uña	Ausente
Poros multiloculares en segmentos abdominales V, VI, VII y VIII	Presente
Poros multiloculares ventrolaterales	Presente
Numero de cerarios	18
Barra anal	Presente
Número de circulus	1
Forma del circulus	Reloj de arena, ovalado o circular

Tabla 8. Identificación de *Planococcus ficus* y *Planococcus citri*

	<i>Planococcus ficus</i>	<i>Planococcus citri</i>
Poros translucidos en patas posteriores	En coxa, fémur y tibia o coxa y tibia	En coxa y tibia
Poros discoidales junto al ojo	Ausente	Ausente/ Presente
Conductos con anillo oral junto al cerario frontal	Ausente	Ausente/ Presente
Conductos collar-oral entre la coxa frontal y el margen del cuerpo	Presente / Ausente	Presente
Más de 6 conductos collar-oral ente la coxa media y el margen del cuerpo (sumando ambos lados)	Ausente	Presente
Más de 5 conductos collar-oral ente las antenas	Ausente	Presente / Ausente
Sedas de los cerarios	Delgadas, con ápice flagelado	Cónicas
Poros multiloculares en el protórax	Media de 3,3 (a un lado)	Media de 0,6 (a un lado)
Sedas dorsales	Cortas, iguales o inferiores a las seda de los cerarios, pero también algunas largas	Cortas, iguales o inferiores a las sedas de los cerarios

### 3.4. ANÁLISIS PCR

#### 3.4.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Se han empleado un protocolo de extracción de ADN muy sencillo, tanto en tiempo de trabajo como en materiales. Se basa en el empleo de la resina de intercambio iónico Chelex 100® de Bio-Rad, y de proteinasa K. El Chelex 100® es una resina quelante que protege al ADN frente a nucleadas, al secuestrar entre otros al ión Mg, cofactor esencial para éstas. La proteinasa K también destruye nucleasas y otras proteínas, favorece la lisis celular y la liberación de ácidos nucleicos. Se emplea según se describe en Malloch *et al.* (2006) que emplean el método con pulgones. La extracción se realiza a partir de un individuo, bien en estado de larva o de hembra que no tenga aspecto de estar parasitado. Los individuos pueden estar vivos, congelados o incluso conservados en etanol. En este último caso, se dejan al aire o en la campana de vacío durante 10 minutos para favorecer la evaporación del etanol. A continuación se aplican 100 µl de Chelex 100, 100-200 mesh al 5%, y 4 µl de una disolución de proteinasa K 10 mg/ml. Con la ayuda de una punta de micropipeta y durante un minuto

aproximadamente se machaca el insecto contra las paredes del tubo. A continuación se incuba en baño de bloque metálico desde 2 h: 30 m. a 2 h: 50 m. a 56 °C y durante 8 min a 99 °C. Se conserva en frigorífico a 4 °C hasta su uso en la PCR. Al hacer la PCR se ha de dar un golpe de centrifuga y tomar solamente el sobrenadante, evitando tomar perlas de Chelex.

### 3.4.2. REACCIÓN PCR

La composición de la solución madre y el programa del termociclador se basan en el trabajo de Saccaggi (2006), aunque en este caso se ha aumentado la ADN polimerasa de 0,5 a 0,9 Ud/ $\mu$ l de reacción, y los dNTPs de 50 a 100  $\mu$ M. Cada reacción se ha realizado en un volumen final de 14  $\mu$ l. En la Tabla 9 se indican los reactivos, su concentración, los volúmenes empleados de cada uno de ellos y su concentración final en la reacción. Se incluye en cada reacción un control sin ADN.

**Tabla 9. Reactivos de la PCR y su concentración, volúmenes empleados para una reacción de 14  $\mu$ l, y su concentración en la reacción.**

Reactivos	Concentración de los reactivos	Vol. ( $\mu$ l)	Concentración en reacción
ADN Polimerasa BioTherm® de GeneCraft	5 U/reacción	0,25	1,25 U/reacción
Cebador Forward	10 $\mu$ M	0,56	0,4 $\mu$ M
Cebador Reverse	10 $\mu$ M	0,56	0,4 $\mu$ M
dNTPs Mix	10 mM	0,14	0,1 mM
Tampón BioTherm® de GeneCraft	10 X	1,40	1 X
Tris HCl pH 8,8 at 25 °C	670 mM	--	67 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160 mM	--	16 mM
Tween-20	0,1 %	--	0,01 %
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,12	4,0 mM
Agua milliQ estéril		7,97	
ADN		2,00	

Los cebadores empleados son los descritos en el trabajo de Saccaggi (2006) detallados en la Tabla 10 y Anexo 2. Estos cebadores anillan en una zona intermedia de la secuencia de la secuencia del gen COI [comprendido entre las bases 1470 y 3009 según la convención de Simon et al. (1994), que toma como referencia la secuencia completa del ADNm de *Drosophila yakuba* Burla (Diptera: Drosophilidae) (Clary and

Wolstenholme 1985)]. El cebador reverso, anilla en el gen contiguo correspondiente al ARNt-Leu (comprendido entre las bases 3012 y 3077). Los cebadores fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (Madrid). Los cebadores desalados, se presentaban liofilizados, antes de su uso, fueron hidratados con tampón TE pH 8 de modo que quedaron a una concentración final de 10  $\mu$ M.

**Tabla 10. Secuencias (Saccaggi, 2006) y propiedades termodinámicas de los cebadores utilizados (<sup>a</sup>Saccaggi (2006) y <sup>b</sup> Sigma-Aldrich).**

Nombre	Secuencia 5'→3'	Bases	Temp. de fusión	Fragmento (pdb) <sup>a</sup>
Forward <i>P. ficus</i> C1-J-2260 (Saccaggi, 2006)	TCAAATTATAAATCAAGAAAGGGGAAAAC	29	59 <sup>a</sup> 65,4 <sup>b</sup>	754
Forward <i>P. citri</i> C1-J-2427 (Saccaggi, 2006)	TAATTATTGCTATTCCTACAAGAATTAATAATC	32	58,5 <sup>a</sup> 61,7 <sup>b</sup>	587
Reverse TL2-N-3014, Alias Pat.(Simon <i>et al</i> , 1994)	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	25	58,4 <sup>a</sup> 65 <sup>b</sup>	--

En pruebas preliminares se realizaron PCR multiplex mezclando los 3 cebadores, estando el cebador común reverso TL2-N-3014 se empleó a una concentración un 25% superior, a 0,5  $\mu$ M, pero con las temperaturas de anillamiento empleadas se produce reacciones cruzadas, de modo que se optó por realizar PCR específicas para cada especie, es decir para cada muestra se han realizado dos reacciones, una con la combinación de cebadores C1-J-2260 + TL2-N-3014, que genera un fragmento de 754 pdb si la muestra es *P. ficus*, y otra PCR con C1-J-2427 + TL2-N-3014 que genera un fragmento de 587 pdb si la muestra es *P. citri*.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Primus 25 (MWG AG-Biotech, Germany). El programa consta de 3 fases. La primera fase es una desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos. La segunda fase consta de 35 ciclos, cada uno de ellos posee una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 40 segundos, otra de anillamiento a 64 °C durante 45 segundos y una última de extensión a 72 °C durante 50 segundos. La tercera fase es la extensión final a 72 °C durante 2 minutos

### 3.4.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se han empleado geles horizontales de agarosa al 1,7%. Las dimensiones de los geles son de 5 cm de largo x 6,4 cm de ancho y aproximadamente unos 4 mm de grosor con peines de 10 pocillos. Se han elaborado con 425 mg de agarosa en 25 ml de tampón TBE (89 mM Tris-HCl, 89 mM  $\text{BO}_4\text{H}_3$  y 2 mM EDTA). Para ello se pone en un matraz el TBE y se le añade la agarosa. A continuación se calienta en el microondas hasta que se funde y queda transparente. Se deja en baño María a 65°, y se vierte en la bandeja portagel, con los peines de los pocillos, cuando se encuentra aproximadamente a esa temperatura el gel fluye cubriendo la bandeja. Seguidamente se dejan transcurrir unos 15-20 minutos para que se enfríe y solidifique. Luego se quita el peine y se introduce en la cubeta de electroforesis y se le añade TBE hasta cubrir el gel.

En cada pocillo del gel se han cargado 12  $\mu\text{l}$  del producto de la PCR, mezclados previamente con 3  $\mu\text{l}$  de tampón de carga de geles Sigma Gel Loading Solution (Azul de bromofenol 0,05%; Sacarosa al 40 %; EDTA 100 mM y SDS 0,5 %). En el último pocillo se incluía el control de la PCR sin ADN.

Para estimar el tamaño molecular de la banda generada, se ha incluido en cada gel el marcador de tamaño molecular O'RangeRuler 100bp DNA Ladder Plus de Fermentas posee 15 bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 y 1500 pares de bases. La banda más intensa son las de 500, 1000, 1500 pdb. Se aplicaban del orden de 0,25  $\mu\text{g}$  de ADN.

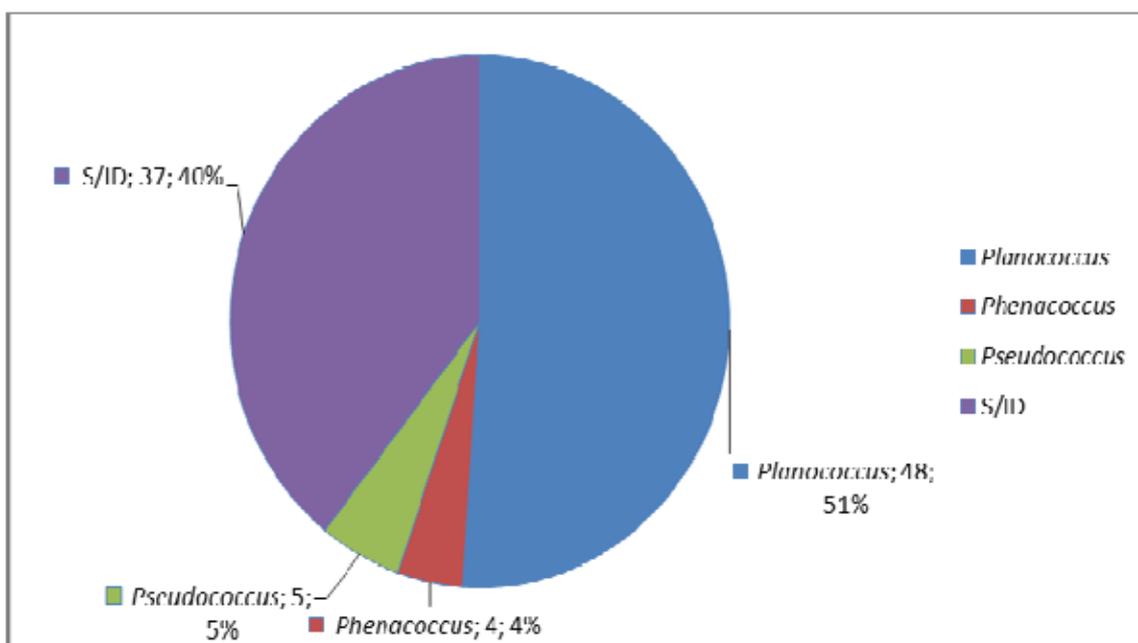
La electroforesis se ha realizado a 75 V durante aproximadamente 60-75 minutos, hasta que el frente de avance marcado por el azul de bromofenol se encontraba a 1 cm del borde del gel. Los geles se teñían en un baño con bromuro de etidio a 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en TBE, durante 10 minutos, en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez teñido, el gel se coloca en transiluminador de luz ultravioleta con una longitud de onda de 312 nm. El gel se fotografiaba con un equipo de fotodocumentación que consta de una cámara de video Sony XC-75 CE equipada con un filtro F-590-M58, la cámara se conecta a una unidad que graba la imagen en formato TIF.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

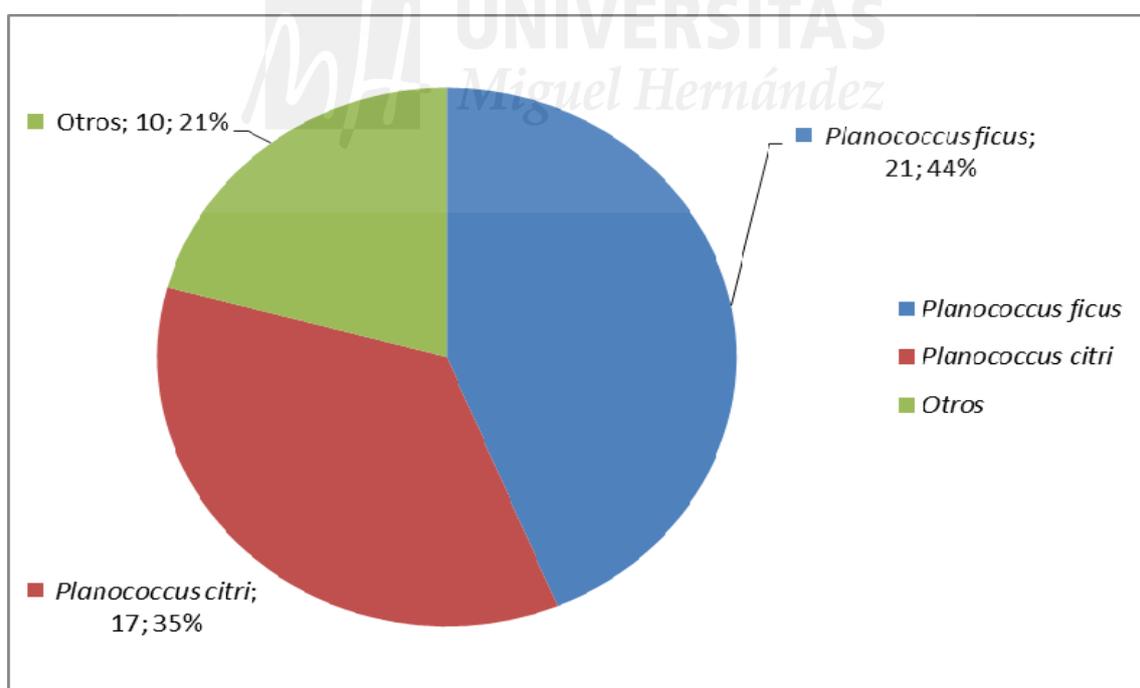
### 4.1. ESTUDIO MORFOLÓGICO

Durante todo el estudio se han recogido 49 muestras de 18 cultivos y flora arvense en 18 municipios diferentes. Se han preparado un total de unas 240 cochinillas en 94 preparaciones y se ha extraído ADN de 14 de esas muestras para la realización de las PCR.

En la Gráfica 1 se muestran los diferentes géneros identificados. En ella se puede apreciar que hay 48 (51%) preparaciones del género *Planococcus*, y un 40% de preparaciones en las que no se ha identificado el género. En la Gráfica 2 se muestra la proporción de especies del género *Planococcus*. No se han identificado los géneros y especies en todas las preparaciones, debido por un lado a que el estudio se refiere a dos especies del género *Planococcus*, por tanto cuando en una muestra se detectaban caracteres propios de otros géneros, no se finalizaba su identificación, a no ser que fuera evidente la especie. Y por otro lado por su dificultad, ya que en las hembras de cochinillas algodonosas en general, hay escasos caracteres morfológicos útiles para su identificación, se han de utilizar diminutos caracteres cuticulares (poros, conductos tubulares, forma de las sedas,...) en la que se ha de constatar su presencia o incluso su cantidad, de modo que para una identificación precisa es necesario ser un experimentado taxónomo en esta familia de insectos, y muy habilidoso para realizar preparaciones microscópicas de estos diminutos insectos con la suficiente calidad para que se puedan observar un mínimo de 400 aumentos, y a veces a 1000.



Gráfica 1. Número y porcentaje de preparaciones de hembras adultas de pseudocóccidos de los diferentes género identificados morfológicamente. S/ID = sin identificar.



Gráfica 2. Número y porcentaje de preparaciones de hembras adultas del género de las diferentes especies del género *Planococcus* identificadas morfológicamente.

4.1.1. CARACTERES DIAGNÓSTICO DEL GÉNERO *PLANOCOCCUS*.

En una primera observación de las muestras se han identificado los caracteres pertenecientes al género *Planococcus* (al que pertenecen ambas especies) con el fin de seleccionar los individuos más interesantes para localizar posteriormente caracteres propios de cada especie que son más complejos y lentos de observar. Mediante las claves de Tranfaglia *et al.*, (1982); Carnero (1986); Danzig *et al.*, 2010 y Miller *et al.*, (2007), resultan 5 especies: *P. citri*, *P. ficus*, *P. halli*, *P. kraunhiaie* y *P. minor*. Se han realizado fotografías de éstos caracteres y son los siguientes:

**Antena:** Presencia de 8 artejos y mamelón apical en el último artejo (borde saliente) (Figura 20).

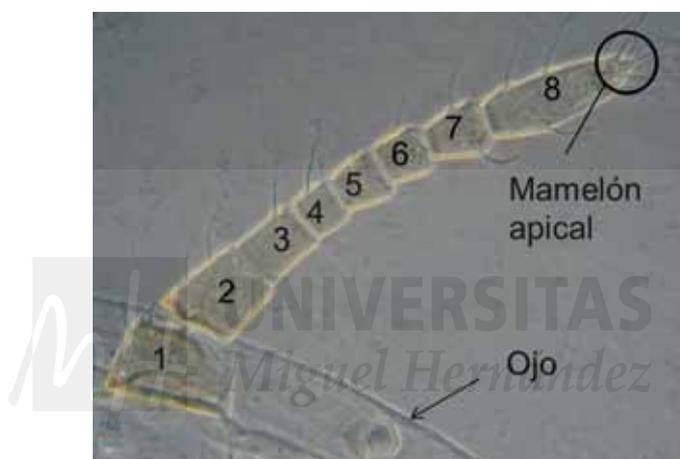


Figura 20. Antena *Planococcus* con 8 artejos y mamelón apical.

**Dentículo en uña:** Ausencia de dentículo en la garra (Figura 21)

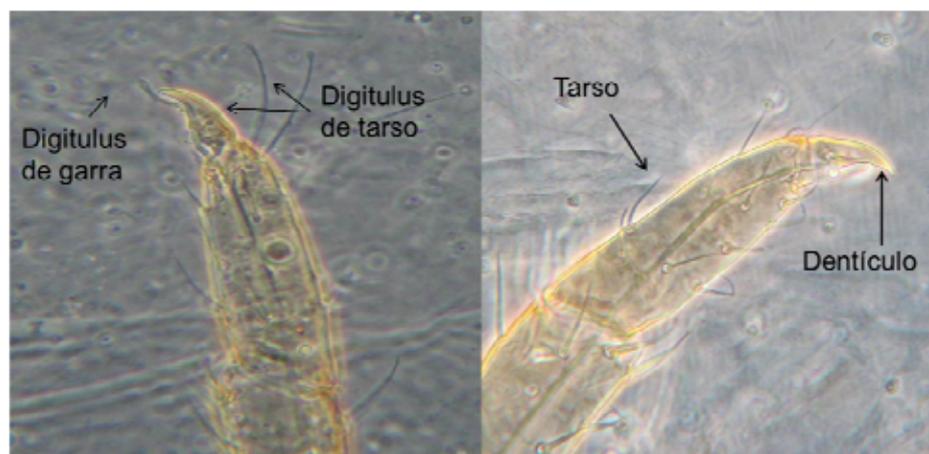


Figura 21. Garra de *Planococcus* con ausencia de dentículo (izq.) y garra de *Phenacoccus* con presencia de dentículo (dcha.).

**Poros multiloculares:** Presencia de poros multiloculares junto a los segmentos V, VI, VII y VIII (Figura 22) y presencia de poros multiloculares en el lateral vientre del abdomen (Al menos en segmentos VI, VII, VIII. Entre cerarios y final de las líneas intersegmentales) (Figura 23).

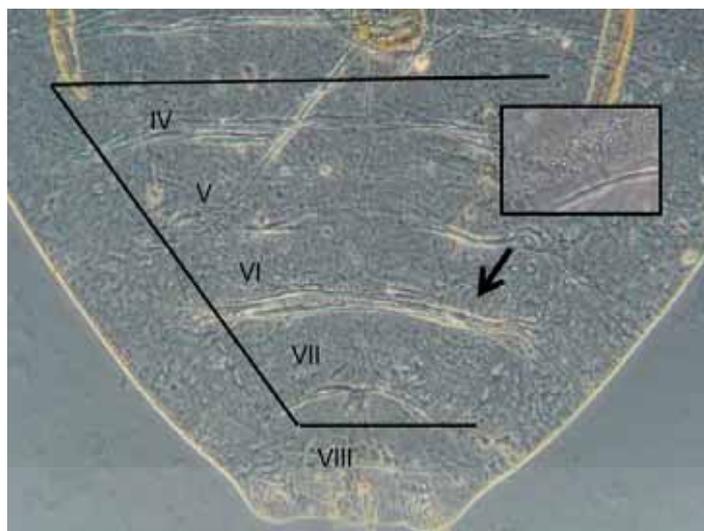


Figura 22. Presencia de poros multiloculares en los segmentos V, VI, VII y VIII.

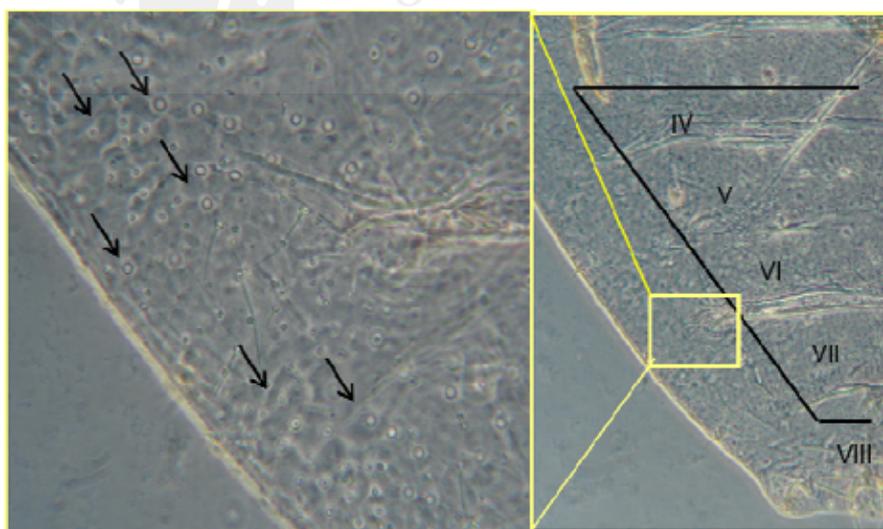


Figura 23. Presencia de poros multiloculares ventrolaterales en los segmentos (VI, VII y VII).

**Número de cerarios:** Los individuos pertenecientes al género *Planococcus* presentan 18 pares de cerarios (Figura 24), mientras que otros géneros como *Pseudococcus*, *Dysmicoccus*, *Phenacoccus*, etc. presentan menos de 18.



Figura 24. Número de pares de cerarios de *Planococcus*.

**Barra anal:** Presencia de barra anal en los lóbulos anales junto a los cerarios anales (Figura 25).



Figura 25. Barra anal junto al cerario anal.

**Circulus:** *Planococcus* presenta tan solo 1 circulus (Figura 26) normalmente dividido por una línea intersegmental. El circulus que puede tener forma de reloj de arena (se estrecha en el centro) u ovalada (Figura 27).

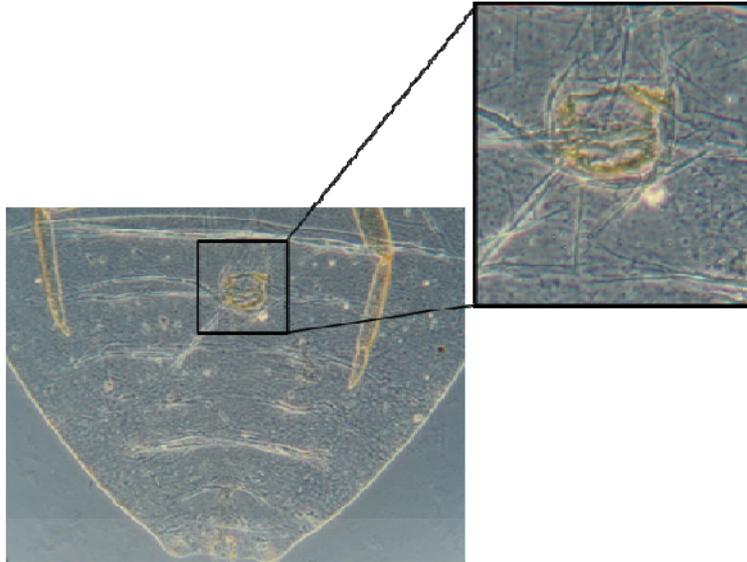


Figura 26. Número de circulus de *Planococcus*.

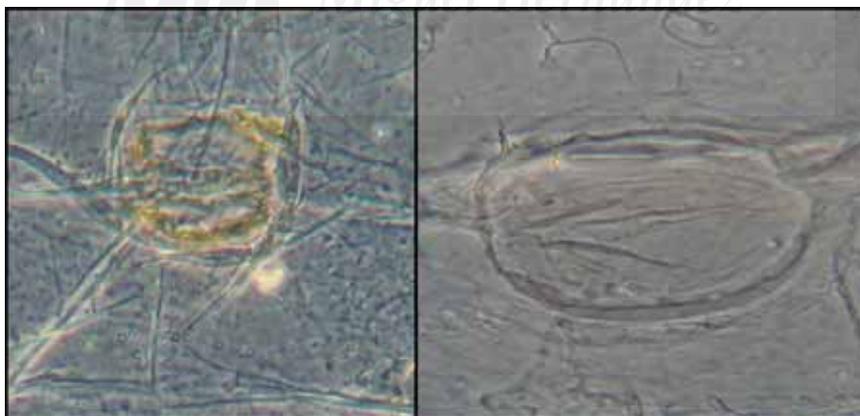


Figura 27. Circulus con forma de reloj de arena (izq.) y con forma ovalada (dcha.).

**Espiráculos:** Presencia de dos pares de espiráculos situados el primer par entre el protórax y el mesotórax y el segundo entre el mesotórax y el metatórax (Figura 28).

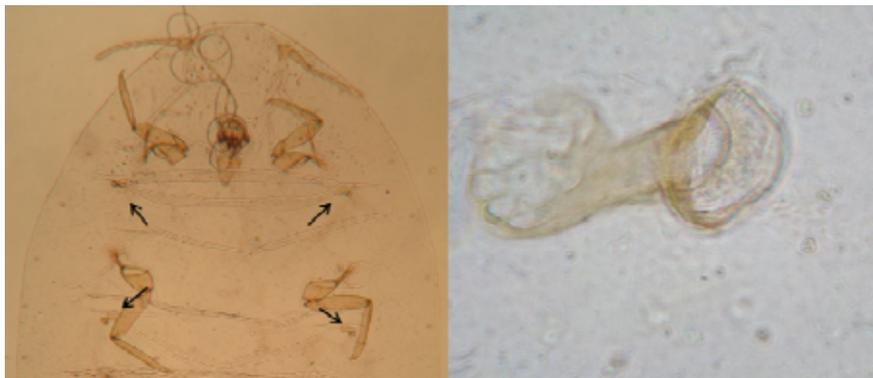


Figura 28. Pares de espiráculos torácicos (izq.) y detalle de espiráculo (dcha.).

**Ostiolos:** Presencia de dos pares de ostiolos, un par situado sobre el segmento abdominal VI y el otro par en la cabeza por encima del primer par de patas (Figura 29).

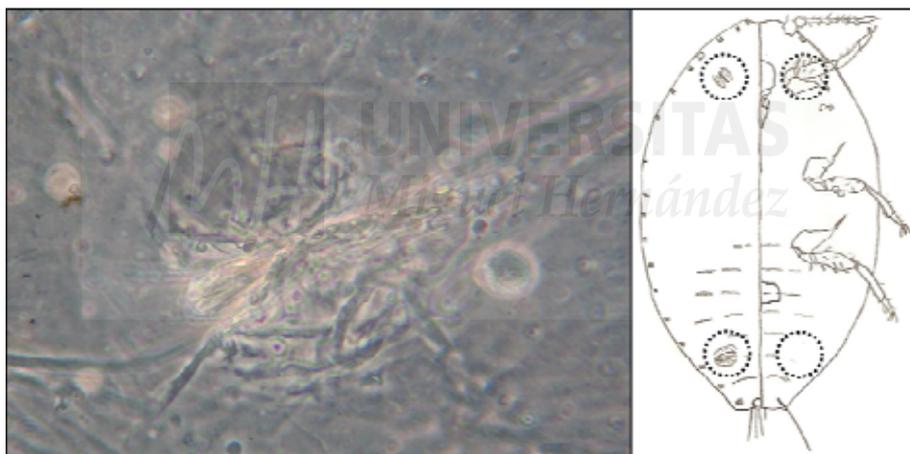


Figura 29. Pares de ostiolos de *Planococcus*.

**Anillo anal:** Presenta tres pares de setas y se encuentra rodeado por poros (Figura 30).



Figura 30. Anillo anal con tres pares de setas.

4.1.2. CARACTERES DIFERENCIADORES ENTRE *P. CITRI* Y *P. FICUS*

Las diferencias morfológicas entre *P. citri* y *P. ficus* son muy escasas y presentan una gran dificultad para su observación, siendo necesario un mínimo de 400 aumentos. A continuación se comentan los caracteres diferenciadores entre ambas especies extraídos de las mismas claves.

**Sedas de los cerarios:** Según Cox (1989) y Danzig *et al.*, (2010) *P. citri* presenta todos los cerarios con setas cónicas (Figura 31 izq.) mientras que *P. ficus* presenta sedas más delgadas y con el ápice flagelado (Figura 31 dcha.). No se han encontrado diferencias claras de este carácter entre *P. ficus* y *P. citri* debido a que la diferencia entre ambos depende de cómo haya quedado la preparación que puede afectar a la forma de las sedas y el criterio del taxónomo entre flagelada y cónica puede variar, pues es difícil de delimitar.



**Figura 31** Sedas cónicas del cerario de *P. citri* (izq.) y seda delgada con el ápice flagelado de *P. ficus* (dcha.).

**Poros discoidales:** Según Cox (1989) *P. ficus* no presenta poros discoidales junto al ojo, mientras que *P. citri* puede presentarlos (Figura 32). No se pueden diferenciar ambas especies mediante este carácter debido a que es muy complicado de observar necesitando 1000 aumentos para poder observarlo y requiere que el vaciado del insecto sea prácticamente perfecto.

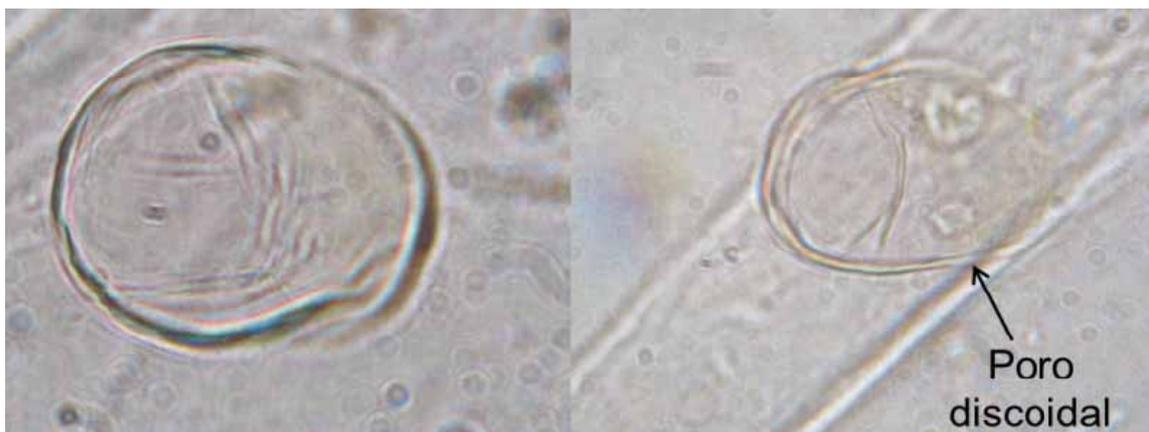


Figura 32. Ojo de *P. ficus* sin poro discoidal (izq.) y poro discoidal junto a ojo de *P. citri* (dcha.).

**Conductos tubulares con anillo oral:** Según Miller *et al.*, (2007) *P. ficus* no posee conductos con anillo oral junto al cerario frontal, sin embargo *P. citri* lo puede presentar en algunos individuos (Figura 33). No se ha podido encontrar una diferencia clara respecto a este carácter pues tan solo se ha dado en una de las muestras realizadas. Es necesario un mínimo de 400 aumentos y usar contraste de fases para poder apreciar dicha característica.

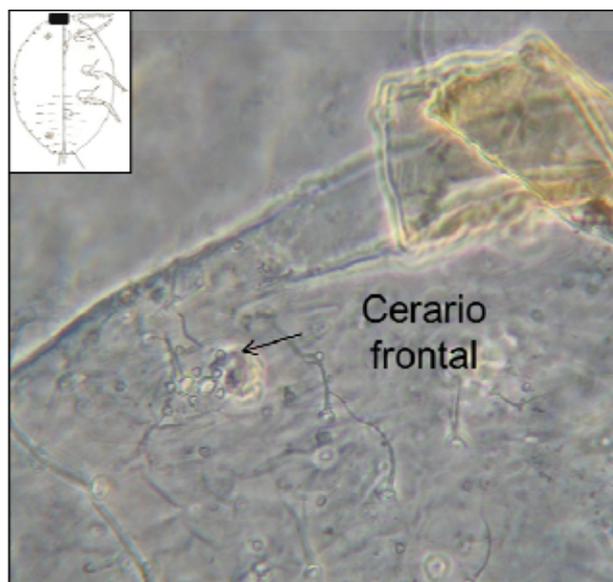


Figura 33. Presencia de conducto tubular con anillo oral junto al cerario frontal de *P. citri*.

**Conductos tubulares collar-oral:** Se han encontrado diferencias claras entre ambas especies en estos conductos en la cabeza en la zona comprendida entre la inserción de las antenas, y en el tórax en la zona comprendida entre las coxas frontales y medias y el margen del cuerpo; que luego se han podido confirmar con las PCR realizadas. Es necesario un mínimo de 400 aumentos, usar contraste de fases y jugar con el micrómetro del microscopio ya que no se suelen ver todos a la vez.

Según Cox (1989) y Danzig *et al.*, (2010) *P. citri* puede presentar entre las antenas más de 5 conductos collar-oral (hasta 35) (Figura 34) aunque en ocasiones el número es menor, mientras que *P. ficus* no posee más de 5 conductos. Normalmente estos conductos se encuentran en grupos en la cabeza estando presentes la mayoría al lado de los 2 pares de cerarios frontales, habiendo en *P. citri* una media de 2,4-2,9 conductos junto a cada cerario mientras que en *P. ficus* no hay (Tranfaglia *et al.*, 1982). Aunque es un carácter complicado de ver, posee la ventaja de encontrarse en grupos numerosos junto a la base de cada antena, facilitando su localización. Este carácter permite diferenciar ambas especies, según se ha podido confirmar en las PCR realizadas.

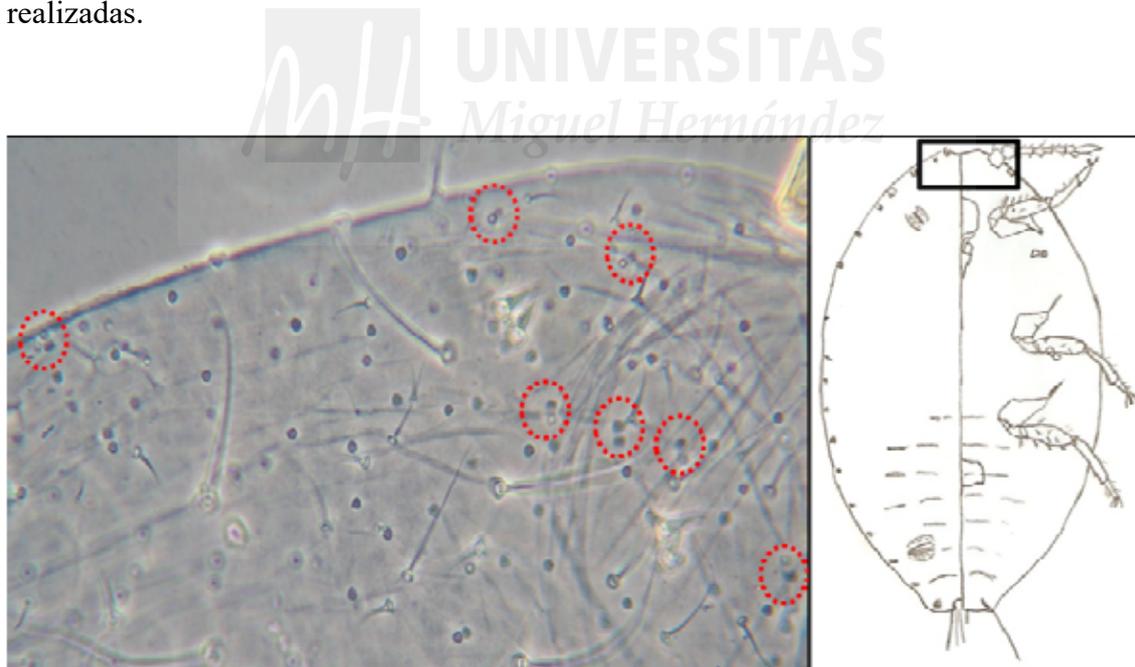
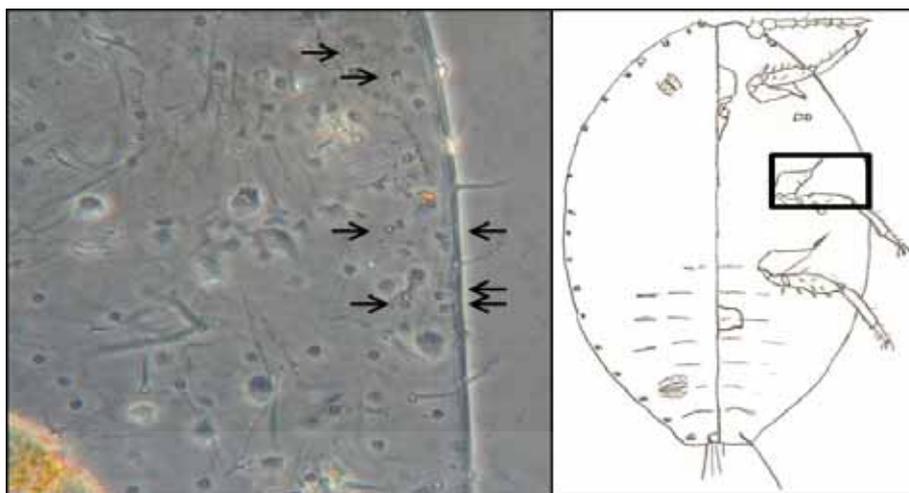


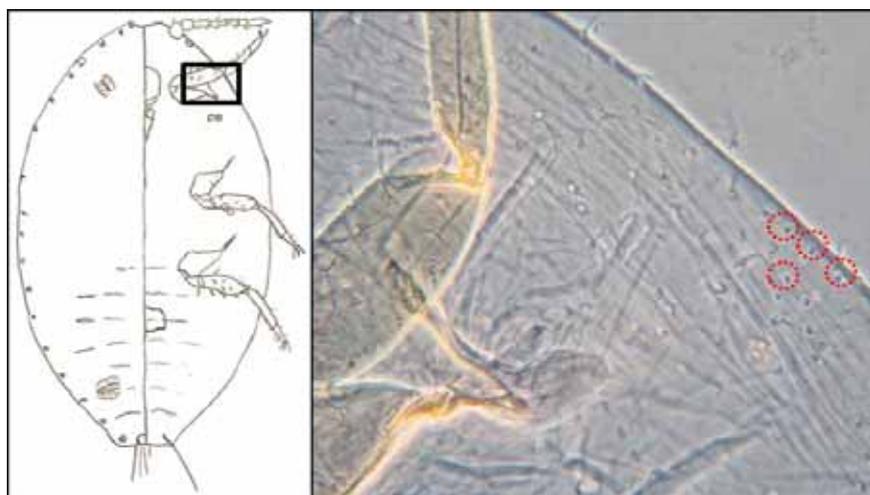
Figura 34. Conductos tubulares collar-oral entre las antenas de *P. citri*.

Según Cox (1989) *P. citri* puede presentar más de 6 conductos collar-oral entre la coxa media y el margen del cuerpo (sumando ambos lados) (Figura 35) mientras que *P. ficus* o en ocasiones *P. citri* los conductos son escasos y no suelen poseer más de 6. Al encontrarse en una zona muy concreta su búsqueda es más fácil. Ambas especies pueden ser diferenciadas mediante este carácter, que ha podido ser confirmado gracias a las PCR realizadas.



**Figura 35.** Conductos tubulares collar-oral entre la coxa media y el margen del cuerpo de *P. citri*.

Según Cox (1989) tanto *P. citri* como *P. ficus* presentan conductos collar-oral entre la coxa del primer par de patas y el margen del cuerpo (Figura 36), pero tan solo en *P. ficus* pueden estar ausentes estos conductos. No se han establecido diferencias claras respecto a este carácter debido a que al tratarse de la ausencia de unas estructuras muy pequeñas, siempre existe la posibilidad que se pueda pasar por alto algún conducto. Además se necesita una preparación muy limpia para verlo con claridad.



**Figura 36.** Grupo de conductos tubulares collar-oral entre la coxa frontal y el margen del cuerpo.

**Poros translucidos:** Ambas especies pueden presentar poros translucidos en coxa y tibia, pero tan solo *P. ficus* puede mostrar poros translucidos también en el fémur de las patas traseras (Figura 37). Este carácter permite diferenciar ambas especies, según se ha podido confirmar con las PCR realizadas. Es un carácter también complicado de ver, se necesitan 400 aumentos, contraste de fases y jugar con el micrómetro del microscopio ya que en la mayoría de los casos no se pueden apreciar los poros a la vez en coxa, fémur y tibia. Al encontrarse este carácter únicamente en los fémures traseros facilita su búsqueda. Sin embargo no es un carácter invariable, pues se han realizado experimentos en los que *P. ficus* se criaba bajo diferentes temperaturas, estando presentes en los fémures de los individuos criados con altas temperaturas y ausentes en los de baja temperatura (Cox, 1988; en Run *et al.*, 2008).

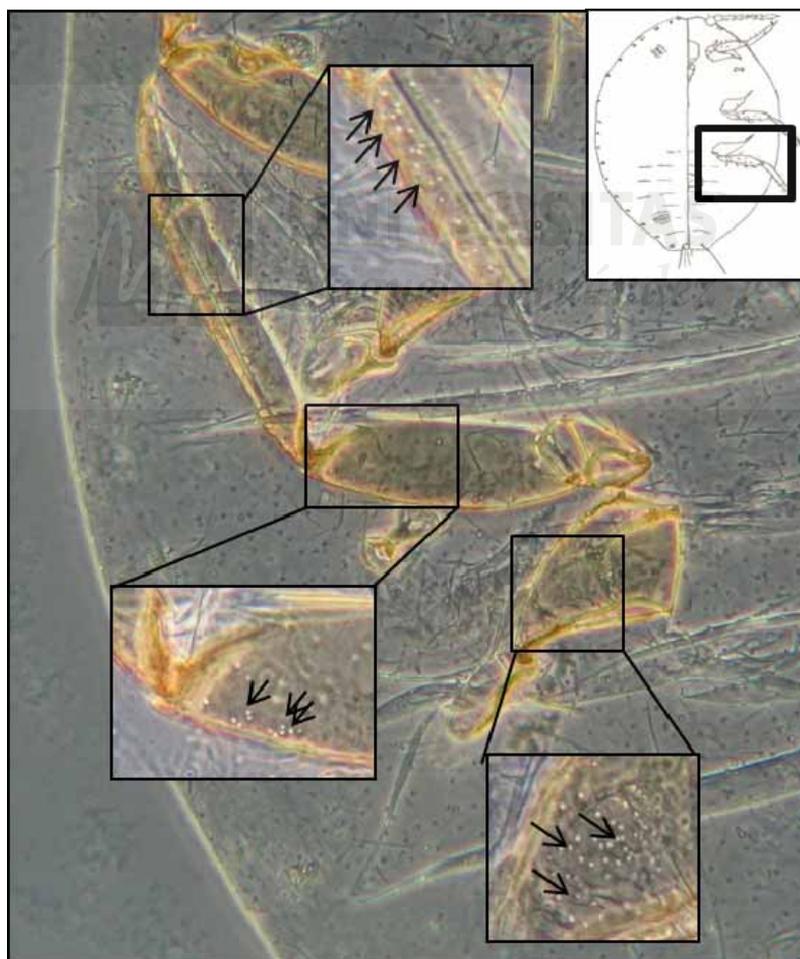
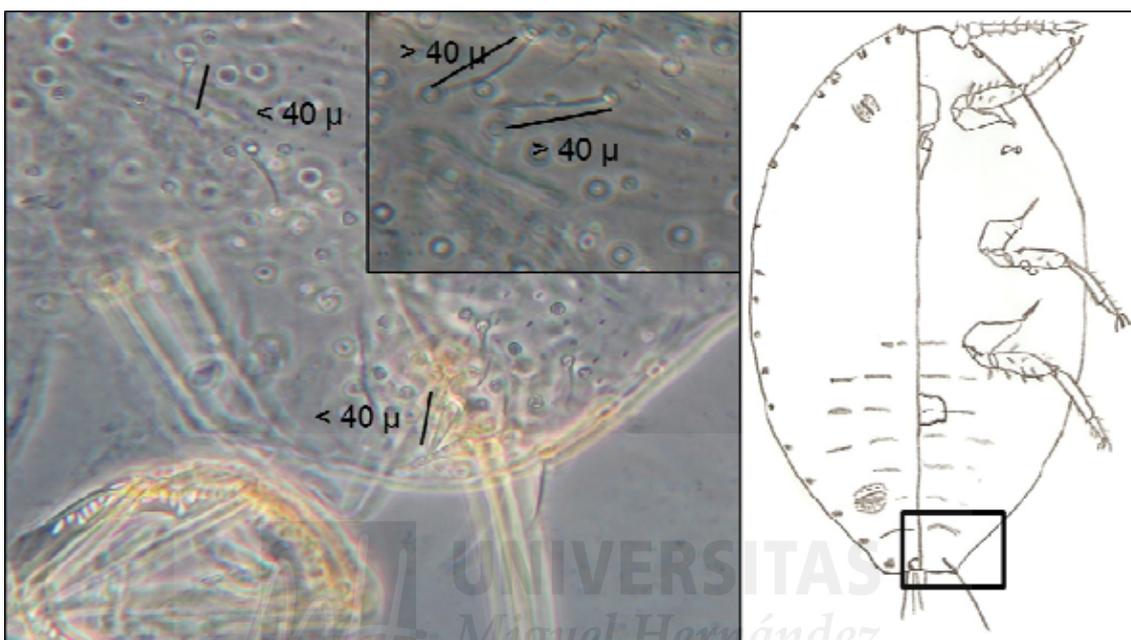


Figura 37. Presencia de poros translucidos en coxa, tibia y fémur trasera de *P. ficus*.

**Setas dorsomediales:** Según Cox (1989) la longitud de las setas dorsales abdominales (entre los segmentos II-VII) en ambas especies son iguales o inferiores a  $40\mu\text{m}$  pero en *P. ficus* se da el caso que algunas sean superiores a  $40\mu\text{m}$ . Para este carácter se puede tomar como referencia la longitud de las sedas del cerario anal que son inferiores a  $40\mu\text{m}$  (Figura 38). No es una diferencia muy fiable, pues se pueden confundir fácilmente estas sedas con otras que posee el insecto en el cuerpo.



**Figura 38.** Lóbulo anal de *P. ficus* con algunas setas dorsomediales mayores de  $40\mu\text{m}$  y otras inferiores a  $40\mu\text{m}$ . En la parte inferior de la foto se indica la seda del cerario anal que puede servir de referencia para medir las sedas pues suele ser inferior a  $40\mu\text{m}$

**Poros multiloculares:** Según Trafanglia *et al.*, (1982) y Carnero (1986) *P. citri* presenta una media de 0,6 poros en el protórax (Figura 40) mientras que *P. ficus* presenta 3,3 (a cada lado) (Figura 39). A pesar de que en las muestras observadas parece cumplirse dicho carácter, no se puede establecer diferencias claras debido a que siempre se puede dar el caso de que se pase por alto algún poro o por el criterio empleado para decidir qué zona pertenece al mesotórax y cual al protórax debido a que en las hembras adultas de pseudocóccidos no se diferencian con claridad las distintas zonas del tórax.

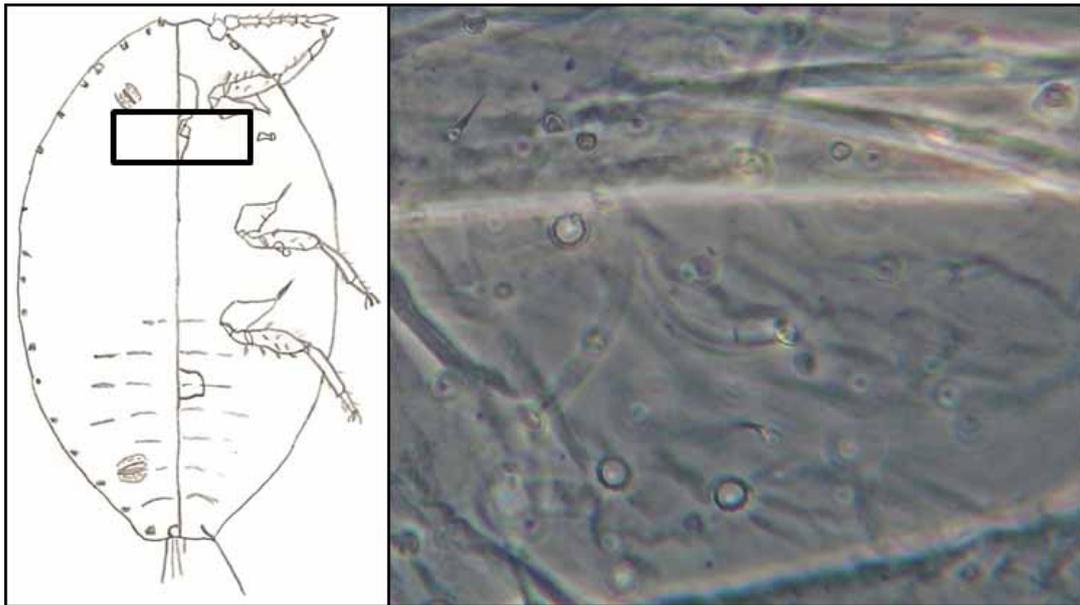


Figura 39. Presencia de 3 poros multiloculares en uno de los lados del protórax de *P. ficus*.

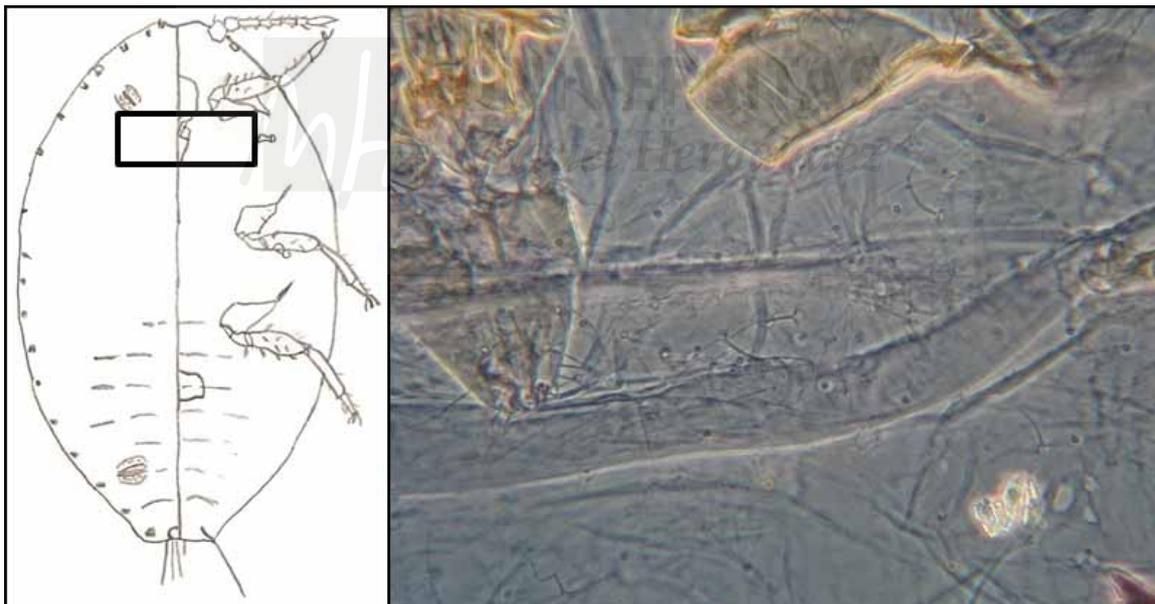


Figura 40. Ausencia de poros multiloculares en el protórax de *P. citri*.

## 4.2. ESTUDIO MOLECULAR ENTRE *PLANOCOCCUS CITRI* Y *P. FICUS*

En las últimas décadas la taxonomía molecular se ha mostrado como una alternativa muy precisa a la taxonomía tradicional que en ciertas ocasiones es muy complicado o imposible poder identificar ciertas especies. A continuación se muestran los resultados obtenidos con los marcadores utilizados para diferenciar *P. citri* de *P. ficus*.

Se ha podido identificar ambas especies estudiadas, pero el tamaño de las bandas obtenidas no coinciden con las definidas por Saccaggi (2006), pues el marcador de *P. ficus*, basado en la combinación de los cebadores C1-J-2260 + TL2-N-3014 debería amplificar un fragmento de 754 pdb sin embargo se obtienen amplificaciones de algo más de 800 pdb (Figura 41) y el de *P. citri* basado en la combinación de cebadores C1-J-2427 + TL2-N-3014 que debería amplificar un fragmento de de 587 pdb, y se obtiene una amplificación de casi 700 pdb (Figura 42).



Figura 41. Reacción PCR con el marcador de *P.ficus* en los carriles 1 al 4 (C1-J-2260 y TL2-N-3014) y el de *P. citri* (C1-J-2427 y TL2-N-3014) en los carriles 6 al 9. El carril 5 corresponde al marcador de tamaño molecular. Muestras Schefflera (MC17), Naranja dulce (MC41) y Vid (MC20). En los carriles 3 y 4 se observa una amplificación de algo más de 800 pdb en las muestras tomadas sobre vid (MC20) y no se muestra ninguna amplificación en los carriles 8 y 9 confirmando que la muestra es *P. ficus*. En el carril 6 se observa una tenue amplificación de casi 700 pdb de la muestra tomada de Schefflera (MC17), no mostrándose ninguna amplificación en el carril 1, confirmando que la muestra es *P.citri*. La muestra MC41 no muestra amplificación.

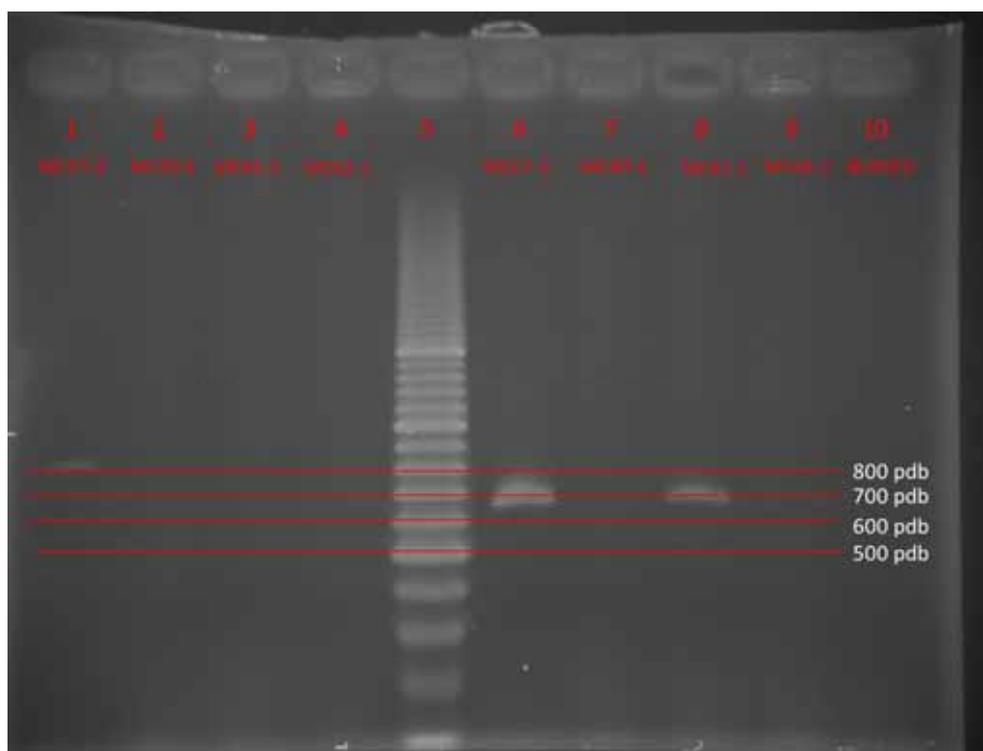


Figura 42. Reacción PCR con el marcador de *P.ficus* (C1-J-2260 y TL2-N-3014) en los carriles 1 al 4 y el de *P. citri* (C1-J-2427 y TL2-N-3014) en los carriles 6 al 9. El carril 5 corresponde al marcador de tamaño molecular. Muestras Schefflera (MC17), Vid (MC30), Jatrofa (MC41) y Naranja dulce (MC42). En los carriles 6 y 8 se observa una amplificación en torno a 700 pdb de las muestras tomadas sobre Schefflera (MC17) y Jatrofa (MC41), y en los carriles 1 y 3 no se produce pudiendo confirmar que se trata de *P.citri*. Las muestras de vid y naranja dulce no han producido ninguna amplificación.

Para intentar aclarar estas discrepancias en los tamaños de las bandas, se han comparado las secuencias parciales del gen CO I del ADNmt CO I de *P. citri* (GenBank Accesión DQ238221) y *P. ficus* (GenBank Accesión DQ238220), proporcionadas por Saccaggi (2006) obtenidas con los cebadores universales C1-J-2183 (alias Jerry) y TL2-N-3014 (alias Pat) (Simon *et al.* 1994) que le sirvieron de base para diseñar los cebadores (Anexo 2). El tamaño estimado, considerando que existen 5 bases menos respecto a *D. yakuba* es de  $3038-2231 - 5 = 802$  pdb en *P. ficus* y  $3038-2395 - 5 = 638$  en *P. citri*, tamaños más cercanos a los encontrados en las electroforesis. Los tamaños esperados proporcionados por Saccaggi (2006) no son los correctos, pues en sus cálculos no ha tenido en cuenta la longitud de los cebadores.

### 4.3. RESULTADOS POR ESPECIES CULTIVADAS

Los resultados obtenidos según la especie vegetal de la que procedían las muestras son los siguientes:

#### 4.3.1. LIMONERO

De esta especie cultivada se han tomado 8 muestras, de las cuales se han preparado 24 individuos y se han realizado 5 extracciones de ADN. En las identificaciones han aparecido *P. citri* y otras especies no pertenecientes al género *Planococcus* que no han sido identificadas, por el momento.

La muestra procedente de Águilas (MC14) se ha identificado microscópicamente como *P. citri* observándose más de 6 conductos tubulares collar-oral entre la coxa media y el margen del cuerpo, como la casi ausencia de poros multiloculares en protórax y mesotórax, este último carácter es menos fiable en esta especie, pues siempre puede darse el caso de pasar por alto alguno de estos, por la complejidad que supone su identificación. El resto de caracteres microscópicos de las preparaciones no se han podido observar debido a la dificultad de su localización y el estado de la preparación. En la identificación mediante PCR se han mostrado el marcador de *P. citri*.

Las muestras procedentes de la EPSO (MC24 y MC31) no han podido ser identificadas como ninguna de las dos especies estudiadas en el presente trabajo. La muestra MC24 no pertenece al género *Planococcus* pues presenta 17 cerarios, sin embargo en la PCR aparece una banda de tamaño similar a la de *P. ficus* lo que plantea dudas acerca de la selectividad de estos marcadores para *P. ficus* y *P. citri*, aunque hay que tener en cuenta que estos marcadores han sido desarrollados para unas pocas especies de pseudocóccidos presentes en la vid en Sudáfrica, y en su puesta a punto no se ha testado con todas las especies de pseudocóccidos. La muestra MC31 se han podido identificar como *Planococcus* y algún carácter de *P. citri* como la presencia de más de 6 conductos tubulares entre la coxa media y el margen del cuerpo, pero tampoco se ha mostrado ninguno de los dos marcadores PCR.

La muestra procedente de Cartagena (MC40) se ha identificado microscópicamente como *P. citri* observándose más de 6 conductos tubulares collar-oral entre la coxa media y el margen del cuerpo, además de presentar más de 5 conductos tubulares collar-oral entre las antenas y la casi ausencia de poros multiloculares en

protórax y mesotórax. También se han dado caracteres de *P. citri* como la casi ausencia de poros multiloculares en protórax y mesotórax.

De las especies estudiadas tan solo se ha citado sobre limonero *P. citri* (USDA, 2014). Según García-Marí (2012) las especies de cochinillas presentes en los cítricos son, además de *P. citri*, *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti, *Pseudococcus calceolariae* (Maskell) y *Pseudococcus viburni* (Signoret). Por este motivo tan solo se han realizado extracciones de ADN de aquellas preparaciones de las que se disponían preparaciones de hembras adultas con las que comparar los resultados de la PCR, ya que con los marcadores disponibles han mostrado resultados confusos al utilizarlo con pseudocócidos no pertenecientes al género *Planococcus* al mostrándose una banda de tamaño similar a la del marcador de *P. ficus*.

#### 4.3.2. NARANJO DULCE

De esta especie se han recolectado 2 muestras una de Santa Cruz (MC29) y otra de Casas nuevas (MC42). Tan solo hay 6 individuos de MC42 preparados microscópicamente, y se ha realizado la PCR de 2 individuos de cada muestra.

Las muestras procedentes de Casas Nuevas (MC42) se han podido identificar microscópicamente como *P. citri* ya que posee más de 5 conductos tubulares oral-collar entre las antenas y más de 6 entre las coxas medias y el margen del cuerpo, y en la PCR se muestra también el marcador de *P. citri*.

Por el contrario en la muestra procedente de Santa Cruz (MC29) no se ha podido determinar si es *P. citri* ya que tan solo se disponen de dos individuos y solo se ha podido realizar una PCR en la que se amplifica el marcador de *P. ficus*, pudiendo ocurrir el mismo caso anterior el de la muestra MC24 de limonero en el que el insecto pertenecía a otro género y se mostraba el marcador de *P. ficus*.

De las especies estudiadas tan solo se ha citado sobre naranjo *P. citri* (Beltrà y Soto, 2010; Ben-Dov *et al.*, 2001; Lindinger, 1911).

#### 4.3.3. NARANJO AMARGO

De esta especie se han tomado 7 muestras de las cuales una es de Muchamiel (Alicante) (MC12) y el resto son de la EPSO tomadas en distintas épocas. Se han preparado 26 individuos y se ha realizado una extracción de ADN.

No se ha podido identificar la especie de ninguna de las muestras, pues la PCR muestra resultados confusos al mostrarse ambos marcadores además de observarse caracteres microscópicos en la mayoría de los casos que pertenecen a otro género, ya que poseen 17 cerarios y en pocas ocasiones presentan los caracteres de *Planococcus* y tan solo muestran la presencia de las de 6 conducto collar-oral entre las coxas medias y el margen del cuerpo. Siguiendo los caracteres que presenta en la clave del USDA puede ser que pertenezca al género *Dysmicoccus*, pero no se puede asegurar por el momento siendo necesaria una investigación más exhaustiva para poder identificar la especie.

Al igual que el resto de cítricos se cita el naranjo amargo como hospedante de *P. citri* (Carnero 1986; Beltrà y Soto, 2010; Ben-Dov *et al.*, 2001)



#### 4.3.4. VID

De esta especie se tienen 6 muestras procedentes de Alhama de Murcia (12007), EPSO (12033 y MC34), Orihuela-Desamparados (MC15 y MC20) y Elche (13014). Se han preparado 36 individuos y se han realizado la PCR con 4 individuos.

Las muestras procedentes de Orihuela-Desamparados (MC15 y MC20) se han podido identificar la especie *P. ficus* al observarse caracteres como presencia de poros translucidos en fémur, coxa y tibia del par de patas traseras y la presencia de 3-4 poros multiloculares en el protórax. También presenta otros caracteres de *P. ficus* menos fiables debido a que son caracteres que requieren una minuciosa inspección para verificar que realmente están ausentes, como es el caso de la ausencia de conductos collar-oral entre el primer par de patas y el margen del cuerpo, o la presencia de setas dorsales mayores de 40µm. En la PCR se ha mostrado el marcador de *P. ficus*.

Las muestras procedentes de Alhama de Murcia (12007 y MC30), Elche (13014) y en las de EPSO (12033) se han podido identificar como de la especie *P. ficus* ya que

presenta todos los caracteres anteriormente comentados para MC15 y MC20. En la identificación mediante PCR las muestras de vid han mostrado el marcador de *P. ficus*.

Lindingek (1917), Carnero (1986), Cabaleiro (1997), Beltrà y Soto (2012) Le Vieux *et al.*, (2013) han citado sobre viña en España tanto *P. citri* como *P. ficus*. También se han citado en otros países ambas especies sobre la vid aunque predominando *P. ficus* (Danzig *et al.*, 2010; Dalla Montà *et al.*, 2001; Ben-Dov, 1994; en Cavalieri 2008, Ben-Dov *et al.*, 2001).

#### 4.3.5. GRANADO

De esta especie se tienen 3 muestras procedentes de la EPSO (MC33 y MC39) y de Elche (MC36). Se han preparado 17 individuos y se ha analizado un individuo mediante PCR. Las muestras procedentes de Elche se han podido identificar como *P. citri* microscópicamente ya que poseen más de 5 conductos tubulares oral-collar entre las antenas y más de 6 entre las coxas medias y el margen del cuerpo, coincidiendo con la PCR que también muestra el marcador de *P. citri*. También se han dado caracteres de *P. citri* como la casi ausencia de poros multiloculares en protórax y mesotórax, aunque poco fiable pudiendo pasar por alto alguno de estos poros, debido a la complejidad que conlleva su identificación.

Las muestras procedentes de la EPSO no pertenecen al género *Planococcus* ya que presentan denticulo en la garra, además de presentar menos de 18 pares de cerarios y no presentan barra anal. No se ha realizado ninguna PCR debido a que claramente no se corresponden con ninguna de las especies que ocupa el presente trabajo. Se han podido identificar como *Pseudococcus viburni* empleando la clave del USDA, especie también citada en el granado (Ben-Dov *et al.*, 2001).

Según Mani *et al.*, (2011), Danzig *et al.*, (2007) *P. ficus* está presente en granado. Según Ben-Dov *et al.*, (2001) sobre granado se han citado 23 especies distintas de pseudocócidos entre las que destacan, además de *P. citri* y *P. ficus*; *Pseudococcus viburni*, *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus meridionalis*, *Pseudococcus comstocki*, *Planococcus lilacinus* y *Dysmicoccus grasii*.

#### 4.3.6. HIGUERA

De esta especie se tiene 4 muestras procedentes de la EPSO (MC03, MC06 y MC22) y de San Juan de Alicante (MC11). Se han preparado 21 individuos y se han realizado 2 PCR.

Las muestras procedentes de la EPSO se han podido identificar como *P. ficus* observándose caracteres microscópicos como poros translucidos en fémur, coxa y tibia, presentan 3-4 poros multiloculares en el protórax (a cada lado) y la presencia de setas dorsales mayores de 40µm. En la PCR se ha mostrado el marcador de *P. ficus*.

La muestra procedente de San Juan de Alicante pertenece al género *Phenacoccus* ya que presenta 9 artejos, dentículo en la garra y menos de 18 cerarios.

Según Lindinger (1917), Carnero (1986), Danzig *et al.*, (2007), Cavalieri *et al.*, (2008), Beltrà y Soto (2012), tanto *P. citri* como *P. ficus* se encuentran sobre higuera.

#### 4.3.7. SCHEFFLERA

De esta especie de ornamental se tienen 3 muestras procedentes de San Vicente del Raspeig (MC07 y MC23) y Villajoyosa (MC17). Se han preparado 9 individuos y se han realizado 3 PCR.

Las muestras procedentes de ambos lugares se han podido identificar como *P. citri*. Al microscopio presentan caracteres de *P. citri* como la presencia de más de 6 conductos tubulares collar-oral entre las coxas medias y el margen del cuerpo, además de la casi inexistencia de poros multiloculares en tórax y protórax. Los resultados de la PCR no son claros del todo, pues aunque aparece una banda intensa correspondiente a *P. citri*, sin embargo, aparece también una banda aunque tenue, coincidiendo con el tamaño de *P. ficus*.

De las especies estudiadas tan solo se ha citado sobre schefflera *P. citri* (Bendov *et al.*, 2001).

#### 4.3.8. JATROFA

De esta especie, se tiene una muestra procedente de Santomera de los invernaderos del CEBAS (13051) en la que se investiga como cultivo energético. Se han preparado 9 individuos y se ha realizado 1 PCR

La muestra se ha podido identificar al microscopio como *P. citri* ya que poseen más de 5 conductos tubulares oral-collar entre las antenas y más de 6 entre las coxas medias y el margen del cuerpo, mientras que en la electroforesis se muestra el marcador de *P. citri*.

Según Lenira *et al.*, (2010), Ben-Dov *et al.*, (2001) la jatrofa es hospedante de *P. citri* pero no de *P. ficus*.

#### 4.3.9. TOMATE

De esta especie se tiene una muestra procedente de Molina del Segura (13015) que se ha mantenido en cría en una jaula en el laboratorio. Se han preparado 22 individuos y se han realizado 10 PCR durante la fase de puesta a punto de la PCR.

Los individuos preparados muestran caracteres distintos a los del género *Planococcus* mostrando denticulo en la garra, menos de 18 pares de cerarios y poros translucidos únicamente en la tibia entre otros caracteres. Las PCR realizadas han mostrado datos confusos, mostrándose en un principio el marcador de *P. citri* y posteriormente el de *P. ficus*. Esto puede ser debido a que al haber estado en el laboratorio junto a tres jaulas más, se haya producido una contaminación de la muestra. Los resultados del tomate no son por tanto nada fiables

Según Ben-Dov *et al.*, (2001) el tomate es hospedante de 16 especies de pseudocóccidos entre las que no se encuentra *P. ficus* pero si *P. citri*: Aparte de *P. citri* destacan *Planococcus minor*, *Phenacoccus maderiensis*, *Phenacoccus solani* y *Pseudococcus viburni*.

#### 4.3.10. OTROS CULTIVOS

El resto de especies muestreadas carecen de importancia en el presente estudio, pues debido a la morfología macroscópica que presentan y los hospederos sobre los que se han encontrado no pertenecen a *P. ficus* y *P. citri*. Por este motivo no se han realizado PCR de dichas muestras, pero si se han realizado preparaciones que muestran claramente algunos caracteres que son más complicados de observar en *P. ficus* y *P. citri*, facilitando el trabajo de reconocimiento de ciertas estructuras microscópicas.

La muestra recogida sobre pimiento (12009) se ha podido identificar como *Phenacoccus solani* al no mostrar ovisaco (es vivípara) y ser uno de los principales pseudocócidos sobre pimiento.

Las muestras sobre ciprés (12016 y MC16) se han podido identificar como *Planococcus vovae* ya que presentan un característico color lila.

La muestra de cactus (MC05) no se ha identificado pues presentaba un color rojizo, con pocas secreciones céricas, impropias de *Planococcus*.

La muestra sobre phittosporum se ha podido identificar como *Pseudococcus longispinus* al mostrar 17 cerarios, de los cuales las setas anales son más largas que el resto de sedas del cuerpo siendo de igual o mayor tamaño del resto del cuerpo del insecto.

Las muestras sobre buganvilla (MC26) y hiedra (MC27) al igual que las anteriores no se han identificado, pues presentabas caracteres impropios de *Planococcus* como es el caso del ovisaco en forma de túnel recubriendo casi todo el cuerpo mientras que *P. ficus* y *P. citri* presentan el ovisaco bajo el abdomen.

## 5. CONCLUSIONES

- En la identificación de cochinillas algodonosas se han de utilizar diminutos caracteres cuticulares (poros, conductos tubulares, forma de las sedas,...) en la que se ha de constatar su presencia o incluso su cantidad, de modo que para una identificación precisa es necesario ser un experimentado taxónomo en esta familia de insectos, y habilidoso para realizar preparaciones microscópicas de estos diminutos insectos con la suficiente calidad para que se puedan observar un mínimo de 400 aumentos, y a veces a 1000, siendo importante disponer de un microscopio de calidad con iluminación mediante contraste de fases.
- Se han encontrado caracteres morfológicos diferenciadores de las hembras adultas para *Planococcus citri* que son:
  - Presencia de más de 6 conductos tubulares oral collar entre las antenas.
  - Presencia de más de 6 conductos tubulares oral collar entre la coxa media y el margen del cuerpo, sumando ambos lados.
- Se han encontrado el carácter de presencia de poros translucidos en coxa fémur y tibia como carácter diferenciador de hembras adultas de *Planococcus ficus*.
- Los métodos moleculares son una valiosa herramienta permitiendo la identificación de distintas especies ampliando una banda de casi 700 db en *P. citri* y algo más de 800 pdb en *P. ficus*.
- *P. citri* se ha encontrado en los cultivos de Naranja dulce (Casas Nuevas, Alhama de Murcia.), limonero (Águilas), granado (Elche), jatrofa (Santomera) y schefflera (San Vicente y Villajoyosa).
- *P. ficus* se ha encontrado en los cultivo de vid (EPSO y Alhama de Murcia) e higuera (EPSO).
- Además de estas especies se ha encontrado *Phenacoccus solani* sobre pimiento, *Planococcus vovae* sobre ciprés (EPSO y Orihuela) y *Pseudococcus longispinus* sobre pittosporum (Orihuela). No se ha podido identificar por el momento las muestras sobre hiedra, buganvilla (La Alberca, Murcia), naranja amarga (EPSO), granado (EPSO), limonero (EPSO y Orihuela), tomate (Molina del Segura) e higuera (San Juan de Alicante).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

ABD-RABOU S., SHALABY H., GERMAIN J.-F., RIS N., KREITER P., MALAUSA T. 2012. Identification of mealybug pest species (Hemiptera: Pseudococcidae) in Egypt and France, using a DNA barcoding approach. Bulletin of Entomological Research. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485312000041>

ANNECKE D.P. & MORAN V.G. 1982, Insects and mites of cultivated plants in South Africa. Butterworths, Durban, South Africa. Butterworth Durban South Africa. 383 pp.

BEHURA S.K. 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. Molecular Ecology 15: 3087–3113 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03014.x>

BELTRÀ A., SOTO A. 2009. Aportaciones de nuevas especies de Pseudocóccidos (Hemiptera: Pseudococcidae) en España. VI Congreso Nacional de Entomología Aplicada. Palma de Mallorca, España. P. 45.

BELTRÀ A., SOTO A. 2012a. Pseudococcidos de importancia agrícola y ornamental en España. Ed. Universitat Politècnica de València. 100 pp.

BELTRÀ A., SOTO A. MALAUSA T. 2012. Molecular and morphological characterisation of Pseudococcidae surveyed on crops and ornamental plants in Spain. Bulletin of Entomological Research 102, 165–172 <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485311000514>

BEN-DOV Y., MILLER D.R., GIBSON G.A.P. 2001. ScaleNet <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>

BEUNING L.L., MURPHY P., WU E., BATCHELOR T.A., MORRIS B.A.M. 1999. Molecular-based approach to the differentiation of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) species. Journal of Economic Entomology. 92: 463-473.

CABALEIRO C., SEGURA A. 2006. Seguimiento de la población de *Planococcus citri* Risso (Hemiptera: Pseudococcidae) en un viñedo de Rías Baixas (Galicia). Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas. 32: 339-344.

CARNERO A., PEREZ G. 1986. Cócidos (Homoptera: Coccoidea) de las Islas Canarias. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA). Madrid. 86 pp. [www.azoresbioportal.angra.uac.pt/files/publicacoes\\_Carnero86\\_CoccidosDeLasIslasCanarias.pdf](http://www.azoresbioportal.angra.uac.pt/files/publicacoes_Carnero86_CoccidosDeLasIslasCanarias.pdf)

CATERINO M. S., CHO S., SPERLING F. A. H. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of babel. *Annual Review of Entomology*, 45: 1-54. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.1>

CAVALIERI V., MAZZEO G., GARZIA G., BUONOCORE E. RUSSO A. 2008. Identification of *Planococcus ficus* and *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) by PCR-RFLP of COI gene. *Zootaxa* 1816: 65–68. <http://www.mapress.com/zootaxa/2008/f/z01816p068.pdf>

CLARY D. O., WOLSTENHOLM D. R. 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution* 22: 252–271.

CORREA M.C.G., GERMAIN J-F., MALAUSA T., ZAVIEZO T. 2012. Molecular and morphological characterization of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from Chilean vineyards. *Bulletin of Entomological Research* 102: 524–530 <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485312000053>

COX J.M. 1989. The mealybug genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae). *Bulletin British Museum (Natural History). Entomology* 58(1): 1-78.

COX J.M., WETTON J.M. 1988. Identification of the mealybug, *Planococcus halli* commonly occurring on yams (*Dioscorea* sp.) in Nigeria and the West Indies. *Bulletin of Entomological Research* 78: 561-571

DAANE K.M, MIDDLETON M.C., SFORZA R., COOPER M.L., WALTON V.M., WALSH D.B., ZAVIEZO T., ALMEIDA R.P.P. 2011. Development of a Multiplex PCR for Identification of Vineyard Mealybugs. *Environmental Entomology* 40(6): 1595-1603. <http://dx.doi.org/10.1603/EN11075>

DANZIG E.M., GAVRILOV I.A. 2010. Mealybugs of the genera *Planococcus* and *Crisicoccus* (Sternorrhyncha: Pseudococcidae) of Russia and adjacent countries. *Zoosystematica Rossica*, 19 (1): 39–49. [www.zin.ru/journals/zsr/pdf/2010-1/ZooSys\\_19\(1\)\\_39-49\\_dantsig\\_2.pdf](http://www.zin.ru/journals/zsr/pdf/2010-1/ZooSys_19(1)_39-49_dantsig_2.pdf)

DE LIÑAN C. 2014. *Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales* 2014. 30ª ed. 816 pp.

DEMONTIS M. A., ORTU S., COCCO A., LENTINI A., MIGHELI Q. 2007. Diagnostic markers for *Planococcus ficus* and *Planococcus citri* by RAPD and species-

specific mitochondrial DNA primers. *Journal of Applied Entomology* 131(1), 59–64.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01126.x>

DOWNIE D.A., GULLAN P.J. 2004. Phylogenetic analysis of mealybugs (Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae) based on DNA sequences from three genes, and review of the higher classification. *Syst. Entomol.* 29:238-259

GARCÍA MARÍ F. 2012. Plagas de los cítricos. 1ª ed. M.V. Phytoma-España, SL. (Phytoma-España).556 pp.

HARDY N.B., GULLAN P.N., HODGSON C.J. 2008. A subfamily level classification of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) based on integrated molecular and morphological data. *Systematic Entomology* 33: 51–71.

HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L. & DEWAARD, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, series B: Biological Sciences* 270, 313–321.

HEBERT, P.D.N., RATNASINGHAM, S. & DEWAARD, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London, series B (Suppl.): Biological Sciences* 270, S96–S99

HOY M. 1994. *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications*. Academic Press

INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS. Generalitat Valenciana. Consultada el día 21/07/2014. Gestión Integrada de Plagas y Enfermedades en Cítricos. <http://gipcitricos.ivia.es/>.

JACAS J.A., URBANEJA A. 2008. Control biológico de plagas agrícolas. 1ª ed. M.V. Phytoma-España, SL. (Phytoma-España). 496 pp.

KOCHER T.D., THOMAS W.K., MEYER A., EDWARDS S.V., PÄÄBO S., VILLABLANCA F.X., WILSON A.C.. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 86: 6196-6200.  
<http://cichlid.umd.edu/cichlidlabs/kocherlab/pdfs/Kocher1989a.pdf>

- KOL-MAIMON H., GHANIM M., FRANCO J.C., MENDEL Z. 2014. Evidence for gene flow between two sympatric mealybug species (Insecta; Coccoidea; Pseudococcidae). PLoS ONE 9(2):e88433. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088433>
- LE VIEUX P. D. & MALAN A. P. 2013. An Overview of the Vine Mealybug (*Planococcus ficus*) in South African Vineyards and the Use of Entomopathogenic Nematodes as Potential Biocontrol Agent. S. Afr. J. Enol. Vitic, 34(1):108-118. <http://www.sawislibrary.co.za/dbtextimages/78119.pdf>
- LLORENS J.M. 1990. Homóptera I cochinillas de los cítricos y su control biológico. Pisa ediciones. 260 pp.
- MALAUSA T., FENIS A., WAROT S., GERMAIN J.-F., RIS N., PRADO E., BOTTON M., VANLERBERGHE-MASUTTI F., SFORZA R., CRUAUD C., COULOUX A., KREITER P. 2010. DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). Journal of Applied Entomology <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0418.2009.01495.x>
- MALLOCH G., HIGHET F., KASPROWICZ L., PICKUP J., NEILSON R., FENTON B. 2006. Microsatellite marker analysis of peach-potato aphids (*Myzus persicae*, Homoptera: Aphididae) from Scottish suction traps. Bulletin of Entomological Research. 96: 573–582.
- MANI M., KRISHNAMOORTHY A., SHIVARAJU C., 2011. Biological suppression of major mealybug species on horticultural crops in India. J. Hortl. Sci. 6(2):85-100, 2011. <http://www.cabi.org/cabdirect/FullTextPDF/2012/20123330804.pdf>
- MARTÍNEZ FERRER M.T. 2003. Biología y control del cotonet *Planococcus citri* (Homoptera: Pseudococcidae) en huertos de cítricos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/27775/tesisUPV1762.pdf?sequence=1>
- MARTINS R.F., ZINA V., DA SILVA E.B., REBELO M.T., FIGUEIREDO E., MENDEL Z., PAULO O.S., FRANCO J.C., SEABRA S.G. 2012. Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for the citrus mealybug, *Planococcus citri*, and cross-amplification in two other mealybug species. Journal of Genetics Vol. 91.
- MASTEN MILEK T., SIMALA M., KRČMAR S. 2008. Species of the genus *Planococcus* Ferris, 1950 (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) with special regard

to *Planococcus vovae* (Nasonov, 1908) as a species newly recorded in Croatia. NAT. CROAT. (17)3 157-168 <http://hrcak.srce.hr/file/5387>

MENDEL Z., ZADA A., DUNKELBLUM E., ASSAEL F., HAREL M., COJOCARU M. 2003. Sex pheromone of the vine mealybug, *Planococcus ficus* in Israel: occurrence of a second component in a mass-reared population. J. Chem. Ecol. 29:977-988.

MGOCKE N.; ADDISON P. 2009. Interference of ants (Hymenoptera: Formicidae) with biological control of the vine mealybug *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae). Biological Control 49 (2009) 180–185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.02.001>

MILLER D. R., RUNG A., VENABLE G.L., GILL R.J., WILLIAMS D. J. 2007. Scale Insects, Identification tools for species of quarantine importance: Mealybugs. [www.sel.barc.usda.gov/ScaleKeys/ScaleInsectsHome/ScaleInsectsMealybugs.html](http://www.sel.barc.usda.gov/ScaleKeys/ScaleInsectsHome/ScaleInsectsMealybugs.html) Consultada en mayo de 2014

MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. Consultada el día 19/6/2014. Registro de otros medios de defensa fitosanitaria. Organismos de Control Biológico (OCB). [www.magrama.gob.es/es/](http://www.magrama.gob.es/es/).

MORENO SALMERÓN J. 2011. Prospección e identificación de cochinillas algodonosas (Hemiptera: Pseudococcidae) y búsqueda de parasitoides asociados en cultivos hortícolas protegidos del poniente almeriense. Trabajo Final de Carrera. Universidad de Almería <http://repositorio.ual.es:8080/jspui/bitstream/10835/832/1/PROYEC~1.pdf>

PACHECO DA SILVA V.C., BERTIN A., BLIN A., GERMAIN J.-F., BERNARDI D., RIGNOL G., BOTTON M., MALAUSA T. 2014. Molecular and Morphological Identification of Mealybug Species (Hemiptera: Pseudococcidae) in Brazilian Vineyards. PLOS ONE 9(7) e103267. <http://dx.doi.org/10.1603/EN1107510.1371/journal.pone.0103267> <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0103267>

PASQUALINI E., PRADOLESI G. 2013. Confusión sexual de *Planococcus ficus* una técnica moderna como estrategia de control en los viñedos. Phytoma 254: 56

PELLIZZARI G. GERMAIN J.F. 2010. Scales (Hemiptera, Superfamily Coccoidea). Chapter 9.3. BioRisk 4(1): 475–510. doi: 10.3897/biorisk.4.45

PLANTWISE PEST DISTRIBUTION. Consultada agosto 2014. <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap.aspx>.

RAMOS PORTILLA A. A., SERNA CARDONA F.J. 2004. Coccoidea de Colombia, con énfasis en las cochinillas harinosas (Hemiptera: Pseudococcidae). Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín 57 (2) 2383-2412 [www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-28472004000200003&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472004000200003&lng=en&nrm=iso). ISSN 0304-2847

ROSCIGLIONE, B., M.A. CASTELLANO, G.P. MARTELLI, V. SAVINO, AND G. CANNIZZARO. 1983. Mealybug transmission of grapevine virus A. Vitis. 22: 331-347

RUNG A., MILLER D. R., SCHEFFER S.J. 2009. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Method to Distinguish Three Mealybug Groups Within the *Planococcus citri*-*P. minor* Species Complex. Journal of Economic Entomology 102(1): 8-12 (2009)

RUNG A., SCHEFFER S.J., EVANS G., MILLER D. 2008. Molecular Identification of Two Closely Related Species of Mealybugs of the Genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 101(3): 525-532 (2008)

SACCAGGI D.L. 2006. Development of molecular techniques to identify mealybugs of importance on grapevine in South Africa. Tesis. University of Pretoria. <http://upetd.up.ac.za/thesis/available/etd-03272007-101612/unrestricted/00dissertations.pdf.pdf>

SACCAGGI D.L., KRÜGER K., PIETERSEN G. 2007. A multiplex PCR assay for the simultaneous identification of three mealybug species. Bulletin of Entomological Research. doi:10.1017/S000748530700538X

SIMON C., FRATI F., BECKENBACH A., CRESPI B., LIU H., FLOOK P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Annals of the Entomological Society of America 87(6): 651-701.

TANWAR R., JEYAKUMAR P., MONGA D. 2007. Mealybug and their management. Technical bulletin 19. New Delhi. 20 p. [http://www.ncipm.org.in/mealybugs/Bulletin-Mealybugs%20\(English\).pdf](http://www.ncipm.org.in/mealybugs/Bulletin-Mealybugs%20(English).pdf)

TRANFAGLIA A., TREMBLAY E. 1982. A morphological comparison between *Planococcus citri* and *Planococcus ficus* and their F1 hybrids. Entomotaxonomia 4(1-2) 1-5

TREMBLAY E., ROTUNDO G. 1982b. Preliminary report on the attractivity of the synthetic pheromone of *Planococcus citri* (Rs.) (Homoptera Coccoidea) in comparison to virgin females. Boll. Lab. Entomol. Agrar. F. S. 39:97-101.

ULUBAŞ SERÇE Ç., KAYDAN M.B., KILINÇER A.N., ERTUNÇ F. 2007. Investigation of mealybug (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) species from Turkey by RAPD. Phytoparasitica, 35(3), 232–238.

VCOSTSAN-CECÍLIA L., ST-CECÍLIA F., DOCARMPEDOS E., DESOUSA M., BREU F., FERIAOLV D., ANRAECVLHO G., 2010. Extratos de plantas no controle de *Planococcus citri* (RISSO, 1813) (HEMIPTERA PSEUDOCOCCIDAE) em cafeeiro. <http://www.coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/view/171/pdf>

WILLIAMS D. J. 1962. The British Pseudococcidae (Homoptera : Coccoidea). Williams. Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology Vol. XII 1962 1-79.

WILLIAMS D. J., GRANARA DE WILLINK M. C. 1992. Mealybugs of Central and South America. CAB International. London, England. 635 pp.



## ANEJO 1: ESPECIES DE PSEUDOCÓCCIDOS CITADAS EN ESPAÑA PENINSULAR.

Basado en Ben-Dov (2001) y Beltrà *et al.* (2012)

Especie	Hospedantes	Citas
<i>Amonostherium rorismarinis</i>	Lamiaceae	23, 17,4, 8
<i>Antonina crawi</i>	Poaceae, Rubiaceae (1 sp)	5,4,2
<i>Antonina graminis</i>	Cyperaceae, Poaceae	22
<i>Antonina purpurea</i>	Poaceae	8,2, 14, 17, 19,4,, 20
<i>Chaetococcus phragmitis</i>	Poaceae	19,4,2,3, 8
<i>Cucullococcus arrabidensis</i>	Ericaceae	16,4, 8
<i>Delottococcus aberiae</i>	27 fam. Botánicas	21
<i>Dysmicoccus boninsis</i>	11 fam. Botánicas	6
<i>Dysmicoccus grassii</i>	24 fam. botánicas	--
<i>Dysmicoccus walkeri</i>	Crassulaceae, Cyperaceae, Ericaceae y Poaceae	16,4
<i>Ferrisia malvastra</i>	30 fam. Botánicas	6
<i>Fonscolombia tomlinii</i>	6 fam. Botánicas	4
<i>Horicoccus hispanicus</i>	Poaceae (1 sp)	15, 8
<i>Heliococcus bohemicus</i>	17 fam. Botánicas	13, 8
<i>Heliococcus minutus</i>	Brassicaceae, Ericaceae y Fabaceae y Lamiaceae	12, 5,4, 8, 22
<i>Hypogeoecoccus pungens</i>	6 fam. Botánicas	6
<i>Iberococcus andalusicus</i>	Plumbaginaceae (4 spp)	12, 18, 19,4, 8
<i>Mirococcopsis subterranea</i>	5 fam. Botánicas	13,4, 8
<i>Nipaeococcus delassusi</i>	Ericaceae (2 spp)	5, 13,4, 8
<i>Nipaeococcus nipae</i>	50 fam. Botánicas	13,4, 8
<i>Peliococcus cycliger</i>	Oleaceae y Poaceae (2 spp)	23,4, 22
<i>Phenacoccus gossypii</i>	12 fam. Botánicas	23,4
<i>Phenacoccus hystrix</i>	Hippocastanaceae y Pinaceae (2 spp)	4
<i>Phenacoccus madeirensis</i>	49 fam. Botánicas	6
<i>Phenacoccus meridionalis</i>	Chenopodiaceae y Salsolaceae (2 spp)	8, 24, 18,4, 8
<i>Phenacoccus parietariae</i>	Tamaricaceae y Urticaceae (4 spp)	4
<i>Phenacoccus peruvianus</i>	9 fam. Botánicas	7
<i>Phenacoccus solani</i>	32 fam. Botánicas	6
<i>Phenacoccus yerushalmi</i>	Pinaceae (3 spp )	9
<i>Planococcus citri</i>	257 hospedantes de 87 familias botánicas	4
<i>Planococcus ficus</i>	24 fam. Botánicas	13,1,4, 8
<i>Planococcus vovae</i>	Araceae, Cupressaceae, Lauraceae y Taxaceae	10, 8, 22
<i>Pseudococcus calceolariae</i>	49 fam. Botánicas	5, 8,4
<i>Pseudococcus cryptus</i>	43 fam. Botánicas	22
<i>Pseudococcus longispinus</i>	85 fam. Botánicas	5, 23,4, 8
<i>Pseudococcus viburni</i>	98 fam. Botánicas	13,4, 8, 11
<i>Seabrina cistorum</i>	Cistaceae (3 spp)	4
<i>Trabutina andreui</i>	Chenopodiaceae (1 sp )	24,4, 8
<i>Trabutina elástica</i>	Tamaricaceae (5 spp.)	24,4, 8
<i>Trabutina mannipara</i>	Tamaricaceae	Nuevo

1 EzzatMc1956, 2 HendriKo1999, 3 KosztaKo1988F, 4 Martin1985, 5 Balach1935b, 6 BeltraSo2011, 7 BeltraSoGe2010, 8 BenDov1994, 9 BenDovMa2001D, 10 Danzig1986, 11 GimpelMi1996, 12 GomezM1928, 13 GomezM1937, 14 GomezM1954, 15 GomezM1956a, 16 GomezM1957, 17 GomezM1960O, 18 GomezM1965, 19 GomezM1968, 20 Marott1992a, 21 MillerGi2011, 22. SancheBe2010, 23 GomezM1946, 24 GomezM1948.

## REFERENCIAS

[Balach1935b]; BALACHOWSKY A.S. 1935b. Les cochenilles de l'Espagne. Revue de Pathologie vegetale et d'Entomologie agricole de France 22: 255-269.

[BeltraSo2011]; BELTRÀ A., SOTO A. 2011. New records of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from Spain Phytoparasitica DOI 10.1007/s12600-011-0178-0

[BeltraSoGe2010] ; BELTRÀ A., SOTO A., GERMAIN J.-F., MATILE-FERRERO D., MAZZEO G., PELLIZZARI G., RUSSO A., FRANCO J.C., WILLIAMS D.J. 2010. The Bougainvillea mealybug *Phenacoccus peruvianus*, a rapid invader from South America to Europe. (Summary In Greek). Entomologia Hellenica 19: 137-143

[BenDovMa2001D] ; BEN-DOV Y., MATILE-FERRERO D. 2001. On the distribution of *Phenacoccus yerushalmi* Ben-Dov (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) in the Mediterranean Basin. Phytoparasitica 29(2): 167.

[BenDov1994] ; BEN-DOV Y. 1994. A systematic catalogue of the mealybugs of the world (Insecta: Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae and Putoidae) with data on geographical distribution, host plants, biology and economic importance. Intercept Limited, Andover, UK. 686 pp.

[Danzig1986]; DANZIG E.M. 1986. New data on the systematics of Coccinea (Homoptera) of the USSR fauna. (In Russian; Summary In English). Vestnik Zoologii (No. 4): 18-22.

[EzzatMc1956] ; EZZAT Y.M., MCCONNELL H.S. 1956. A classification of the mealybug tribe *Planococcini* (Pseudococcidae: Homoptera). Bulletin of the Maryland Agriculture Experiment Station A-e84: 1-108.

[GimpelMi1996]; GIMPEL W.F., MILLER, D.R. 1996. Systematic analysis of the mealybugs in the *Pseudococcus maritimus* complex (Homoptera: Pseudococcidae). Contributions on Entomology, International 2: 1-163.

[GomezM1928]; GÓMEZ-MENOR ORTEGA J. 1928. Estudios sobre cóccidos de España. (In Spanish). EOS 4: 339-362.

[GomezM1937]; GÓMEZ-MENOR ORTEGA J. 1937. Cóccidos de España. (In Spanish). Instituto de Investigaciones Agronómicas, Estación, Madrid. 432 pp.

- [GomezM1954]; GÓMEZ-MENOR ORTEGA J. 1954. Adiciones a los "Cóccidos de España" (3a nota). (In Spanish). EOS 30: 119-148.
- [GomezM1956a]; GÓMEZ-MENOR ORTEGA J. 1956a. Datos sobre cóccidos de España. (In Spanish). Bollettino del Laboratorio di Zoologia Generale e Agraria della Facolta Agraria in Portici 33: 611-620.
- [GomezM1957]; GÓMEZ-MENOR ORTEGA J. 1957. Adiciones a los cóccidos de España (4a nota). (In Spanish). EOS 33: 39-86.
- [GomezM1960]; GÓMEZ-MENOR ORTEGA J. 1960. Adiciones a los "Cóccidos de España". V. (Superfamilia Coccoidea). (In Spanish). EOS 36: 157-204.
- [GomezM1965]; GÓMEZ-MENOR ORTEGA J. 1965. Adiciones a los "Cóccidos de España", (6a nota). Especies del genero *Evallaspis* con su distribución geográfica en la Peninsula a las Islas Baleares. (In Spanish). EOS 41: 87-114.
- [GomezM1968]; GÓMEZ-MENOR ORTEGA J. 1968. Adiciones a los "Coccidos de España" VII nota (Hem. Homoptera). (In Spanish). EOS 43: 541-563.
- [HendriKo1999]; HENDRICKS, H. & KOSZTARAB, M. 1999. In Revision of the Tribe Serrolecaniini (Homoptera: Pseudococcidae). de Gruyter, Berlin & New York. xiv + 213 pp.
- [KosztaKo1988F]; KOSZTARAB, M., KOZÁR F. 1988. Scale Insects of Central Europe. Akademiai Kiado, Budapest. 456 pp.
- [Marott1992a]; MAROTTA S. 1992a (1990). Ricerche su pseudococcidi (Homoptera: Coccoidea) dell'Italia centro-meridionale. [Research on pseudococcids (Homoptera: Coccoidea) from central Italy.] (In Italian; Summary In English). Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria 'Filippo Silvestri' 47: 63-111.
- [Martin1985]; MARTIN-MATEO M.P. 1985. Inventario preliminar de los cóccidos de España. III. Pseudococcidae, Ortheziidae y Margarodidae. (In Spanish; Summary In English). Graellsia, Revista de Entomólogos Ibéricos. Madrid 41: 89-104.
- [MillerGi2011]; MILLER D.R., GILIOME E J.H. 2011. Systematic revision of the mealybug genus *Delottococcus* Cox & Ben-Dov (Hemiptera: Pseudococcidae) African Entomology 19(3):614-640

[SancheBe2010]; SÁNCHEZ-GARCÍA I.; BEN-DOV, Y. 2010. New records and data on scale insects (Hemiptera: Coccoidea) from southern Spain. (Summary In English, Spanish). Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.) No. 46: 319-320

[GomezM1946]; GÓMEZ-MENOR ORTEGA J. 1946. Adiciones a los "Cóccidos de España" (1a nota). (In Spanish). EOS 22: 59-106.

[GomezM1948]; GÓMEZ-MENOR ORTEGA J. 1948. Adiciones a los "Cóccidos de España" (2a nota). (In Spanish). EOS 24: 73-121.



## ANEJO 2: COMPARACIÓN DE SECUENCIAS AMPLIFICADAS CON LOS CEBADORES JERRY Y PAT

Comparación de las secuencias parciales del gen CO I del ADNmt CO I de *P. citri* (GenBank Accesoión DQ238221) y *P. ficus* (GenBank Accesoión DQ238220), obtenidas con los cebadores universales C1-J-2183 (alias Jerry) y TL2-N-3014 (alias Pat) (Simon et al. 1994). Para establecer la posición de las bases, se ha seguido la convención de Simon *et al.* (1994), que toma como referencia la secuencia completa del ADNm de *Drosophila yakuba* Burla (Diptera: Drosophilidae) (Clary and Wolstenholme 1985; GenBank Accesoión: X03240)

La alineación de las secuencias se ha realizado con CLUSTAL W (1.82) con la aplicación web “CLUSTAL/Jalview A multiple sequence alignment tool with a Java viewer” en <http://www.hongyu.org/software/clustal.html>

En verde: entre las bases 2161 y 2183, secuencia de C1-J-2183 (alias Jerry) que anilla en una zona intermedia de la secuencia del gen COI, el cual está comprendido entre las bases 1470 y 3009.

En verde, entre las bases 3014 y 3038, secuencia del reverso complementario de TL2-N-3014 (alias Pat), salvo la base 3034 que en el complementario reverso de Pat es T. Este cebador anilla en la zona que corresponde al gen contiguo correspondiente al ARNt-Leu, el cual está comprendido entre las bases 3012 y 3077.

En azul, entre 2232 y 2260, secuencia del cebador C1-J-2260 específico de *P. ficus*. Y en rojo, entre 2396 y 2427, secuencia del cebador C1-J-2427 específico de *P. citri*. )

<i>P. citri</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>P. ficus</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>D. yakuba</i>	CAACATTTAT	TTTGATTTTT	TGGTCACCCT	GAAGTTTATA	TTTTAATTTT
	2161	2171	2181	2191	2201
<i>P. citri</i>	-----TT	GGAGCTATAT	CTCAAATTAT	AAATCARGAA	AGAGGAAAAA
<i>P. ficus</i>	-----GATTT	GGTGCTATAT	CTCAAATTAT	AAATCAAGAA	AGGGGAAAAC
<i>D. yakuba</i>	ACCGGGATTT	GGAATAATTT	CTCATATTAT	TAGACAAGAA	TCTGGTAAAA
	**	** ** *	**** *****	* ** **	** ** *
	2211	2221	2231	2241	2251
<i>P. citri</i>	TARAAATTTT	TAGTAAAATT	AATATAATTT	TTGCTATAAT	TTCAATTGGA
<i>P. ficus</i>	TAGAAATTTT	TAGAAAAATT	AACATAATTT	TTGCCATAAT	TTCAATTGGT
<i>D. yakuba</i>	AGGAAACTTT	CGGTTCTTTA	GGAATAATCT	ATGCTATACT	TGCTATTGGA
	*** **	* *	***** *	*** ** *	* * ** **
	2261	2271	2281	2291	2301
<i>P. citri</i>	ATTTTAGGTT	TTATTGTTTG	AGCTCACCAT	ATATTTACTA	TCGGATTAGA
<i>P. ficus</i>	ATTTTAGGTT	TTATTGTTTG	AGCTCATCAT	ATATTTACTA	TTGGTTTAGA
<i>D. yakuba</i>	TTATTAGGAT	TTATTGTTTG	AGCTCATCAT	ATATTTACAG	TTGGAATAGA
	* ***** *	***** **	***** **	*****	* ** ** **
	2311	2321	2331	2341	2351
<i>P. citri</i>	TATYGATACA	CAATTATATT	TTATATCAGC	TACAATAATT	ATTGCTATTC
<i>P. ficus</i>	TATTGACACA	CAATTATATT	TTATATCAGC	TACAATAATT	ATTGCAATCC
<i>D. yakuba</i>	CGTTGATACA	CGAGCTTATT	TTACTTCTGC	TACTATAAAT	ATTGCGGTTC
	* ** **	* * ** **	*** ** **	*** *****	***** * *
	2361	2371	2381	2391	2401
<i>P. citri</i>	CTACAAGAAT	TAAAATCTTT	AGATGAATAA	TAACCTTAAA	TGGAAAAAAA
<i>P. ficus</i>	CTACTAGAAT	TAAAATTTTT	AGTTGAATAA	TAACCTTAAA	TGGTAAAAAA
<i>D. yakuba</i>	CTACAGGAAT	TAAAATTTTT	AGATGATTAG	CTACTTTACA	TGGAACCTCAA
	**** **	***** **	** ** ** *	***** *	*** * **
	2411	2421	2431	2441	2451
<i>P. citri</i>	ATTCTTAATT	CATCTATTAA	CTTTTGATCA	ATTGGATTTA	TTATTATATT
<i>P. ficus</i>	ATTTTAAATT	CATCTATTAA	TTTTTGATCA	ATTGGATTCA	TTATTATATT
<i>D. yakuba</i>	CTTTCTTATT	CTCCAGCTAT	TTTATGAGCT	TTAGGATTTG	TTTTTTTTATT
	** ** *	* * **	** ** ** *	* ** **	** ** ** **
	2461	2471	2481	2491	2501
<i>P. citri</i>	YACATTAGGA	GGATTRACTG	GAATTATTTT	ATCAAATTCT	ATTATTGATA
<i>P. ficus</i>	TACTTTAGGA	GGTTTAACTG	GTATTATTTT	ATCAAATTCT	ATTATTGATA
<i>D. yakuba</i>	CACAGTAGGA	GGATTAACAG	GAGTTGTATT	AGCTAATTCA	TCAGTTGATA
	** *****	** ** ** *	* ** * **	* * ** **	*****
	2511	2521	2531	2541	2551
<i>P. citri</i>	TTAATTTACA	TGACACATAT	TTCGTTGTAG	CTCATTTTCA	TTATGTATTA
<i>P. ficus</i>	TTAATTTACA	TGATACATAC	TTTGTTGTAG	CTCACTTTCA	CTATGTATTA
<i>D. yakuba</i>	TTATTTTACA	TGATACTTAT	TATGTAGTAG	CTCATTTCCA	CTACGTTTTA
	*** ** **	*** ** **	* ** ** **	*** ** **	** ** ** **
	2561	2571	2581	2591	2601

<i>P. citri</i>	TCTATAGGAG	TAATTTTTTC	AATTTTTTCA	AGATTTATTT	TTTGATCACC
<i>P. ficus</i>	TCAATAGGAG	TAATTTTTTC	TATTTTTTCA	AGTTTTATTT	TTTGATCTCC
<i>D. yakuba</i>	TCAATAGGAG	CTGTATTTGC	TATTATAGCA	GGTTTTATTC	ACTGATACCC
	** *****	* *** *	*** * **	* *****	**** **
	2611	2621	2631	2641	2651
<i>P. citri</i>	ATTACTATTT	AATGTTTCTT	TAAATAATAA	TTGATTAATA	ATTAATTTTT
<i>P. ficus</i>	ATTATTATTT	AATATTTCTT	TAAATAATAA	TTGATTAATA	ATTAATTTTT
<i>D. yakuba</i>	ATTATTTACT	GGATTGACAT	TAAATAATAA	ATGGTTAATA	AGTCAATTTA
	**** * *	* * *	*****	** *****	* * * **
	2661	2671	2681	2691	2701
<i>P. citri</i>	TTAATCTATT	TTTATCTATY	AATTTAACCT	TTTTTCCTCA	ACATTTTTTA
<i>P. ficus</i>	TCAACCTTTT	TTTATCTATT	AATTTAACTT	TTTTTCCTCA	ACATTTTTTA
<i>D. yakuba</i>	TTATTATGTT	TATTGGAGTA	AATTTAACAT	TTTTCCCCCA	ACATTTTTTA
	* * * **	* * *	***** *	**** ** **	*****
	2711	2721	2731	2741	2751
<i>P. citri</i>	GGAATAAATG	GAATACCTCG	TCGTTATATT	ATATATTCTG	ATTATTTTTAT
<i>P. ficus</i>	GGTATAAATG	GAATACCCCG	TCGTTATATT	ATATATTCTG	ATTATTTTTAT
<i>D. yakuba</i>	GGATTAGCAG	GAATACCTCG	ACGTTATTCA	GATTACCCTG	ATGCTTACAC
	** ** *	***** **	*****	** ***	** ** *
	2761	2771	2781	2791	2801
<i>P. citri</i>	TTTATGAAAT	AATATTTTCA	CAGTTGGTTC	ATCTATAACA	ATTATTTTTTA
<i>P. ficus</i>	TTTATGAAAT	AATATTTTCA	CAATTGGATC	TTCGATAACA	ATTATTTTTTA
<i>D. yakuba</i>	TACATGAAAT	GTTGTGTCTA	CTATTGGGTC	AACTATTTCA	TTATTAGGAA
	* *****	* * **	* **** *	* ** **	* * *
	2811	2821	2831	2841	2851
<i>P. citri</i>	CTYTAATTTT	TATTTACATT	ATTATTGAAT	CATTTATATG	TAAACGTTTA
<i>P. ficus</i>	CTTTAATTTT	TATTTATATT	ATTATTGAGT	CTTTAATATG	TAAACGTTTA
<i>D. yakuba</i>	TTTTATTTTT	TTTCTATATT	ATTTGAGAAA	GTTTAGTGTC	TCAACGACAA
	* ** ****	* * ** **	*** **	** * *	* **** *
	2861	2871	2881	2891	2901
<i>P. citri</i>	ATTATATTTA	AAATAAAATT	---TTTTAAT	ATTGAATGAT	--TAAATAAT
<i>P. ficus</i>	ATTATATTTA	AAATAAAATT	---TTTTAAT	ATTGAATGAT	--TAAATAAT
<i>D. yakuba</i>	GTAATTTATC	CAATTCAATT	AAATTCATCT	ATTGAATGAT	ATCAAAATAC
	* ** * *	*** ****	** *	*****	*** *
	2911	2921	2931	2941	2951
<i>P. citri</i>	TCACCTAATT	TAAATCATAC	ATTTA-----	-----	-----
<i>P. ficus</i>	TCTCCTAATT	TAAATCATAC	-----	-----	-----
<i>D. yakuba</i>	ACCCCAGCT	GAACATAGAT	ATTCTGAATT	ACCACTTTTA	ACAAATTAAT
	* ** * *	** * *			
	2961	2971	2981	2991	3001
<i>P. citri</i>	-----	-----	-----		
<i>P. ficus</i>	-----	-----	-----		
<i>D. yakuba</i>	TTCTAATATG	GCAGATTAGT	GCAATGGA		
	3011	3021	3031		