

# **UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

## **ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

### **Máster Universitario Oficial en Ingeniería Agronómica**



#### **PROSPECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ALGUNAS ESPECIES PLAGA DEL GRANADO: COCHINILLAS ALGODONOSAS, PULGONES Y BARRENETAS**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**Septiembre – 2016**

**AUTOR: Manuel Cantó Tejero**

**TUTOR: Pedro Luis Guirao Moya**

## MASTER EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

### REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Título: PROSPECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ALGUNAS ESPECIES PLAGA DEL GRANADO: COCHINILLAS ALGODONOSAS, PULGONES Y BARRENETAS

Title: PROSPECTION AND IDENTIFICATION OF SOME POMEGRANATE PESTS: MEALYBUGS, APHIDS AND MOTHS

Modalidad: Experimental

Type: Research

Autor/Author: Manuel Cantó Tejero

Director/es/Advisor: Pedro Guirao Moya

Convocatoria: Septiembre de 2016

Month and year: Septiembre de 2016

Número de referencias bibliográficas/number of references: 52

Número de tablas/Number of tables: 12

Número de figuras/Number of figures: 24

Número de planos/Number of maps: 0

Palabras clave: *Aphis gossypii*, *Aphis punicae*, *Apomyelois ceratoniae*, *Cryptoblabes gnidiella*, *Planococcus citri*, *Punica granatum*

Key words: *Aphis gossypii*, *Aphis punicae*, *Apomyelois ceratoniae*, *Cryptoblabes gnidiella*, *Planococcus citri*, *Punica granatum*

**Resumen:**

Las cochinillas algodonosas, pulgones y barrenetas son algunas de las plagas más importantes del granado. Dado que los estudios realizados acerca de las plagas del granado son muy escasos, se ha estudiado la situación actual en cuanto a las especies de cochinillas algodonosas, pulgones y barrenetas presentes en las provincias de Alicante y Murcia. Para ello se han tomado muestras de las tres plagas en varias localidades. Se han identificado morfológicamente y en el caso de las cochinillas algodonosas también se han identificado mediante PCR a partir de un marcador basado en la amplificación de un fragmento en el ADN mitocondrial del gen que codifica la subunidad I de la enzima Citocromo Oxidasa (COI). Las especies identificadas más frecuentemente han sido: la cochinilla algodonosa *Planococcus citri*, los pulgones *Aphis gossypii* y *Aphis punicae* y las barrenetas *Apomyelois ceratoniae* y *Cryptoblabes gnidiella*. Por primera vez se ha encontrado la presencia de otro pseudocóccido del género *Phenacoccus* y el pulgón *Brachycaudus helichrysi* que no habían sido citados hasta el momento sobre granado en España. También se han elaborado curvas de vuelo para las dos especies de barrenetas.

**Abstract:**

The mealybugs, aphids and moths are some of the most important pest of pomegranate. Inasmuch as studies realized on pomegranate pests are very scarce, it has studied the actual situation regarding the species of mealybugs, aphids and moths present in the provinces of Alicante and Murcia. This has been taken samples of the three pests at various locations. They were identified morphologically and in case the mealybugs have also been identified by molecular methods, by PCR amplification with a specific marker of a DNA fragment of mitochondrial gene encoding the subunit I of the enzyme cytochrome oxidase (COI). The species most frequently identified were: the mealybug *Planococcus citri*, the aphids *Aphis gossypii* and *Aphis punicae* and the moths *Apomyelois ceratoniae* and *Cryptoblabes gnidiella*. For the first time it found the presence of another mealybug of the genus *Phenacoccus* and the aphid *Brachycaudus helichrysi* that had not been already cited on pomegranate in Spain. They have also been developed flight curves for the two species moths.

---

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi director el Dr. Pedro Guirao Moya por todo el tiempo dedicado para ayudarme, cada día que he pasado en el laboratorio me ha servido para aprender cosas nuevas. Sin su ayuda nada de esto habría sido posible.

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

Agradecer también al Dr. Pablo Melgarejo por su ayuda con los muestreos realizados y permitir utilizar su finca para la realización de parte de los muestreos del presente estudio.

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

A mi familia por todos los esfuerzos y el apoyo que me han dado.



1. Introducción.....	1
1.1. El granado.....	1
1.2. Plagas del granado.....	2
1.3. Cochinillas algodonosas.....	3
1.4. Pulgones.....	6
1.5. Barrenetas.....	8
2. Objetivos y plan de trabajo.....	12
3. Material y métodos.....	13
3.1. Toma de muestras.....	13
3.1.1. Muestreos de adultos de barrenetas.....	13
3.1.2. Muestreo de las tres plagas.....	14
3.2. Preparaciones microscópicas.....	15
3.2.1. Cochinillas algodonosas.....	15
3.2.2. Pulgones.....	17
3.2.3. Barrenetas.....	18
3.3. Instrumental óptico.....	20
3.4. Claves taxonómicas.....	20
3.4.1. Cochinillas algodonosas.....	20
3.4.2. Pulgones.....	21
3.4.3. Barrenetas.....	21
3.5. Análisis PCR.....	21
3.5.1. Extracción de ADN.....	21
3.5.2. Reacción PCR.....	22
3.5.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	24
4. Resultados y discusión.....	26
4.1. Cochinillas algodonosas.....	26
4.1.1. Estudio morfológico.....	26
4.1.2. Estudio molecular.....	34
4.2. Pulgones.....	36
4.3. Barrenetas.....	38
4.3.1. Curvas de vuelo de machos adultos.....	38
4.3.2. Genitalias de los machos.....	45
4.3.2.1. <i>Apomyeloides ceratoniae</i> .....	45
4.3.2.2. <i>Cryptoblabes gnidiella</i> .....	47
4.3.3. Alas de los machos de <i>Apomyeloides ceratoniae</i> .....	48
4.3.4. Orugas: Morfología.....	50
5. Conclusiones.....	53
6. Bibliografía.....	55

## 1. Introducción

### 1.1. El granado

El granado *Punica granatum* Linnaeus (Fam Lythraceae antes Punicaceae) es una especie originaria de Oriente Próximo. Su cultivo es muy importante en Irán, India, Turquía, China, EE.UU. y España. También cultivada en otros países del Mediterráneo y en Sudamérica. Sus propiedades alimenticias, farmacológicas, funcionales y cosméticas, han promovido un aumento de su demanda y de la superficie cultivada (Guirao, 2015).

Actualmente el cultivo del granado está en auge, sobre todo en la provincia de Alicante donde la superficie cultivada aumenta cada año. Según los datos del Anuario nacional de estadística (2014) en España se cultivaban 3.167 ha y se obtuvo una producción de 43.324 t, habiéndose producido un incremento constante de la superficie cultivada desde 2009 en la que esta era de unas 2.300 ha aproximadamente y una producción de 22.500 t. La primera comunidad autónoma productora a nivel nacional es la Comunidad Valenciana con un 80% de la superficie total cultivada y un 93% de la producción nacional. Le siguen las Comunidades autónomas de Andalucía y Murcia con 292 y 205 ha respectivamente.

En España tradicionalmente el granado ha sido un “frutal menor” siendo escasos los estudios sobre sus plagas y fisiopatías. En el siguiente apartado se muestran los estudios encontrados al respecto.

## 1.2. Plagas del granado

En el granado se han citado más de 150 artrópodos fitófagos a nivel mundial, habiéndose citado en la India 97 especies de insectos que afectan al granado, donde destaca como la más importante la mariposa del granado *Virachola* (= *Deudorix*) *isocrates* (Fabricius), a continuación son las polillas (*Eudocima* (= *Othreis*) *fullonia* (Clerk), *Eudocima* (= *Othreis*) *Materna* (Linn.), *Eudocima* (= *Othreis*) *homaena* Hub) y los barrenadores de la corteza (*Indarbela tetraonis* (Moore) e *Indarbela quadrinotata* (Walker) (Balikai *et al.*, 2011). En el caso de Turquía se consideran plaga más de 90 especies (Ozturk y Ulusoy, 2009; en Bartual *et al.*, 2014).

En cuanto a plagas y enfermedades en España, existe poca información, básicamente la de los trabajos de Melgarejo (1989, 1992, 2001 y 2003) y de Toledo *et al.*, (1991). Recientemente, durante el desarrollo del presente trabajo, Bartual *et al.*, (2014) realiza una nueva recopilación en la que considera a los pulgones (*Aphis gossypii* Glover y *Aphis punicae* Passerini), cochinillas algodonosas (*Planococcus citri* Risso) y lepidópteros (*Cryptoblabes gnidiella* Millère, *Apomyelois ceratoniae* Zeller y *Zeuzera pyryna* Linneo) como las plagas más comunes en los granados cultivados en el sureste peninsular español. Tampoco existe normativa de producción integrada sobre el cultivo, aunque Toledo *et al.*, (2000) propone una normativa para el cultivo, con umbrales para las diferentes plaga y enfermedades. Actualmente algunas materias activas que se encuentran autorizadas en otros cultivos frutales están en fase de ampliación de registro o con autorizaciones excepcionales, debido a la gran importancia que ha adquirido el cultivo en los últimos años.

Toledo *et al.*, (1991), propone la siguiente clasificación de las plagas del granado (desde 1, sin importancia hasta 4 muy importante): Pulgones 4; Cochinillas algodonosas 3; Barrenetas 3; Taladros 2; Ácaros 2; Caparretas o cochinilla de la tizne 1; Caparreta blanca 1; Vertebrados y caracoles 1. Melgarejo *et al.*, (2001) y Bartual *et al.*, (2014) también citan a la mosca de la fruta.

A continuación se repasan los tres tipos de plagas más importantes, a juicio de Toledo *et al.*, (1991) y de las observaciones personales del autor del presente trabajo.

### 1.3. Cochinillas algodonosas

También llamadas cotonet en la Comunidad Valenciana pertenecen a la familia Pseudococcidae. Constituyen la segunda mayor familia de la superfamilia de los cóccidos (*Coccoidea*). Se caracterizan por tener el cuerpo con secreciones ceras que le dan un aspecto algodonoso y blanquecino. Siempre se ha considerado a *Planococcus citri* la especie que ataca al granado, aunque se han citado otras especies pertenecientes a otros géneros como *Dysmicoccus*, *Phenacoccus*, *Pseudococcus* además de *Planococcus* (Ben Dov *et al.*, 2001).

Los huevos de estas especies son de color amarillo pálido, liso, brillante y elíptico midiendo en torno a 0,3 mm de longitud. Tanto machos como hembras pasan por tres estados ninfales en los que son muy activas y móviles. Son de forma elíptica alargada, poseen dos antenas, ojos salientes de color oscuro, tres pares de patas y de color amarillento. La hembra adulta es de menos de 3 mm de forma alargada, oval y con el cuerpo blando. 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, etc. Pueden tener 5 o 6 generaciones en la zona de cultivo. El periodo invernal se refugia en las raíces, bajo la corteza y en el suelo y el periodo de fructificación en el cáliz y entre varios frutos. Hacia finales de mayo primeros de junio comienzan a aparecer las primeras poblaciones al nivel del suelo en los chupones del árbol. Posteriormente la segunda generación aparece en la zona aérea hacia mediados de julio en zonas resguardadas del árbol o en agrupaciones de dos o tres frutos donde pueden refugiarse (Figura 1).





**Figura 1. Colonia de cochinillas algodonosas entre dos frutos.**

Los daños producidos por la cochinilla algodonosa resultan principalmente de sus hábitos alimenticios, que se derivan en una reducción de vigor en la planta, aparición de manchas cloróticas en la corteza del fruto. Sin embargo el principal daño es la secreción de melaza sobre la que se desarrollan los hongos denominados “negrillas” que dificultan la respiración, la fotosíntesis, y el control químico y biológico de plagas. Esta además sirve de cobijo a otras plagas como las barrenetas (que se tratarán en el apartado 1.5). Esta relación entre plagas secretoras de melazas (entre ellas las cochinillas algodonosas) y algunas especies de lepidópteros como *Cryptoblabes gnidiella* o *Apomyelois ceratoniae* ha sido ampliamente documentada (Beltrà *et al.*, 2012. Bodeheimer, 1951; Panis, 1969; Garrido & Busto, 1987; Serghiou, 1983; Vacante, 1988; Wysoki, 1989; Tremblay, 1990, en Silva & Mexia; 1999).

A nivel mundial se citan 30 especies de cochinillas algodonosas en el granado. De éstas 30 tan solo 5 están citadas en España y tan solo una se cita en el granado, *Planococcus citri* (Tabla 1) (Ben-Dov *et al.*, 2016).

Tabla 1. Especies de pseudocócidos citados en el granado a nivel mundial y en España.

Especie	Citadas sobre <i>P. granatum</i>	Citadas en España	Citadas sobre <i>P. granatum</i> en España
<i>Crisicoccus theobromae</i>	1, 2	---	---
<i>Dorsicha mangiferae</i>	5		
<i>Dysmicoccus grassii</i>	1, 2		
<i>Dysmicoccus neobrevipes</i>	1, 2		
<i>Ferrisia consobrina</i>	1, 2		
<i>Ferrisia malvastra</i>	1	1	
<i>Ferrisia virgata</i>	1, 2		
<i>Heliococcus destructor</i>	1, 2		
<i>Maconellicoccus hirsutus</i>	1, 2, 5		
<i>Maconellicoccus trisnatas</i>	5		
<i>Nipaecoccus viridis</i>	1, 2, 4, 5		
<i>Paracoccus ferrisi</i>	1, 2		
<i>Paracoccus marginatus</i>	1, 2		
<i>Peliococcus trsipinosus</i>	1, 2		
<i>Phenacoccus solenopsis</i>	1, 2		
<i>Pinnaspis sp.</i>	5		
<i>Planococcus angkorensis</i>	1		
<i>Planococcus citri</i>	1, 2, 5	1, 3	1, 3
<i>Planococcus dorsopinosus</i>	1, 2		
<i>Planococcus ficus</i>	1	1	
<i>Planococcus lilacinus</i>	1, 2, 5		
<i>Pseudococcus comstocki</i>	1, 2		
<i>Pseudococcus crotonis</i>	5		
<i>Pseudococcus cryptus</i>	1, 2	1	
<i>Pseudococcus filamentosus</i>	2, 5		
<i>Pseudococcus</i>	1		
<i>Pseudococcus lilacinus</i>	5		
<i>Pseudococcus longispinus</i>	1, 2	1	
<i>Pseudococcus macrocirculus</i>	1		
<i>Pseudococcus maritimus</i>	1, 2		
<i>Pseudococcus meridionalis</i>	1		
<i>Pseudococcus solenedyos</i>	1		
<i>Pseudococcus viburni</i>	1		
<i>Spilococcus alhagii</i>	1		

1 García Morales *et al.*, 2016; 2 Mani, 2016; 3 Bartual *et al.*, 2014; 4 Hayon *et al.*, 2016, 5 Balikai *et al.*, 2011.

Además de las cochinillas algodonosas pertenecientes a la familia Pseudococcidae también se han citado otro tipo de cochinillas pertenecientes a la familia Coccidae como la caparreta blanca *Ceroplastes sinensis* y la caparreta negra *Saissetia oleae* (Bartual *et al.*, 2014), las cuales carecen de las secreciones cereas algodonosas.

## 1.4. Pulgones

Pertenecen a la familia *Aphididae*. Son insectos chupadores provistos de un pico que clavan en el material vegetal y succionan la savia. Están provistos de un par de sifones en el abdomen por donde segregan hemolinfa con feromonas, y de la cauda, bajo la cual se encuentra el ano por donde expulsan la melaza. Los individuos tienen unas dimensiones que comprenden entre 1-3 mm, pudiendo ser ápteros o alados. La coloración del cuerpo varía de una especie a otra, incluso dentro de la misma especie el pulgón puede tener coloraciones distintas. Las formas juveniles son ápteras y muy similares a las formas adultas, presentando 4 estadios ninfales. Los adultos pueden ser ápteros o alados (Bargallo *et al.*, 2002).

Los daños que produce son debidos a sus hábitos alimenticios, produciendo un enrollamiento de hojas, detienen el crecimiento de brotes afectados y las flores y frutos recién cuajados pueden desprenderse, además del principal daño que causa en el granado que es la secreción de melaza, sobre la se desarrollan negrillas, con los consiguientes problemas comentados anteriormente. En otros cultivos uno de los principales daños que causan los pulgones es la transmisión de virosis, en el caso del granado no se ha encontrado referencias en este sentido.



**Figura 2. Colonia de pulgones en simbiosis con hormigas sobre una granada. Se aprecian también varias larvas del depredador *Scymnus*.**

A nivel mundial se citan 13 especies de pulgones sobre el granado, mientras que en España tan solo se citan 5 sobre el granado (Tabla 2). En España las dos especies más importantes son *A. punicae* y *A. gossypii* (Toledo *et al.*, 1991; Toledo, 2000).

Las hembras vivíparas ápteras de *A. punicae* son muy parecidas a las de *A. gossypii*, de color verde intenso u oscuro difiriendo entre ambas la coloración de los sifones, siendo oscuros uniformemente en el caso de *A. gossypii* y oscuros palideciendo en una parte en el caso de *A. punicae*. Es monoica holocíclica sobre el granado, aunque se puede comportar anholocíclicamente. Forma densas colonias en haz, envés y peciolo de las hojas, tallos jóvenes, yemas flores y frutos en desarrollo (Nieto Nafría *et al.*, 2005). Según Bartual *et al.*, (2014) su aparición es más tardía que *A. gossypii*. Al final del otoño pueden aparecer hembras y machos que pueden dar lugar a huevos de invierno (Toledo *et al.*, 1991; en Melgarejo *et al.*, 2003).

Las hembras vivíparas de *A. gossypii* son muy similares a las de *A. punicae* y son muy complicadas de diferenciar, siendo necesario la realización de preparaciones microscópicas para poder identificarlas correctamente. Es una especie muy polífaga, disponiendo de un amplio rango de hospedantes en los que se encuentra. Habitualmente se ha tenido como una especie anholocíclica, produciendo sin embargo machos alados (Nieto Nafría *et al.*, 2005). Sin embargo se ha visto como en el granado puede cerrar el ciclo como sexuales (Blackman y Eastop, 1994; en Nieto Nafría *et al.*, 2005). Se ha expuesto la existencia de distintos biotipos de esta especie más o menos especializados en un grupo de plantas hospedadoras y también más o menos resistentes a unos insecticidas u otros (Blackman y Eastop, 1984; en Nieto Nafría *et al.*, 2005). Según Bartual *et al.*, (2014) en la zona del sureste peninsular español es la especie dominante en el granado, colonizando brotes y yemas florales, entre abril y junio; aunque también se puede encontrar en otoño.

Tabla 2. Especies de pulgones citadas en el granado a nivel mundial y nacional.

Especie de pulgones	Citadas sobre granado en el mundo	Citadas en España	Citadas sobre granado en España
<i>Aphis achyranthi</i>	1, 2	--	--
<i>Aphis craccivora</i>	1, 2	4	4
<i>Aphis fabae</i>	1, 2	4	2,4
<i>Aphis gossypii</i>	1, 2	4	2,4
<i>Aphis nasturtii</i>	2	4	
<i>Aphis punicae</i>	1, 2	4	2,4
<i>Aphis spiraeicola</i>	1, 2	4	4
<i>Aulacorthum (Neomyzus)</i>	1, 2	5	--
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	1, 2	5	--
<i>Hysteroneura setariae*</i>	1	4	--
<i>Micromyzodium filicium*</i>	1	--	--
<i>Myzus ornatus</i>	1, 2	5	--
<i>Myzus persicae</i>	1, 2	5	--
<i>Smynthuroides betae</i>	2	<b>3</b>	--
<i>Toxoptera (Aphis) aurantii</i>	1	4	--

1 Blackman y Eastop, 2006; 2 Holman, 2009; 3 Nieto Nafría *et al.*, 2002; 4 Nieto Nafría *et al.*, 2005; 5 Nieto Nafría y Mier Durante, 1998. \*La asociación entre el pulgón y el hospedante es dudosa o inusual.

## 1.5. Barrenetas

Bajo el nombre de barrenetas se encuentran dos especies de pirálidos (Lepidoptera: Pyralidae). La barreneta de los cítricos, del algarrobo o barrenillo del granado *Apomyelois ceratoniae* (Zeller) = *Ectomyelois ceratoniae* o *Spectrobates ceratoniae*, y la barreneta o polilla de la melaza *Cryptoblabes gnidiella* Millière (Guirao, 2015).

El origen de *C. gnidiella* se encuentra en la cuenca mediterránea, se encontró en Francia (Panis, 1969), Egipto (Wysoki *et al.*, 1975, Swailem y Ismail, 1872), Israel (Bodenheimer, 1951, Avidov y Gothilf, 1960), Italia (Ortu, 1982, Vacante, 1988), España (Garrido y Busto de 1987, Coscolla, 1988), Portugal continental y Madeira (Carvalho, 1995 Carvalho y Ramos, 1994, Carvalho *et al.*, 1996) y Nueva Zelanda (Bodenheimer, 1951, Tremblay, 1990), así como el sudeste de Asia y África (Congo) (Tremblay, 1990) (en Silva y Mexia, 1999).

Ambas especies se encuentran extendidas por toda el área mediterránea y en otros lugares del mundo. *A. ceratoniae* se considera como la especie más dañina (Heydari e Izadi, 2014; Sobhani *et al.*, (2015); Demirel, 2016), sin embargo algunos autores muestran la presencia de ambas (Mennen y Baspinar, 2015).

*A. ceratoniae* tienen 2 cm de envergadura, y posee las alas anteriores gris plateado y las posteriores blancas. *C. gnidiella* es menor, 1,5 cm y gris con dos bandas transversales más oscuras. Las orugas de *A. ceratoniae* casi alcanzan los 2 cm, posee 5 pseudópodos, son de color rosa con la cabeza parda y la placa del pronoto marrón. Las de *C. gnidiella*, pasan por 5 estadios larvarios, y llegan a 1 cm, son verde o marrones con bandas longitudinales más oscuras y poseen la cabeza y el pronoto pardo (Guirao 2015) (Figura 3).



**Figura 3.** Larva de *Apomyelois ceratoniae* (izq.) y larva de *Cryptoblabes gnidiella* (dcha.)

*C. gnidiella* inverna en forma de crisálida, bien donde se ha desarrollado la oruga o en el suelo y tiene de 3 a 4 generaciones al año. *A. ceratoniae* inverna en forma de larva desarrollada, tiene 3 generaciones al año con vuelos en primavera, verano y otoño. La generación que se desarrolla en primavera suele vivir en las vainas del algarrobo. Los adultos de ambas especies se sienten atraídos, por melaza y ceras de las cochinillas algodonosas. *C. gnidiella* también se suele encontrar en frutos con exudados por lesiones producidas por otras plagas. Realizan las puestas en esos lugares. Las orugas en estadios iniciales se alimentan de melaza y otros restos de las colonias de cochinillas algodonosas (algunos autores indican que no son capaces de desarrollarse en ausencia de éstos) y de exudados de las heridas, y conforme se desarrollan atacan al fruto, hojas y brotes (Guirao, 2015).

Según Silva y Mexia (1999) las barrenetas son consideradas plagas secundarias, asociadas al ataque de otros organismos, como las aves (Bodenheimer, 1951, Swailem y Ismail, 1972), las bacterias y los hongos (Swailem y Ismail, 1972), los pulgones (wysoki, 1989, Tremblay, 1990) y cochinillas cochinillas algodonosas (Bodenheimer, 1951, Swailem y Ismail, 1972, wysoki *et al.*, 1975, wysoki, 1989, Tremblay, 1990, Franco y Carvalho, 1991, Carvalho «Fe Ramos , 1994)

**Tabla 3. Especies de lepidópteros citadas en el granado a nivel mundial y nacional.**

Especie	Familia	Citadas sobre <i>P. granatum</i>	Citados sobre <i>P. granatum</i> en España
<i>Zeuzera pyrina</i>	Cossidae	2	3
<i>Thaumatotibia leucotreta</i>	Tortricidae	3	
<i>Cryptophlebia leucotreta</i>	Tortricidae	1	
<i>Indarbela tetraonis</i>	Arbelidae	5	
<i>Indarbela quadrinotata</i>	Arbelidae	5	
<i>Cretonotus gangis</i>	Arctiidae	5	
<i>Zeuzera coffeae</i>	Cossidae	5	
<i>Pelopidas mathias</i>	Hesperiidae	5	
<i>Trabala vishnu</i>	Lasiocamoidae	5	
<i>Latoia lepida</i>	Limacodidae	5	
<i>Deudorix (=Virachola) isocrates</i>	Lycaenidae	5	
<i>Deudorix epijarbas</i>	Lycaenidae	5	
<i>Euproctis fraterna</i>	Lymantriidae	5	
<i>Euproctis flava</i>	Lymantriidae	5	
<i>Euproctis lunata</i>	Lymantriidae	5	
<i>Porthesia scintillans</i>	Lymantriidae	5	
<i>Helicoverpa armigera</i>	Noctuidae	4	
<i>Spodoptera littoralis</i>	Noctuidae	4	
<i>Eudocima (=Othreis) fullonia</i>	Noctuidae	5	
<i>Eudocima (=Othreis) materna</i>	Noctuidae	5	
<i>Eudocima (=Othreis) homaena</i>	Noctuidae	5	
<i>Eudocima (=Othreis) cajeta</i>	Noctuidae	5	
<i>Anatrachyntis simplex</i>	Noctuidae	5	
<i>Achaea janata</i>	Noctuidae	5	
<i>Arcyophora dentula</i>	Noctuidae	5	
<i>Melanitis leda ismene</i>	Nymphalidae	5	
<i>Clania crameri</i>	Psychidae	5	
<i>Acanthopsyche sp.</i>	Psychidae	5	
<i>Pteroma sp.</i>	Psychidae	5	
<i>Apomyelois ceratoniae</i>	Pyralidae	2, 6	3
<i>Cryptoblabes gnidiella</i>	Pyralidae	6	3
<i>Conogathes (=Dichocrocis) punctiferalis</i>	Pyralidae	5	
<i>Euzophera punicaella</i>	Pyralidae	5	

1 Krüger, 1998; 2 Öztürk *et al.*, 2005; 3 Bartual *et al.*, 2014; 4 Wohlfarter *et al.*, 2010; 5 Balikai *et al.*, 2011; 6. Yildirim *et al.*, 2015.

Los daños son producidos por las larvas que realizan roeduras y perforaciones en los frutos. Suelen entrar por la corona (cáliz) o por la zona de contacto de dos frutos. *A. ceratoniae* realiza un orificio sin excrementos y profundiza hasta llegar a los arilos, mientras que *C. gnidiella* realiza varias roeduras superficiales penetrando raramente el fruto, produciendo hilos de seda con los que agrupa sus excrementos y restos de su alimentación, y con los que se descuelga a otros lugares para crisalidar. Sobre los orificios causados por las larvas se facilita el desarrollo de hongos productores de podredumbres y también quedan más predispuestos al rajado (Guirao, 2015).





## 2. Objetivos y plan de trabajo

Actualmente la importancia del granado es cada vez mayor. Las cochinillas algodonosas, los pulgones y barrenetas son algunas de las plagas más importantes del granado. Al ser considerado en España un ‘‘frutal menor’’ no se han realizado estudios que identifiquen con precisión las especies plaga del cultivo. El objetivo del presente trabajo es aclarar la situación en cuanto a las especies de cochinillas algodonosas, pulgones y barrenetas presentes en nuestra zona. Para ello se han tomado muestras en las provincias de Alicante y Murcia de cochinillas, pulgones y barrenetas. Se han realizado monitoreos con feromonas sexuales femeninas específicas para las especies de barrenetas *Cryptoblabes gnidiella* y *Apomyelois ceratoniae*. Con los datos obtenidos de los monitoreos se han elaborado las curvas de vuelo para ambas especies. La identificación de las barrenetas se ha realizado a partir de la morfología de adultos y de preparaciones microscópicas de genitales de adultos capturados en las trampas y de larvas recogidas en los frutos. La identificación de cochinillas algodonosas y pulgones se han realizado morfológicamente a partir de preparaciones microscópicas. En el caso de la especie *Planococcus citri* la identificación se ha realizado también 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. Toma de muestras

La toma de muestras se ha realizado en parcelas de granados y árboles aislados de diferentes localidades de las provincias de Alicante y Murcia desde junio de 2015 hasta septiembre de 2016. A su vez se han realizado muestreos semanales en tres parcelas situadas en Muchamiel, Ojós y la EPSO.

##### 3.1.1. Muestreos de adultos de barrenetas

Para realizar los muestreos de adultos de barrenetas se han utilizado trampas delta con feromonas específicas de la marca ECONEX para *Cryptoblabes gnidiella* (VA126) y *Apomyelois ceratoniae* (VA241). Aunque la vida útil de estos difusores suele ser de 40 días, sin embargo con las altas temperaturas pueden acelerar la emisión y agotarse anticipadamente, por tanto se ha preferido cambiarlos a los 30 días aproximadamente. Las láminas adhesivas se han cambiado junto a la feromona y en ciertas ocasiones cuando estaban muy sucias.

Las parcelas donde se han colocado las trampas se encuentran en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO), en Muchamiel (Alicante) y en Ojós (Murcia). Durante el año 2015 se han muestreado las parcelas de la EPSO y Muchamiel y en 2016 la de Ojós y la EPSO.

Los muestreos se han realizado semanalmente, procediendo al conteo de adultos capturados y en ciertas ocasiones la retirada de adultos, puestos en viales con alcohol, para su posterior identificación en el laboratorio.

### **3.1.2. Muestreo de las tres plagas**

El muestreo de orugas de barrenetas se ha realizado tanto en campo, en todas las parcelas muestreadas (Figura 4) como en almacenes de confección de fruta buscando en frutos con síntomas (podredumbres y orificios en la granada).

Para la recolección de las muestras de cochinillas algodonosas, de pulgones y larvas de barrenetas se ha realizado capturando a los individuos directamente del hospedante. Con la ayuda de un pincel mojado en alcohol de 70° para que el insecto quede adherido. Las muestras se han guardado en viales con alcohol de 70° hasta su preparación en el laboratorio. En el caso de las cochinillas algodonosas el alcohol además de conservarlas, facilita la eliminación de las ceras de las que están recubiertas. Los especímenes más pequeños de las cochinillas algodonosas se han puesto en un eppendorf y se han congelado para su uso en la PCR.

El muestreo de colonias de cochinillas algodonosas y pulgones se ha llevado a cabo en las parcelas nombradas anteriormente, así como en las distintas localidades muestreadas (Figura 4). En total se ha tomado muestras de 12 localidades: Albaterra, La Alberca (Murcia), Desamparados (Orihuela), Elche, Alicante (El Moralet), Muchamiel, Ojós, San Carlos, San Isidro, San Juan de Alicante y Torrepacheco.



Figura 4. Localización de las parcelas muestreadas

## 3.2. Preparaciones microscópicas

### 3.2.1. Cochinillas algodonosas

#### 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 varias etapas. En primer lugar 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 2º y 3º par de patas con una aguja entomológica del 000 (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. Posteriormente se introduce en un tubo de ensayo tipo

Pyrex® en el que se sumergen las cochinillas en KOH al 10% y se calienta con un mechero con cuidado de que no llegue a hervir el KOH y se salgan las cochinillas. Si es necesario ir añadiendo KOH ya que puede evaporarse rápidamente. Con esto se consigue que el insecto expulse la hemolinfa y fluidos internos por sus orificios.

Una vez vaciado el ejemplar se coloca el ejemplar en 1 gota de KOH al 10% puesta en un portaobjetos y se coloca encima otro portaobjetos cruzado formando una X para que luego resulte más fácil separarlos. Se calientan con el mechero 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.

### **Deshidratación y tinción**

Se pon el ejemplar en alcohol al 70%, posteriormente se pasa a fucsina acida al 1%, se vuelve a pasar a alcohol del 70% nuevamente, luego se pasa a alcohol del 95% y por último a esencia de lavanda. Se mantiene la cochinilla durante 10-15 min en cada baño.

### **Montaje**

Sobre un portaobjetos, con la ayuda de una varilla fina de vidrio, se coloca una gota de unos 6-7 mm de diámetro del medio montante, bálsamo de Canadá. Se alejan las burbujas de aire del centro para que no queden sobre la cochinilla y 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. 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, hasta que endurezca el bálsamo de Canadá. A continuación se sellan los bordes del cubreobjetos con laca de uñas transparente.

### **3.2.2. Pulgones**

Para realizar las preparaciones de pulgones se ha empleado el procedimiento descrito por Hermoso (1984).

Al binocular se le hace a cada ejemplar una incisión transversal en medio de la parte ventral del abdomen con una aguja entomológica del 000 (de 0,25 mm de diámetro).

#### **Vaciado**

Se meten los pulgones en una placa cerámica con KOH al 10% que se calienta durante 15 a 30 minutos a 90 °C sin que llegue a hervir.

Se pasan a otra placa cerámica con agua destilada que se calienta a 90 °C durante 15-30 min sin llegar a hervir.

Por último se pasan los pulgones a una mezcla a partes iguales de hidrato de cloral y fenol para eliminar las partes blandas del pulgón. Se pasan a un frasco con un poco (2-3 gotas) de cloral-fenol que se tapa enseguida y donde, sin calentar, se dejan 24 h si son pequeños y 48 h si son grandes. No es necesario deshidratarlos después de pasarlos por el cloral-fenol, ya que este tiene el mismo índice de refracción que el bálsamo de Canadá.

#### **Montaje**

Sobre un portaobjetos, con la ayuda de una varilla fina de vidrio, se coloca una gota de unos 3-4 mm de diámetro del medio montante, bálsamo de Canadá. Se alejan las burbujas de aire del centro para que no queden sobre el pulgón y dificulte posteriormente su observación al microscopio. A la hora de colocar el pulgón se ha de poner con el dorso hacia el cubreobjetos de forma que se vea claramente las antenas, cauda, sifones y frente, ya que son los caracteres empleados para su identificación. En cada preparación se colocan entre 3 y 4 individuos de la misma muestra, y siempre que se pueda alados y ápteros. Se colocan siempre empezando por la izquierda. 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 bálsamo de Canadá se quede bien seco. A continuación se sellan los bordes del cubreobjetos con laca de uñas transparente. Las preparaciones se han realizado y observado con la lupa binocular y microscópio indicado en el apartado anterior

### **3.2.3. Barrenetas**

Se han empleado adultos capturados con las trampas delta, por lo que estos son machos, ya que la feromona es la que emite la hembra para atraer al macho. El método empleado es el mismo tanto para hembras como para machos en las primeras etapas, pero difiere en los últimos pasos, porque en el caso de las hembras se dan mayores dificultades para preparar las genitalias.

Para preparar las genitalias se ha empleado el procedimiento descrito por Vives (1977). Se corta todo el abdomen y se introduce en un tubo de ensayo con unos tres dedos de KOH al 10%. Con la ayuda de unas pinzas de madera se sujeta el tubo de ensayo y se acerca a la llama del mechero. Hay que tener cuidado de no calentar demasiado el fondo del tubo e ir moviendo este para evitar que burbujee y se pierda el contenido del tubo. Dependiendo del grosor del abdomen se ha de calentar entre 2-15 minutos.

Una vez el abdomen haya perdido su dureza se extrae del KOH potasa y se pasa a un pocillo con agua destilada para eliminar los restos de KOH.

### **Limpieza**

Con la ayuda de unas agujas entomológicas o microespatulas y unas tijeras se abre con cuidado el abdomen por uno de los lados. Para facilitar la extracción de la genitalia puede ayudar ejercer una ligera presión en el abdomen, resultando que el andropigio salga evaginado de su sitio facilitando mucho la operación, pudiendo separar fácilmente el resto de la genitalia del abdomen.

Una vez se ha separado la genitalia se continua quitando restos de grasa y tejidos, eliminando también los pelos del andropigio para su correcta identificación.

### **Deshidratación**

Para la preparación se le darán 4 baños:

1. Alcohol y agua al 50%
2. Alcohol del 96 al 100%
3. Alcohol y Xilol al 50%
4. Xilol al 100%

Se ha de dejar el andropigio unos segundos en cada preparación, salvo en el paso del 3º al 4º en el que al dejarlo en el 4º ha de estar completamente nítido, de no ser así se ha de retroceder al 3º y volver al 4º, repitiendo el proceso hasta que al pasar el andropigio por el 4º quede completamente nítido.

### **Montaje**

Sobre un portaobjetos, con la ayuda de una varilla fina de vidrio, se coloca una gota de unos 5-6 mm de diámetro del medio montante, líquido de Faure. Se coge el andropigio con unas pinzas y se deposita en el centro del medio montante. Según Barrientos (1988) las genitalias masculinas pueden ser colocadas de dos formas:

1. De costado, para lo cual se quita una de las valvas, generalmente la izquierda, aislándose al mismo tiempo el edeago.
2. De frente, separando lateralmente las valvas y aislando así mismo el edeago.

Posteriormente se limpia y se coloca el cubreobjetos de vidrio y se presiona levemente con la ayuda de las pinzas para que el medio se extienda por todo el cubre.

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



### 3.3. Instrumental óptico

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. Las fotografías se han realizado con una cámara CANON Powershot S70.

### 3.4. Claves taxonómicas

#### 3.4.1. Cochinillas algodonosas

En un primer momento se ha empleado la clave interactiva del USDA (Scale insects, 2<sup>nd</sup> edition) (Miller et al., 2014) para una primera identificación de las preparaciones de pseudocóccidos realizadas. En el caso concreto de *Planococcus citri*, para poder realizar una identificación precisa mediante preparación microscópica es muy complicado, ya que intervienen caracteres difíciles de observar, ya que son cuantitativos y de tamaños muy reducidos (unas pocas micras). En ciertos casos la clave presenta dificultades, pues ciertos caracteres son muy específicos estando presentes en unas pocas especies y no todas las preparaciones microscópicas son lo suficientemente buenas como para poder observar todos los caracteres necesarios para poder identificar correctamente la preparación. Por este motivo en ciertos casos en los que se obtenían varias especies posibles con la clave interactiva del USDA, se ha recurrido a descripciones más específicas de las especies incluidas también en la página web de la clave interactiva.

### 3.4.2. Pulgones

Se han realizado claves de identificación para las especies de pulgones citadas en España (Nieto Nafría *et al.*, 2005; Bartual *et al.*, 2014). Estas especies son *Aphis punicae*, *Aphis gossypii* y *Aphis spiraecola*. Se han empleado las claves taxonómicas de Blackman y Eastop (2006), para la realización de las claves de identificación que se podrá ver más adelante en el apartado de resultados.

### 3.4.3. Barrenetas

Para la identificación de las orugas se han realizado claves de identificación para las especies *Cryptoblabes gnidiella* y *Apomyelois ceratoniae* descritas Soils (2006) y los caracteres de identificación de Gilligan y Passoa (2014). Para los adultos se han utilizado las claves de Mozzaffarian *et al.*, (2007a), Mozzaffarian *et al.*, (2007b), Passoa (2009), Sawsan *et al.*, (2009), Ren y Yang (2016).

## 3.5. Análisis PCR

### 3.5.1. Extracción de ADN

Se ha 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.

### 3.5.2. Reacción PCR

Se han realizado PCRs múltiples 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 como en este caso 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.

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 5 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. Los cebadores empleados son los descritos en el trabajo de Saccaggi (2006) detallados en la Tabla 4. Estos cebadores anillan en una zona intermedia 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 4. Secuencias (Saccaggi, 2006) y propiedades termodinámicas de los cebadores utilizados (a Saccaggi (2006) y b 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)	TAATTATTGCTATTCTACAAGAATTAATAATC	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>	--

**Tabla 5. Reactivos de la PCR y su concentración, volúmenes empleados para una reacción de 14 µl, y su concentración en la reacción.**

Reactivos	Concentración de los reactivos	Vol. (µl)	Concentración en reacción
ADN Polimerasa BioTherm® de GeneCraft	5 U/reacción	0,25	1,25 U/reacción
Cebadores Forward (de cada uno)	10 µM	0,56	0,4 µM
Cebador Reverse	10 µM	0,56	0,4 µM
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		7,41	
ADN		2,00	

Se han utilizado muestras de cochinillas algodonosas de trabajos anteriores, que han sido identificadas previamente como *P. citri* y *P. ficus* (Tabla 6) y se han tomado como referencia en cada PCR que se ha realizado.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Primus 25 (MWG AG-Biotech, Germany). Puesto que en pruebas previas con diferentes temperaturas de anillamiento se obtenían resultados erráticos, se optó por realiza una PCR de tipo touchdown (TD-PCR) (Don *et al.*, 1991), que consiste en ir bajando la temperatura de anillamiento en cada ciclo, en este caso el descenso era de 0,4 °C/ciclo. Con ello se consigue reducir las hibridaciones inespecíficas. Las temperaturas de anillamiento elevadas de los primeros ciclos fuerzan a que las uniones de los cebadores con las cadenas de ADN de la muestra sean muy específicas. Con ello se consiguen nuevos

fragmentos específicos de la zona comprendida entre los dos cebadores que van a ser mayoritarios sirviendo de molde en los siguientes ciclos.

El programa consta de 3 fases. La primera fase es una desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos. La segunda fase consta de 40 ciclos, cada uno de ellos posee una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 40 segundos, otra de anillamiento desde los 65 °C en el primer ciclo, decreciendo en cada ciclo 0,4 °C, hasta llegar a 49,4 °C en el último, durante un tiempo 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

### **3.5.3. 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  $\mu\text{gr/ml}$  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. Cochinillas algodonosas

#### 4.1.1. Estudio morfológico

A partir de la clave interactiva del USDA se ha elaborado la Tabla 7, para identificar la especie/es de las cochinillas algodonosas. Para ello se han realizado las claves taxonómicas para las especies de pseudocóccidos citadas en España (Tabla 1).

En la Tabla 6 se pueden ver los resultados obtenidos de la identificación de las preparaciones microscópicas.

**Tabla 6. Muestras de pseudocóccidos tomadas en granado y otros cultivos y su identificación.**

Muestra	Localidad	Cultivo	Fecha de recolección	Identificación morfológica	PCR
C05	EPSO	Granado	09/07/2015	--	<i>P. citri</i> -2
C06	Matola (Elche)	Granado	05/08/2015	<i>P. citri</i> o <i>P. lilacinus</i> -7 <i>P.citri</i> -1 Deteriorada-5	S.A. - 4
C07	Muchamiel	Granado	17/08/2015	<i>P. citri</i> o <i>P. lilacinus</i> - 1 <i>P.citri</i> - 6 S/D 2 Deteriorada- 3	--
C13	Muchamiel	Granado	24/08/2015	--	S.A. - 2
C16	Matola (Elche)	Granado	18/09/2015	<i>P. citri</i> o <i>P. lilacinus</i> -11 <i>P.citri</i> - 1 Deteriorada-7	<i>P. citri</i> -2
C18	Muchamiel	Granado	03/10/2015	<i>P. citri</i> o <i>P. lilacinus</i> -2 <i>P.citri</i> -2	<i>P.citri</i> -1 S.A.-1
C23	EPSO	Higuera	24/06/2016	--	<i>P. ficus</i> - 2
C26	EPSO	Granado	28/06/2016	<i>P. citri</i> o <i>P. lilacinus</i> -3 <i>P.citri</i> -1 Deteriorada-2	<i>P. citri</i> -2
VS	Alhama de Murcia	Vid	01/09/2014	--	<i>P.ficus</i> -1 S.A.-1
MC33		Granado	23/06/2014	S/D-6	--
MC36	Elche	Granado	26/06/2014	<i>P.citri</i> -5	<i>P.citri</i> -1 S.A.-1
MC39	EPSO	Granado	02/07/2015	S/D-5	S.A. - 1
MC06	EPSO	Higuera	09/04/2014	<i>P.ficus</i> -5	<i>P.ficus</i> -1
MC14	Águilas	Limonero	26/04/2014	<i>P.citri</i> -1	<i>P. citri</i> - 1

Siendo: S.A. Sin amplificar; S/D: Sin identificar. Cada valor numérico de las 2 últimas columnas representa el número de especímenes examinados molecular o morfológicamente.

En una primera identificación se han utilizando los caracteres de la clave interactiva, sin embargo en algunos de los casos no se ha podido realizar una identificación precisa resultando varias especies posibles, *Planococcus citri* y *Planococcus lilacinus*. Según Miller *et al.*, (2014) *P. lilacinus* posee sedas dorsales a la altura del segundo cerario de más de 50  $\mu$  de longitud respecto de las de *P. citri* que son de inferiores a 40 $\mu$ . Salvo en ciertas preparaciones en las que se ha podido ver una diferencia significativa mucho menor de las sedas respecto del resto de preparaciones, ha sido complicado tener una referencia clara de la longitud de las sedas, y por lo tanto no se ha podido distinguir la especie.

Las diferencias morfológicas entre ciertas especies de pseudocóccidos son muy escasas y presentan una gran dificultad para su observación, siendo necesario un mínimo de 400 aumentos. Además se le suma que son caracteres cuantitativos como un cierto número de poros o formas y longitud de las sedas. Se necesitan preparaciones microscópicas muy claras, además de una gran habilidad para observar estos caracteres y delimitar correctamente las distintas partes del cuerpo del insecto, como por ejemplo en el caso de que deban haber más de 5 conductos tubulares entre las antenas es posible que existan pero no se haya sido capaz de observarlos todos considerar que existen menos y clasificar el espécimen erróneamente.

Algunas otras especies de la Tabla 7 como por ejemplo *Ps. longispinus* se ha sabido que no se han capturado en las muestras tomadas. *Ps. longispinus* se puede identificar fácilmente macroscópicamente dado que es la única especie de las descritas en la tabla en la que los filamentos anales miden la mitad de la longitud de su cuerpo (Beltrà y Soto, 2012).

En estudios realizados anteriormente (Cantó, 2014) se han identificado otras especies distinta de las identificadas en este trabajo con muestras tomadas de la misma parcela. La muestra MC39 presenta en algunos casos algunos caracteres improprios de las especies comentadas anteriormente como son la ausencia de barra anal, la presencia de dentículo en la garra o presentan menos de 18 pares de cerarios. No se ha podido identificar por ahora la especie de la que se trata, de lo que no hay duda es que no se encuentra citada en sobre el granado en España, ya que solo se cita *P. citri*. Gracias a la clave interactiva de Miller *et al.*, (2014) se ha podido llegar hasta tres especies posibles:



*Phenacoccus solani*, *Phenacoccus defectus* y *Phenacoccus parvus*. Esta identificación ha sido posible gracias a los caracteres presencia de dentículo en la garra (Figura 6), ausencia de barra anal (Figura 8), circulus con forma ovalada (Figura 9) y 8 artejos antenales (Figura 5). Al igual ocurre en la muestra C07 que no presenta barra anal, pero a diferencia de la muestra MC 39 no presenta dentículo en la garra. A pesar de los resultados obtenidos es necesario tomar más muestras y realizar preparaciones microscópicas y junto con análisis PCR con cebadores específicos de las posibles especies para estar completamente seguro a que especie pertenecen.

Esto último no es de extrañar, ya que como se dijo anteriormente dada la baja importancia que se ha dado al cultivo hasta hace un par de décadas los estudios realizados a nivel de plagas son escasos y dada la dificultad que tienen las cochinillas algodonosas para una correcta identificación a nivel de especie no es nada extraño que se den estos casos.



#### 4. Resultados y discusión

**Tabla 7. Caracteres de identificación de cochinillas algodonosas citadas en España que se han citado a nivel mundial sobre *P. granatum* (Miller et al., 2014).**

	<i>Planococcus citri</i>	<i>Planococcus ficus</i>	<i>Ferrisia malvastra</i>	<i>Pseudococcus calceolariae</i>	<i>Pseudococcus longispinus</i>	<i>Pseudococcus cryptus</i>
Pares de cerarios	18	18	1-2	17	17	17
Sedas de los cerarios	Cónicas	Apical y aguda	Apical y aguda	Apical y aguda	Apical y aguda	Apical y aguda
Nº artejos de la antena	7-8	7-8	8	8	8	7-8
Poros discoidales junto al ojo	Ausente / Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Cerarios en la cabeza y el protórax	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente	Presente
Más de 5 conductos collar-oral ente las antenas	Presente	Ausente	Ausente/ Presente	Ausente	Presente / Ausente	Ausente
Conductos con anillo oral junto al cerario frontal	Ausente/ Presente	Ausente/ Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
Conductos collar-oral entre la coxa frontal y el margen del cuerpo	Presente	Ausente/ Presente	Ausente/ Presente	Ausente	Ausente	Presente / Ausente
Poros multiloculares en segmentos abdominales	IV-VIII, III-VIII	II-VIII, III-VIII	VII-VIII, VI-VIII	IV-VIII	VII-VIII	IV-VIII
Poros multiloculares ventrolaterales	Presente	Presente	Ausente	Ausente/ Presente	Presente (VII y VIII), Ausentes en el abdomen	Presente / Ausente
Forma del circulus	Reloj de arena o rectangular, a menudo dividido por una línea intersegmental	Reloj de arena o rectangular, a menudo dividido por una línea intersegmental	Rectangular, a menudo dividido por línea intersegmental	Reloj de arena o rectangular, normalmente dividida por una línea intersegmental	reloj de arena o rectangular, a menudo dividido por una línea intersegmental	reloj de arena o rectangular, a menudo dividido por una línea intersegmental
Poros translucidos en patas posteriores	En coxa y tibia	En coxa, fémur y tibia o coxa y tibia	Coxa; Coxa y tibia; Coxa, fémur y tibia	Femur y tibia	Fémur y tibia; únicamente en la tibia	Coxa, femur y tibia
Dentículo en uña	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Sedas dorsales	Cortas, iguales o inferiores a las sedas de los cerarios, igual o menos de 40 μ	Cortas, iguales o inferiores a las seda de los cerarios, pero también algunas largas	Iguals o mas largas de 40μ	Iguals o mas largas de 40μ	Iguals o mas largas de 40μ	Iguals o mas largas de 40μ
Sedas auxiliares en el segundo cerario	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente
Barra anal	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

A continuación se muestra una descripción más detallada de los caracteres observados que en la mayoría de los casos han podido permitir llegar hasta las especies *P. citri* y *P. lilacinus*, y los caracteres que en unos pocos casos han permitido identificar concretamente a *P. citri*.

**Antena:** Presencia de 8 artejos y mamelón apical en el último artejo (borde saliente) (Figura 5).

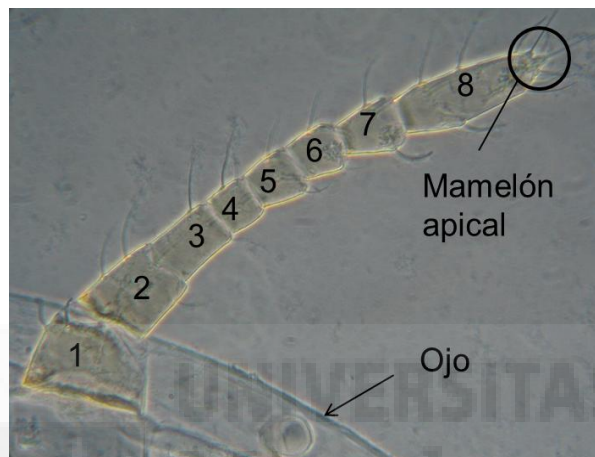


Figura 5. Antena *Planococcus* con 8 artejos y mamelón apical.

**Dentículo en uña:** Ausencia de dentículo en la garra (Figura 6 dcha)

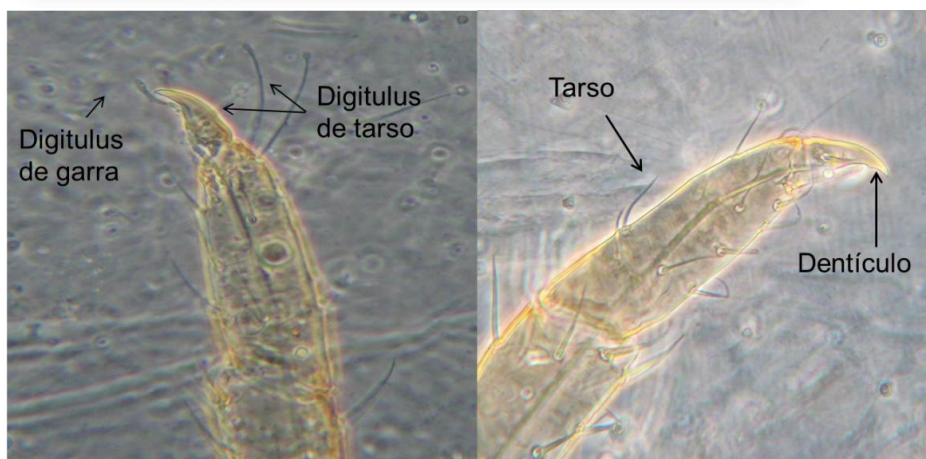


Figura 6. Garra con ausencia de dentículo (izda.) y con presencia de dentículo (dcha.).

**Número de cerarios:** Tanto *P. citri* como *P. lilacinus* posee 18 pares de cerarios (Figura 7).



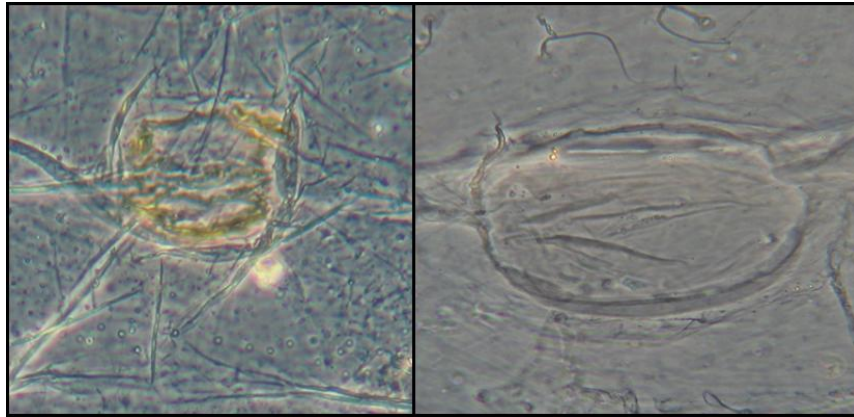
Figura 7. Número de pares de cerarios de *Planococcus*.

**Barra anal:** Presencia de barra anal en los lóbulos anales junto a los cerarios anales (Figura 8).



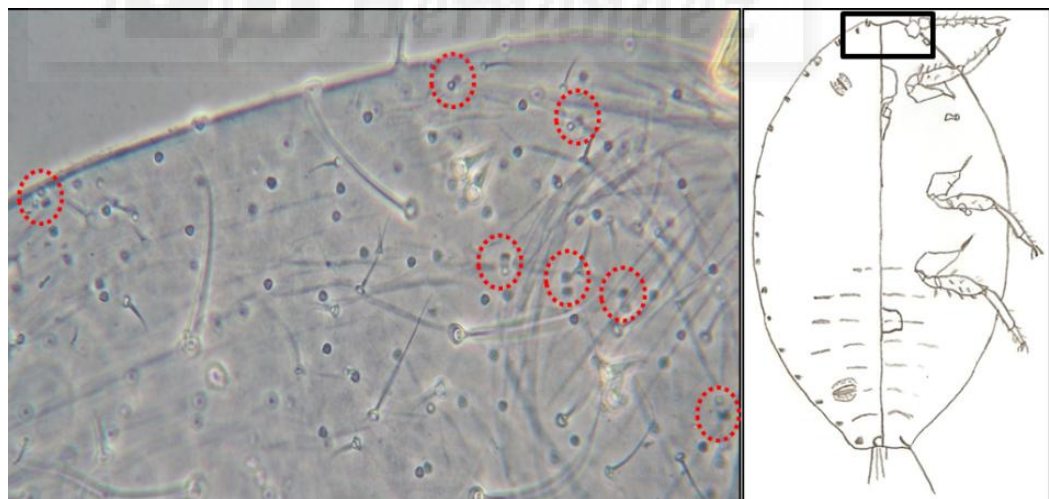
Figura 8. Barra anal junto al cerario anal de *Planococcus*.

**Circulus:** Con forma de reloj de arena con un estrechamiento en la zona central y dividido por una línea intersegmental (Figura 9).



**Figura 9.** Circulus con forma de reloj de arena de *Planococcus* (izda.) y con forma ovalada (dcha.) de otras spp de pseudocócidos.

**Conductos tubulares oral collar:** Presencia de más de 5 conductos tubulares entre las antenas (Figura 10) y presencia de conductos tubulares en la coxa frontal y el margen del cuerpo (Figura 11).



**Figura 10.** Conductos tubulares collar-oral entre las antenas de *P. citri*.

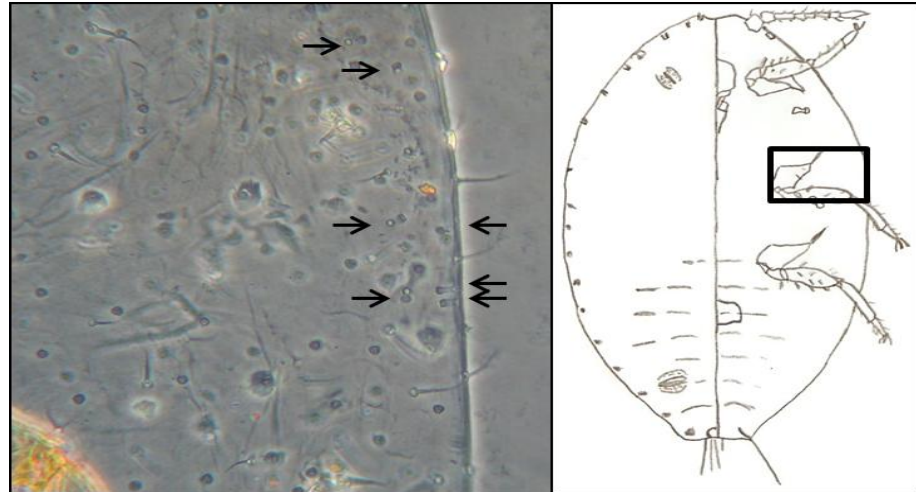


Figura 11. Conductos tubulares collar-oral entre la coxa media y el margen del cuerpo de *P. citri*.

**Poros translucidos:** Presencia de poros translucidos en la coxa y tibia de las patas traseras (Figura 12).

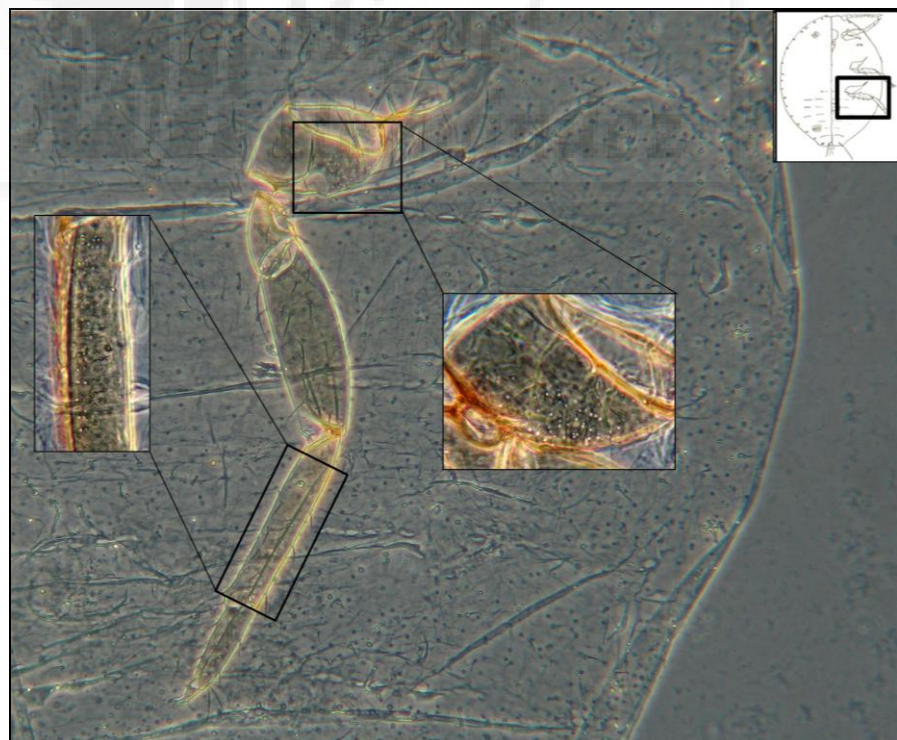


Figura 12. Poros translucidos en coxa y tibia de patas traseras de *Planococcus*.

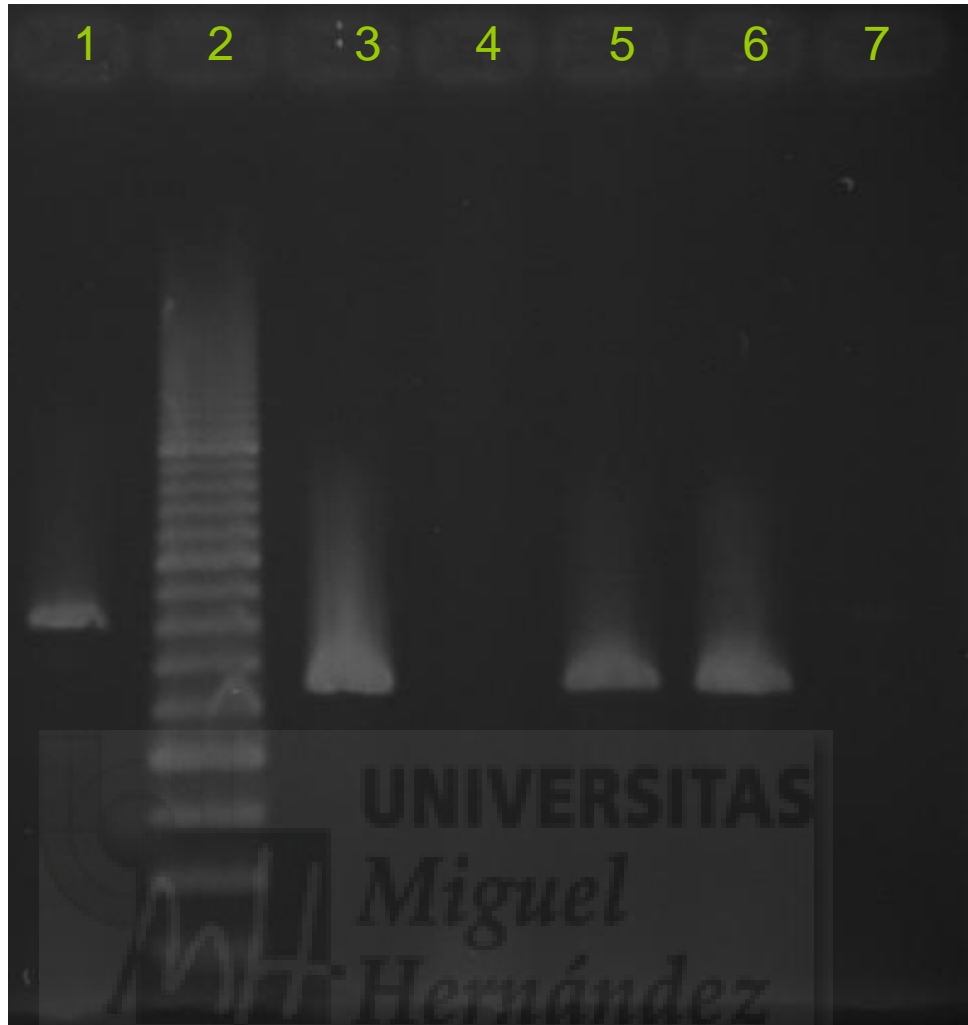
#### 4.1.2. Estudio molecular

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 de *P. citri* y *P. ficus*.

Se han empleado marcadores moleculares específicos para la identificación de *P. citri* y *P. ficus*. Aunque *P. ficus* no se ha citado en granado en España, si se ha citado a nivel mundial (Tabla 1), y al tener constancia de la presencia en la zona de la especie por estudios realizados anteriormente se han utilizado los marcadores para determinar si se encontraba presente en el granado en España.

En total se han realizado 19 extracciones de ADN para las muestras obtenidas en granado de Matola (Elche), EPSO y Muchamiel. Se ha utilizado también como controles positivos de la PCR ADN de muestras de limonero identificadas como *P. citri* y de vid e higuera identificadas *P. ficus* en estudios anteriores (Cantó, 2014) y se han realizado extracciones de ADN cochinillas recogidas recientemente en higueras de la EPSO que probablemente pertenecen a *P. ficus* (Tabla 6).

En total se han realizado 12 PCR, en las cuales se ha podido identificar como *P. citri* las muestras procedentes de la EPSO (C26) con dos amplificaciones del cebador de *P. citri*, Elche (MC36 y C16) con 3 amplificaciones del cebador y Muchamiel (C18) con una amplificación. La muestra procedente de limonero (MC14) tomada como control también se ha identificado como *P. citri* con una amplificación. Las muestras procedentes de Vid (VS1) e higuera (MC06 y C23) se han identificado como *P. ficus* con 1 y 3 amplificaciones respectivamente del cebador de *P. ficus*. (Tabla 6)



**Figura 13** Reacción PCR con los cebadores C1-J-2260 (específico de *P. ficus*), C1-J-2427 (de *P. citri*) y el cebador reverso TL2-N-3014. Carril 1 referencia de *P. ficus* de higuera (MC06). Carril 2 marcador de tamaño molecular. Carril 3 referencia de *P. citri* de limonero (MC14). Carril 4 muestra de granado de Muchamiel (C13) sin amplificación. Carril 5 muestra de granado de Matola (C16). Carril 6 muestra de granado de la EPSO (C26). Carril 7 blanco sin ADN. Carril 1 posee una banda de algo más de 800 pb correspondiente a *P. ficus*, y los carriles 3, 5 y 6 de algo menos de 700 pb característica de *P. citri*.

Anteriormente a este trabajo las PCR realizadas con muestras de Elche (MC36) se pudo identificar a *P. citri*, mientras que con muestras procedentes de la EPSO (MC33 y MC39) no se pudo identificar a *P. citri* (Cantó, 2014). Esta disparidad puede deberse a un error en las PCR realizadas anteriormente o que en las colonias de pseudocóccidos se encuentran varias especies distintas, al igual que ha ocurrido en el presente trabajo donde se han podido identificar (Cantó, 2014).



## 4.2. Pulgones

Los pulgones se han identificado empleando la claves de Blackman y Eastop (2006), Nieto Nafría *et al.*, (2005) y Lee *et al.*, (2015).

Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 8. La especie más abundante ha sido *A. gossypii* del que se han contabilizado un total de 47 de los 59 pulgones estudiados.

**Tabla 8. Muestras de pulgones tomadas en granado y su identificación.**

Muestra	Localidad	Fecha recolección	Especies/es
P1	Muchamiel	17/08/2015	<i>A. punicae</i> -3 Deteriorado-1
P2	Muchamiel	03/10/2015	<i>A. gossypii</i> -4
P3	Muchamiel	03/10/2015	<i>A. gossypii</i> -2 Alados2
P5	EPSO	06/04/2016	<i>A. gossypii</i> -5 <i>A. punicae</i> -1
P8	Alberca	12/04/2016	<i>A. gossypii</i> -3 <i>B. helichrysi</i> -1
P15	San Juan de Alicante	22/04/2016	<i>A. gossypii</i> -6 Alados-3
P16	Moralet	22/04/2016	<i>A. gossypii</i> -4 Alados-3 Deteriorados-2
P17	Desamparados	23/04/2016	<i>A. gossypii</i> -5 Alados-4
P18	Torrepacheco	29/04/2016	<i>B. helichrysi</i> -6
P19	Torrepacheco	29/04/2016	<i>A. gossypii</i> -5 <i>B. helichrysi</i> -1
P20	Albatera	01/05/2016	<i>A. gossypii</i> -6 Alados-3
P21	EPSO	09/05/2016	<i>A. gossypii</i> -3 <i>A. spiraecola</i> -2 Alados-4
P22	San Carlos	15/05/2016	<i>A. gossypii</i> -4 <i>B. helichrysi</i> -1 Alados-2

Cada valor numérico de la última columna representa el número de especímenes examinados morfológicamente. \*No se ha realizado un estudio morfológico de los alados.

También se han identificado a *Aphis punicae* (4 ejemplares) y a *A. spiraecola* (2 ejemplares). Únicamente se han identificado las hembras adultas ápteras, ya que en algunos casos los caracteres de identificación pueden variar para una misma especie.

En la tabla Tabla 9 se resumen los caracteres principales de las especies identificadas del género *Aphis*. Para distinguir a *A.gossypii* y *A. punicae*, se han observado con detalle la proporción entre los sifones y la cauda, siendo la proporción entre el sifón y la cauda de 1 a 1,5 veces mayor en el caso de *A. punicae* y de más de 1,5 veces en el caso de *A. gossypii*. La coloración de los sifones también es diferente siendo en *A. gossypii* oscuros uniformemente y oscuros palideciendo en la base en *A. punicae*. En cuanto a las setas de la cauda *A. gossypii* pose de 4-7 sedas, mientras que *A. punicae* tiene de 4-7. *A. spiraecola* se diferencia relativamente mejor porque posee la cauda muy oscura y tiene de 7-24 sedas en ella.

**Tabla 9. Caracteres principales de identificación de las principales especies del género *Aphis* identificadas.**

		<i>Aphis punicae</i> Passerini	<i>Aphis gossypii</i> Glover	<i>Aphis spiraecola</i> Patch
Color cuerpo		Verde intenso u oscuro con corniculos pardos o negros	Desde amarillo pajizo hasta el pardo o desde el verde amarillento hasta el oscuro o verde azulado	Verde intenso, cabeza marrón
Color sifones		Palidos u oscuros, siendo a menudo más palidos en la base	Oscuros uniformemente	Muy oscuros
Color cauda		Pálida u oscura, de color similar al resto del cuerpo	Pálida u oscura, pero más pálida que los sifones	Muy oscura
Setas de la Cauda		De 7 a 9	De 4 a 7	De 7 a 24
Tamaño de los sifones respecto a la cauda	Según Blackman y Eastop (2016)	De 1 a 1,5 veces la cauda	Mayor de 1,5 veces la cauda	De 0,9 a 1.7 veces la cauda
	Según Lee <i>et al.</i> , (2015)	De 1 a 1,23 veces la cauda	De 1,28 a 3,31 veces la cauda	

También se han identificado 9 ejemplares de pulgones que presentan una cauda de forma de media luna o casco más ancha que larga, que según la clave de Blackman y Eastop (2006) se corresponde con *Brachycaudus helichrysi*, del cual no se conocen la existencia de citas sobre el granado en España.

### 4.3. Barrenetas

#### 4.3.1. Curvas de vuelo de machos adultos

Se han obtenido las curvas de vuelo de los machos a partir de las capturas en trampas delta cebadas feromonas sexuales específicas de *A. ceratoniae* y *C. gnidiella*. (Figura 17)



**Figura 14. Macho de de *Apomyelois ceratoniae* (izda) *Cryptoblabes gnidiella* (dcha) capturados en sus correspondientes trampas.**

El monitoreo se ha realizado durante dos años, habiéndose monitoreado en el año 2015 las parcelas de Muchamiel y la EPSO y durante el 2016 las de Ojós y la EPSO.

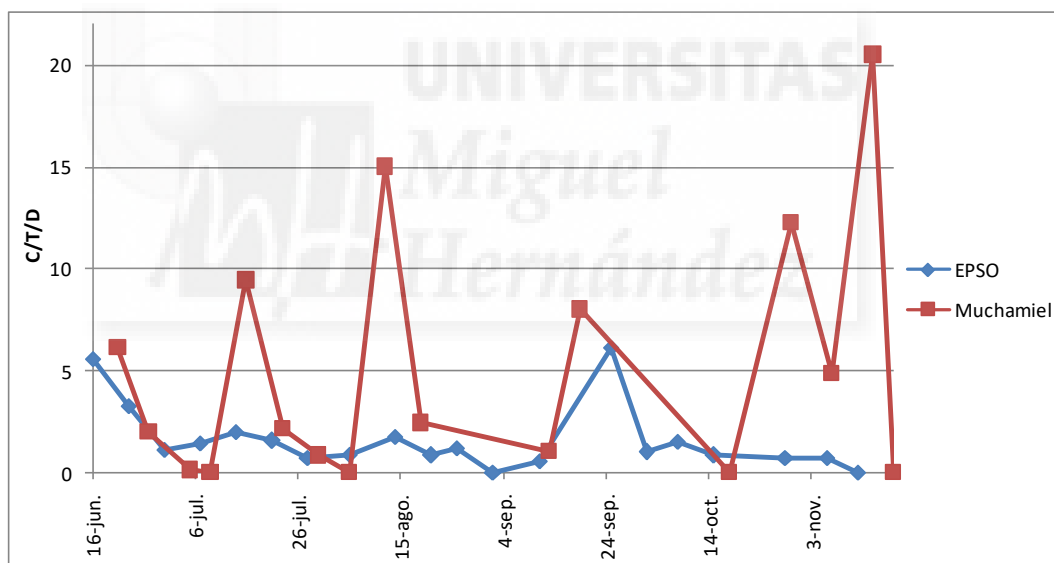
Las curvas de vuelo obtenidas para *C. gnidiella* se muestran en las gráficas 1 y 2. En la parcela de la EPSO se observa la presencia de 2 máximos de vuelo en el año 2015, a mediados de junio y últimos de septiembre. Mientras que al siguiente año se muestran 4 vuelos, 2 máximos (uno durante julio con 8 capturas diarias por trampa y otro a partir de mediados de agosto hasta septiembre con 7,5 capturas diarias por trampa) y otros dos vuelos mucho menores, uno a mediados de marzo con 2 capturas diarias por trampa y otro a últimos de junio con 3,5 capturas diarias por trampa.

En la parcela de Muchamiel se observan 6 vuelos, a mediados de junio, a mediados de julio, a mediados de agosto, a mediados de septiembre, a últimos de octubre y a mediados de noviembre. Los dos máximos vuelos se han producido a medias de agosto con 15 capturas diarias por trampa y a mediados de noviembre con

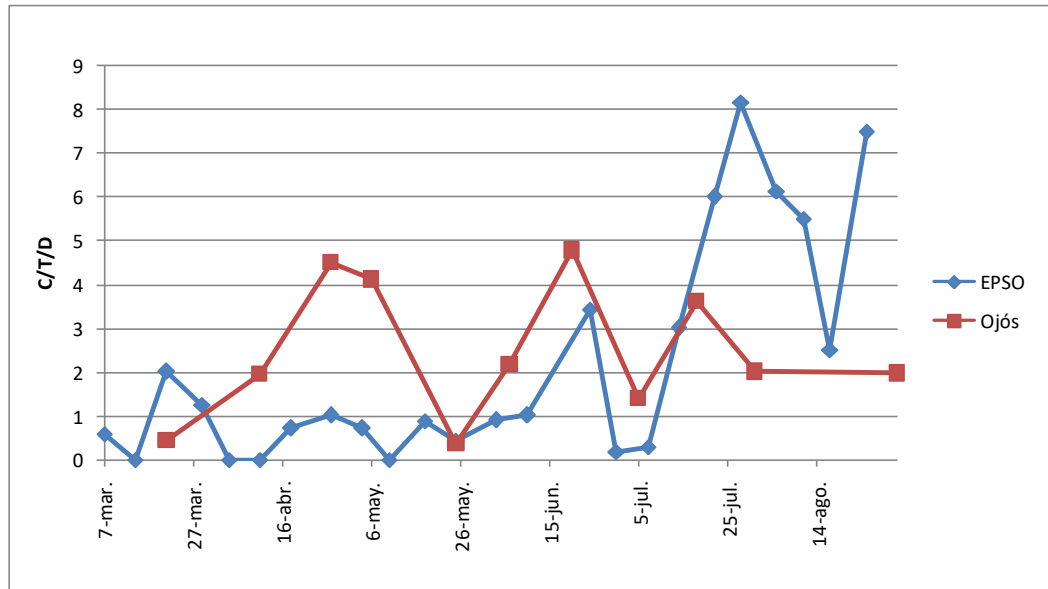
más de 20 capturas diarias. En el resto de vuelos las capturas han estado en torno a 7-12 capturas diarias.

En la parcela de Ojós se observan vuelos durante el mes de abril, la segunda quincena de junio y el mes de julio. Los niveles de captura de trampas han estado entre 3,5-5 capturas diarias, siendo el vuelo máximo en junio con 5 capturas diarias.

El único trabajo de monitoreo y seguimiento de de las poblaciones de *C. gnidiella* en nuestra zona ha sido el de Bartual *et al.*, (2014). Este estudio se ha llevado a cabo durante los años 2010-2011 en dos parcelas, una de Albatera y otra de Elche, en las cuales se obtuvo tres vuelos para ambas parcelas, uno a últimos de junio primeros de julio, otro en agosto (máximo vuelo) y mediados de septiembre. Si se compara con los resultados obtenidos con los de Bartual *et al.*, (2014) se observa también un vuelo en agosto y en septiembre, pero no coincide con el vuelo obtenido en el mes de noviembre obtenido en la finca de Muchamiel.



**Gráfica 1. Curvas de vuelo de *Cryptoblabes gnidiella* expresadas en capturas por trampa y día durante el período 16/05-19/11 en dos parcelas (Muchamiel y EPSO) en 2015.**



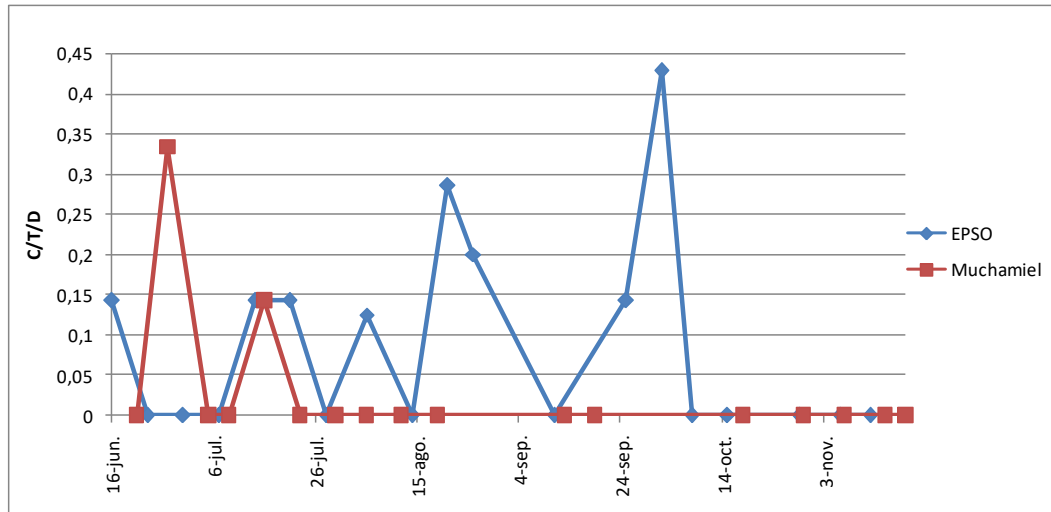
**Gráfica 2. Curvas de vuelo de *Cryptoblabes gnidiella* expresadas en capturas por trampa y día durante el período 7/03-01/09 en dos parcelas (Ojós y EPSO) en 2016.**

Las curvas de vuelo obtenidas para *A. ceratoniae* se muestran en las gráficas 3 y 4. En la parcela de la EPSO se observan 4 vuelos en el año 2015, a mediados de junio, el mes de julio, la segunda quincena de agosto y a últimos de septiembre. Los vuelos con más capturas diarias han sido los de la segunda quincena de agosto y últimos de septiembre con 0,29 y 0,43 capturas diarias respectivamente. Mientras que al siguiente año se muestran 5, durante la segunda semana de marzo, últimos de marzo primeros de abril, última semana de abril, última semana de junio y mediados de julio. El máximo vuelo es el de últimos de marzo con 0,25 capturas diarias, mientras que las capturas diarias en los otros dos vuelos han estado en torno a 0,15 capturas diarias.

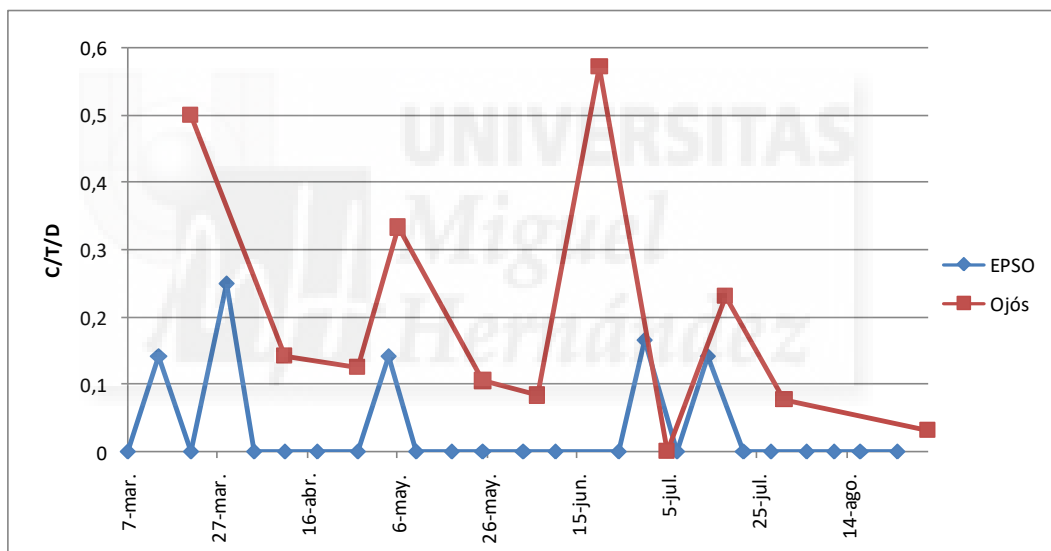
En la parcela de Muchamiel se observan 2 vuelos en el año 2015, uno a últimos de junio y el otro a mediados de julio. Los niveles de captura en ambos vuelos han sido muy bajos con 0,15-0,33 capturas diarias.

En la parcela de Ojós se observan 4 vuelos en el año 2015, a últimos de marzo, a principios de mayo y mediados de junio y la tercera semana de julio. Los máximos vuelos son los de últimos de marzo y mediados de junio con 0,5 y 0,58 capturas diarias respectivamente, mientras que las capturas diarias en los otros dos vuelos han estado en torno a 0,2-0,3 capturas diarias.

En la gráfica 4 se puede observar claramente como los niveles de capturas han sido prácticamente el doble en la parcela de Ojós respecto de las otras.



**Gráfica 3.** Curvas de vuelo de *Apomyelois ceratoniae* expresadas en capturas por trampa y día durante el período 16/05-19/11 en dos parcelas (Muchamiel y EPSO) en 2015.



**Gráfica 4.** Curvas de vuelo de *Apomyelois ceratoniae* expresadas en capturas por trampa y día durante el período 7/03-01/09 en dos parcelas (Ojós y EPSO) en 2016.

Como es habitual en las trampas de feromonas, se han capturado otras especies a parte de *C. gnidiella* y *A. ceratoniae*. En las trampas de *C. gnidiella* se ha identificado a *Duponchelia fovealis* (Zeller), cayendo una media de unos 5-6 individuos semanalmente durante los meses de julio y agosto, produciéndose un posterior descenso (Figura 15), otra especie semejante a *Anatrachyntis badia* que empezó a caer en las trampas en el mes de agosto con aproximadamente unas 10 capturas semanales (Figura 16), y otro lepidóptero de menor tamaño (Figura 17), con un mayor número de capturas semanales que las anteriores especies, que no se ha llegado a identificar.

Según Zawadneak *et al.*, (2016) el macho adulto de *D. fovealis* presenta un abdomen delgado y alargado. Las alas anteriores son de color marrón, más oscuras en los ápices con dos líneas transversales, que presenta una línea más hacia el exterior, habiendo en la región central un punto hacia el ápice de la ala. Las alas posteriores son de color pardo claro, con una línea ondulada delgada en la parte central del ala (Figura 15). No se han capturado orugas de *D. fovealis* sobre granadas, por lo que no se puede decir que la plaga esté afectando al cultivo. Es una especie muy polífaga habiéndose citado sobre: margaritas africanas, *Amharanthus*, *Anthurium*, Azalea, *Coleus*, Maíz, cucurbitáceas, geranio, *Impatiens*, *Kalanchoe*, lechuga, orquídea, rosas, fresa, tomillo y una larga lista de plantas acuáticas; y es considerada como plaga en la albahaca, begonia, mora, higo, pimiento, flor de pascua, granado y tomate (White, 2012).

En las trampas de *C. gnidiella* también se han capturado en menor medida otros adultos que parecen corresponderse con *Anatrachyntis badia* (Figura 16). No se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de la morfología y la genitalia del insecto por lo que no se puede decir con seguridad que esa sea la especie. Sin embargo algunos de los rasgos descritos por García Marí *et al.*, (2010) para *A. badia* como son la longitud de las antenas (casi tan largas como el cuerpo), tórax de color marrón rojizo mezclado con marrón oscuro y zonas grises y el margen posterior del tórax de color ocre.



Figura 15. Macho adulto de *Duponchelia fovealis* Zeller en trampa con feromona de *Cryptoblabes gnidiella*.



Figura 16. Lepidóptero semejante a *Anatrachyntis Badia* capturado en trampa de *Cryptoblabes gnidiella*, y adulto de *Anatrachyntis badia* a la derecha (García Mari *et al.*, 2010).





**Figura 17. Adulto de otro lepidóptero (izda) junto a *Cryptoblabe gnidiella* (dcha) en trampa de *Cryptoblabe gnidiella*.**

Según Bagnoli y Lucchi (2001) las trampas de feromonas específicas para *C. gnidiella* no muestran una selectividad adecuada, al caer en sus trampas otras especies de lepidópteros. Las especies capturadas más frecuentemente fueron *Pammene inquilina* Fletcher, *Cydia funebrana* Treitschke (Tortricidae, olethreutinae), *Duponchelia fovealis* Zeller (Pyralidae, Pyraustinae), *Mamestra dysodea* (Den y Schiff.), *Anapoma riparia* (Boisduval), *Mythimna vitellina* (Hübner) (Noctuidae, hadeninae), *Hoplodrina ambigua* (Den. y Schiff.) (Noctuidae, Amphipyrrinae).

Al igual que en las trampas con feromonas de *C. gnidiella*, en las trampas de *A. ceratoniae* se han capturado otros lepidópteros de la mitad del tamaño de *A. ceratoniae*, por lo que se ve claramente que son adultos de *A. ceratoniae*.



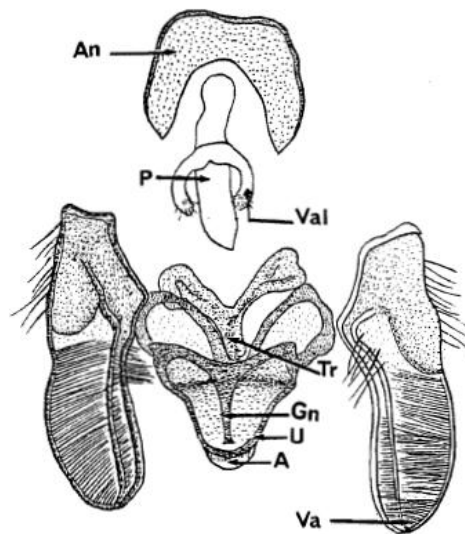
**Figura 18. Adulto de lepidóptero capturado en trampa con feromona de *Apomyelois ceratoniae*.**

#### **4.3.2. Genitalias de los machos**

Se han examinado las preparaciones microscópicas de las genitalias de machos atrapados en las trampas con feromonas, y se han comparado con las descripciones de la bibliografía que se ha encontrado al respecto

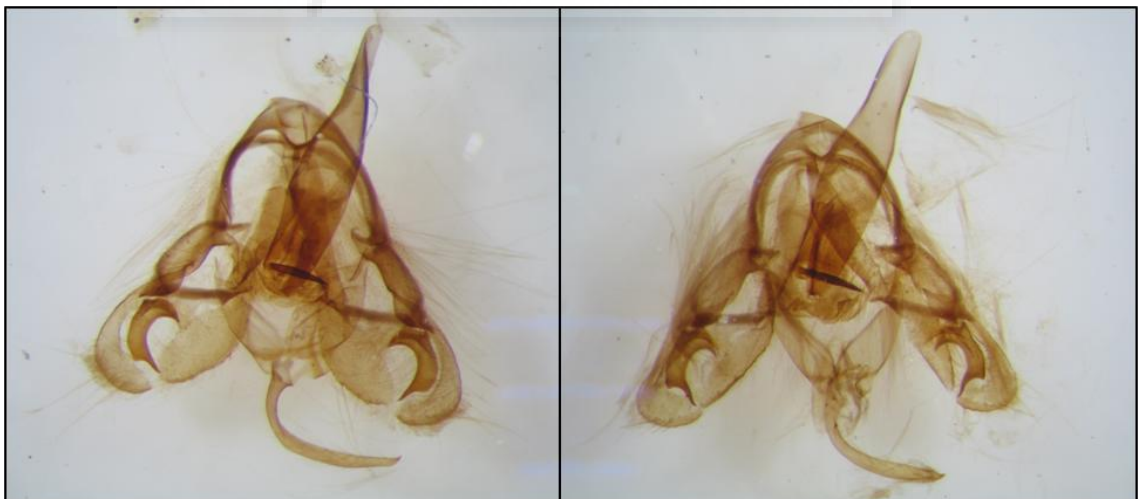
##### **4.3.2.1. *Apomyelois ceratoniae***

En los macho de *A. ceratoniae* la armadura genital presenta dos valvas visibles desde el exterior. El pene está flanqueado por dos apéndices en forma de dedos erizados de cerdas cortas y gruesas, que están conectados por dos membranas. En el extremo posterior de la armadura genital, se observa una apófisis masiva y esclerificada correspondiente al unco, y un extremo bilobulado de la lengüeta proyectada, con una forma cónica correspondiente al gnato (descrito por Herbulot, 1979; en Dhoubi, 1982), y la transtilla, pieza que tiene la forma de una Y invertida en *A. ceratoniae* se coloca por encima de la gnato. También tiene forma de V invertida y decolorada (Doumandji 1981; en Dhoubi, 1982) (Figura 19). Las descripciones y esquemas de la genitalia de *A. ceratoniae* propuestos por Yoshiyasu y Kitatsuji (2008) y Sawsan y Al-Barty (2009) también concuerdan las de Dhoubi (1982).



**Figura 19. Genitalia masculina de *Apomyelois ceratoniae* (Dhoubi, 1982): An: Anillo, P: Pene, Val: Valvula, Tr: Transtilla, Gn: gnato, U: Unco, A: Ano, Va: valva.**

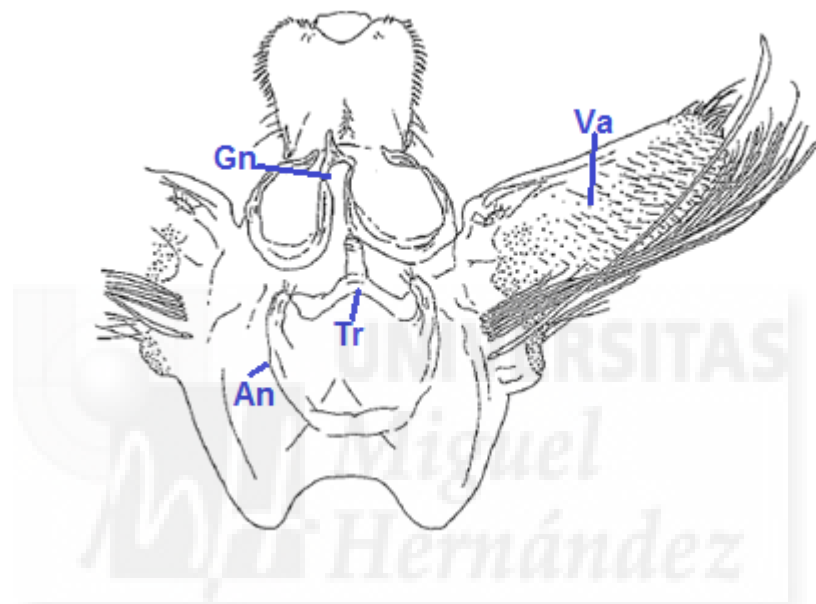
En la Figura 20 se observa como las genitales preparadas con los machos capturados en las trampas de *A. ceratoniae* son similares a las descritas anteriormente. La genitalia presenta dos valvas, estando el pene flanqueado por los apéndices. El unco se encuentra esclerificado. La transtilla tiene forma de Y invertida.



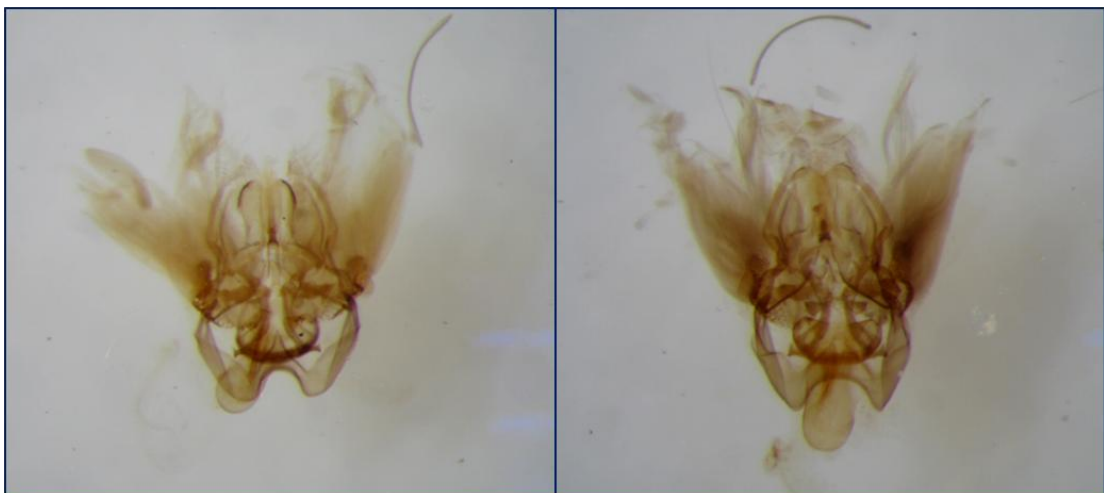
**Figura 20. Genitalia masculina de *Apomyelois ceratoniae*. Lado ventral (izq.) y lado dorsal (dcha.).**

#### 4.3.2.2. *Cryptoblabe gnidiella*

Según Neunzig (1986) la genitalia presenta un unco amplio con el margen apical redondeado e invaginado. El gnato tiene forma de un pequeño gancho. La transtilla posee un elemento central alargado. La valva es relativamente sencilla con el reborde costal claramente convexo en la base, cerca de la cual posee una pequeña protuberancia y unos mechones que se derivan cerca del sacculus (Figura 21). Como se aprecia en la Figura 22 el aspecto de las preparaciones realizadas es semejante al descrito.



**Figura 21. Genitalia masculina de *Cryptoblabe gnidiella* según Neunzig (1986). An: Anillo, Tr: Transtilla, Gn: Gnato, Va: valva. Se ha omitido el pene**



**Figura 22. Genitalia masculina de *Cryptoblabe gnidiella* de un ejemplar capturado en su correspondiente trampa.**

### 4.3.3. Alas de los machos de *Apomyelois ceratoniae*

En la Figura 23 se comparan las alas de *A. ceratoniae* con las descripciones de Mozzafrain *et al.*, (2007a) y Ren y Yang (2016). Aunque las preparaciones efectuadas no tienen buena calidad se puede apreciar un gran parecido a las alas presentadas por ambos autores. Sin embargo si se observa la unión entre la cubital 1 (Cu1) y la mediana 3 (M3) de las alas anteriores (delimitada por los puntos 2 y 3 de la Figura 23 inferior izq.) se observa una ligera diferencia en las 3 figuras.

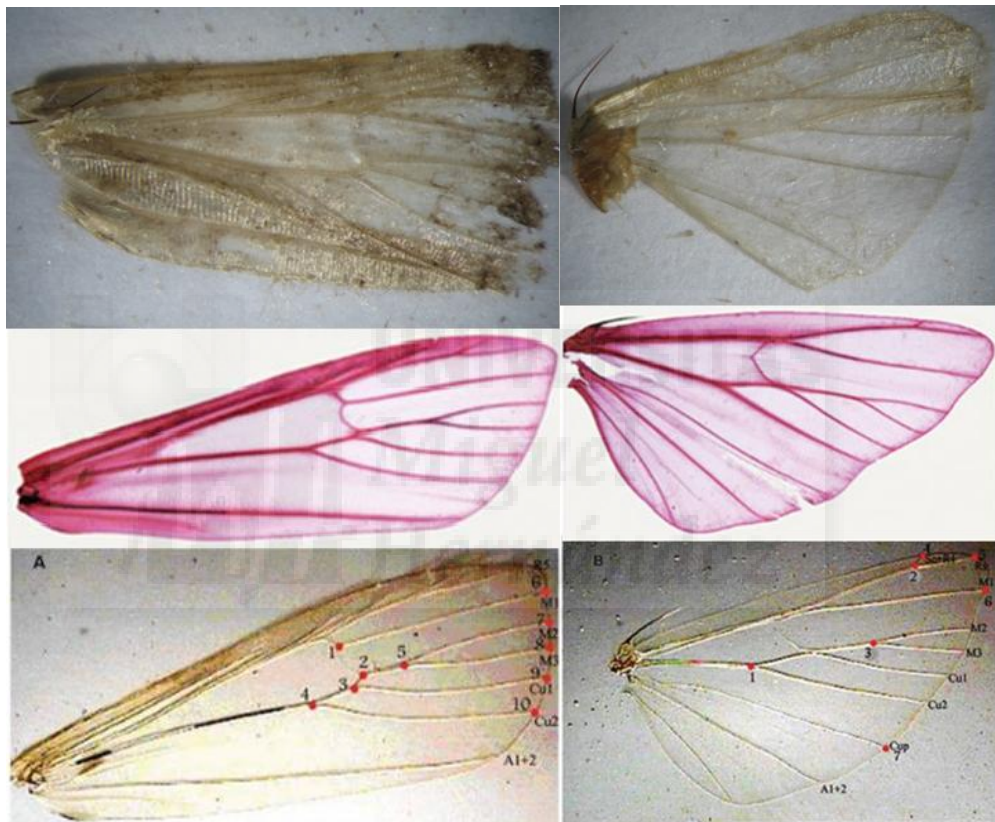
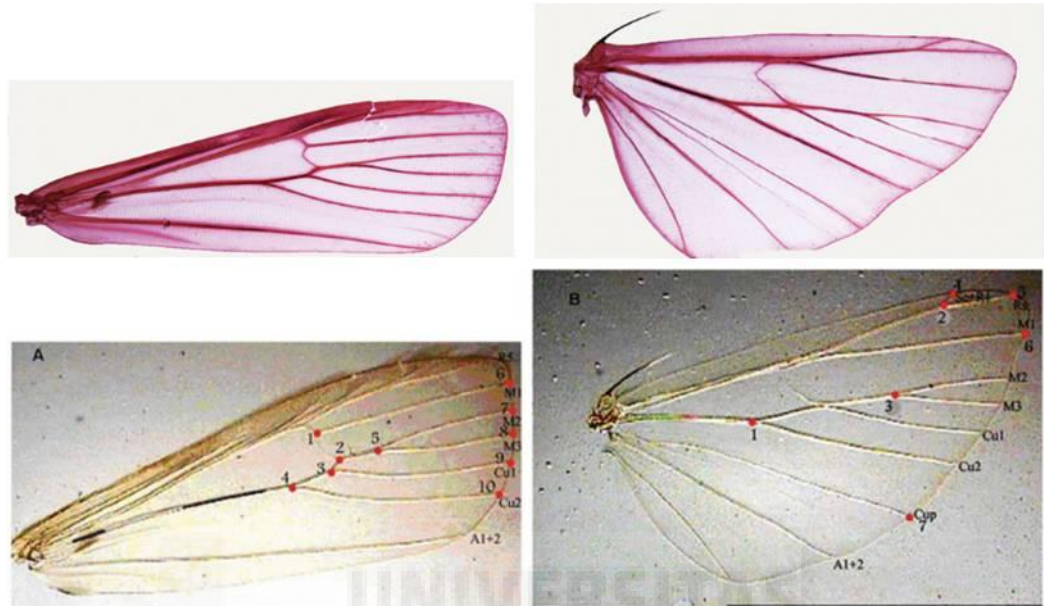


Figura 23. Alas delanteras (izda.) y traseras (dcha.) de macho *Apomyelois ceratoniae*, de un ejemplar capturado en trampa (arriba), según Ren y Yang (2016) (centro) y según Mozzafrain *et al.*, (2007a).

En cambio, como se puede ver en la Figura 24, las alas descritas como *A. ceratoniae* por Mozzafarian *et al.*, (2007a) (abajo) son muy parecidas a las descritas como *Ectomyelois bipectinalis* por Ren y Yang (2016) (arriba).



**Figura 24.** Alas de *Apomyelois ceratoniae* (Mozzafarian *et al.*, 2007a) y *Ectomyelois bipectinalis* (Ren y Yang, 2016),

Según Mozzafarian *et al.*, (2007a) el tamaño de las alas de las poblaciones que se alimentan de la granada son más pequeñas que la descendencia criada en el laboratorio. Los análisis alométricos que realizaron mostraron diferencias en poblaciones cercanas entre sí con distintos hospedantes. En este estudio se llegó a la conclusión de que las diferencias de las alas y el tamaño del cuerpo es debido al hospedante en que se encuentra el insecto.

Dadas todas las discrepancias mostradas en la morfología de las alas no se puede considerar como un carácter muy consistente para la identificación de los adultos de *A. ceratoniae*.

#### 4.3.4. Orugas: Morfología

Para la identificación de las orugas se ha utilizado la clave de Soils (2006) y los caracteres de identificación de Gilligan y Passoa (2014).

Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 10. La especie más abundante ha sido *A. ceratoniae* de la que se han contabilizado un total de 8 de las 10 orugas estudiadas. Se ha detectado la presencia en tres parcelas distintas: Ojós (B1, B6 y B20), Matola (Elche) (B4) y la EPSO (B24).

**Tabla 10. Orugas observadas y su identificación.**


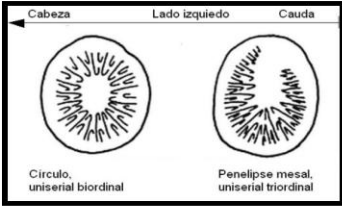
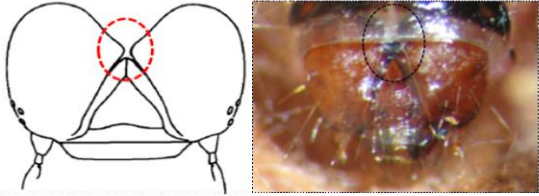
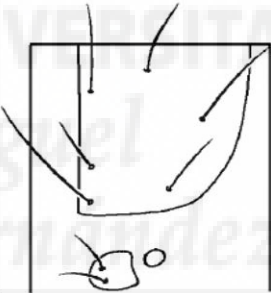
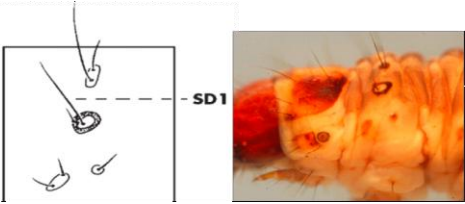
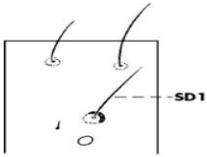
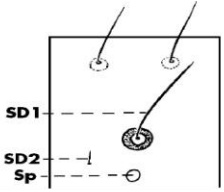
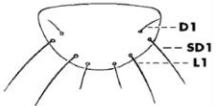
Muestra	Fecha recolección	Localidad	Nº larvas	Especie
B1	03/09/2014	Ojós	3	<i>A. ceratoniae</i>
B4	05/08/2015	Matola (Elche)	1	<i>A. ceratoniae</i>
B6	11/09/2015	EPSO	1	<i>A. ceratoniae</i>
B7	17/09/2015	Ojós	1	<i>A. ceratoniae</i>
B21	27/10/2015	Ojós	2	<i>A. ceratoniae</i>
B25	27/11/2015	EPSO	2	<i>C. gnidiella</i>

Únicamente se ha identificado como *C. gnidiella* la muestra B25 tomada en la parcela de la EPSO en noviembre de 2015.

Exceptuando la identificada como *C. gnidiella* que se encontró en el cáliz de varias granadas, el resto se han obtenido del interior de granadas con síntomas de podredumbres y orificios en el fruto. Según Bartual *et al.*, (2014) es en las zonas con melaza, principalmente el cáliz del fruto y las zonas de contacto, donde la hembra de *C. gnidiella* deposita sus huevos.

Para la identificación de las orugas de *A. ceratoniae* capturadas en las granadas se han empleado los caracteres morfológicos de la Tabla 11 elaborada a partir de la clave de Solis (2006) y los caracteres de identificación de Gilligan y Passoa (2014).




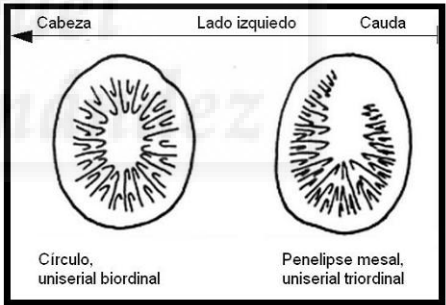
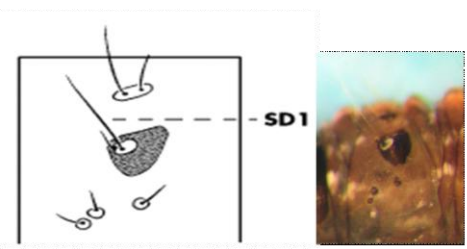
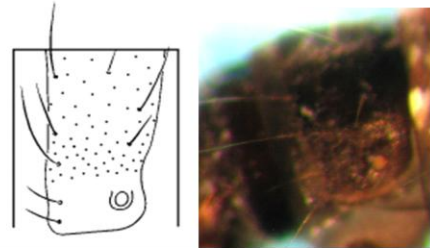
Tabla 11. Caracteres de identificación de *A. ceratoniae* elaborado con la información y esquemas de Solis (2006) y Gilligan y Passoa, (2014).

<i>Ectomyelois ceratoniae</i>	Carácter
Patas abdominales (propatas o pseudópodos): 5 pares en segmentos abdominales 3, 4, 5, 6, 10	
Ganchitos de los pseudópodos dispuestos en círculos uniseriales o en penelipse (círculo incompleto en menos de la mitad)	
Sutura coronal o epicranial ausente, las áreas adfrontales alcanzan la muesca epicranial	
Escudo preespiracular del protórax no se extiende por debajo ni detrás del espiráculo, y contiene 2 setas	
Anillo esclerotizado alrededor de la seta SD1 del mesotórax	
Arcos en forma de luna creciente, por encima y separados de la base de la seta SD1 desde A1 a A7	
Seta S2 de A8 normalmente separada del espiráculo 2 o más veces el diámetro de éste	
Anillo esclerotizado (normalmente completo) alrededor de la seta SD1 de A8	
Escudo anal con la seta SD1 más cerca de la seta D1 que de la seta L1	



Para la identificación de las orugas de *C. gnidiella* se han empleado los caracteres morfológicos de la Tabla 12 elaborada a partir de la clave de Solis (2006) y los caracteres de identificación de Padil (2016).

**Tabla 12. Caracteres de identificación de *C gnidiella* elaborado con la información y esquemas de Solis (2006) y Gilligan y Passoa (2014).**

<i>Cryptoblabes gnidiella</i>	Carácter
Cuerpo de color gris parduzco, línea dorsal de color marrón rojizo, bordeada a ambos lados de una banda de color marrón ocre pálido, línea espiracular marrón ocrácea	
Cabeza color marrón rojizo a negro	
Patas torácicas marrón rojizas a negro	
Placa o escudo anal del mismo color que el tegumento	
Patas abdominales (propatas o pseudópodos): 5 pares en segmentos abdominales 3, 4, 5, 6, 10	
Ganchitos de los pseudópodos dispuestos en círculos uniseriales o en penelipse (círculo incompleto en menos de la mitad)	
Anillo alrededor de seta mesotorácica SD1 prominentemente esclerotizada	
Escudo preespiracular del protórax rodeando completamente el espiraculo y débilmente pigmentado	

## 5. Conclusiones

La clave empleada de Miller *et al.*, (2007) no ha sido lo bastante precisa para poder identificar entre *Planococcus citri* y *Planococcus lilacinus*. En la mayoría de las muestras estudiadas no se ha podido distinguir entre ambas especies, habiéndose identificado a *Planococcus citri* en ciertas ocasiones.

Los caracteres necesarios para diferenciar ambas especies son diminutos caracteres cuticulares, por lo que se precisa de un experimentado y habilidoso taxónomo en esta familia de insectos, para realizar preparaciones microscópicas con la suficiente calidad donde se puedan apreciar todos estos caracteres.

Por primera vez se ha detectado sobre el granado en España la presencia de una cochinilla algodonosa perteneciente al género *Phenacoccus*, hasta el momento únicamente se había citado a *Planococcus citri*.

Las especies de pulgones encontradas, por orden de frecuencia han sido: *Aphis gossypii*, *Brachycaudus helichrysi*, *Aphis punicae* y *Aphis spiraeicola*.

Por primera vez se ha detectado sobre granado en España la presencia del pulgón *Brachycaudus helichrysi*, hasta el momento únicamente citado en granado a nivel mundial.

El número máximo de capturas de machos adultos de *Cryptoblabes gnidiella* ha tenido lugar durante los meses de agosto y noviembre en la parcela de Muchamiel en 2015. En la parcela de Orihuela (EPSO) ha sido en junio y septiembre en 2015 y en julio en 2016. En la parcela de Ojós en abril, mayo y mediados de junio en 2016.

El número de capturas de machos adultos de *Apomyelois ceratoniae* en la parcela de Ojós ha sido mucho mayor que el resto de parcelas, produciéndose el máximo vuelo en la segunda quincena del mes de junio con 0,6 capturas por trampa y día, mientras que en el resto de parcelas las capturas han sido prácticamente nulas.

Todas las muestras de orugas se han identificado como *Apomyelois ceratoniae*, excepto una de las muestras de la EPSO que ha sido identificada como *Cryptoblabes gnidiella*.



## 6. Bibliografía

Ahmadi, B.; Moharramipour, S; Brent, J. Sinclair. 2016. Overwintering biology of the carob moth *Apomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). International Journal of Pest Management, 62(1): 69-74. <http://dx.doi.org/10.1080/09670874.2015.1102984>

Aitken, D. 1963. A key to the larvae of some species of Phycitinae (Lepidoptera, Pyraloidea) associated with stored product, and some related species. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Infestation Control Laboratory, Tolworth, Surbiton, Surrey.

Ananda, N.; Kotikal, Y. K.; Balikai, R. A. 2009. Sucking insect and mite pests of pomegranate and their natural enemies. Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 22(4), 781-783. <http://14.139.155.167/test5/index.php/kjas/article/viewFile/1478/1469>

Bagnoli, B.; Lucchi, A. 2001. Bionomics of *Cryptoblabes gnidiella* (Millière) (Pyralidae Phycitinae) in Tuscan vineyards. IOBC wprs Bulletin, 24(7), 79-84.

Balikai, R.A.; Kotikal, Y.K.; Prasanna, P.M. 2011. Status of Pomegranate Pests and their Management Strategies in India. Acta Hort. 890: 569-584.

Bargallo, S.; Cravedi, P.; Pasqualini, E.; Patti, I. 2002. Pulgones de los principales cultivos frutales. Ediciones Mundi-Prensa. 121 pp.

Barrientos, J.A. 1988. Bases para un curso práctico de Entomología. Editado por Asociación española de Entomología. 754 pp.

Bartual, J.; Lozoya, A.; Ortiz, M. 2014. Plagas del granado en España. Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal, 261:28-34.

Bayhan, E.; ÖLmez-Bayhan, S.; Ulusoy, M. R.; Brown, J. K. 2005. Effect of Temperature on the Biology of *Aphis punicae* (Passerini) (Homoptera: Aphididae) on Pomegranate. Environmental Entomology, 34(1):22-26. <http://dx.doi.org/10.1603/0046-225X-34.1.22>

Beltrà, A.; Soto, A. 2012. Pseudocóccidos de importancia agrícola y ornamental en España. Ed. Universitat Politècnica de València. 100 pp.

Blackman, R.L.; Eastop, V.F. 2006. Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs. John Wiley & Sons, Ltd. Natural History Museum. London. 1439 pp.

Cantó Tejero M. 2014. *Planococcus citri* (Risso) y *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera Pseudococcidae) en cultivos de Alicante y Murcia. Identificación morfológica y mediante PCR.

Demirel, N. 2016. A study on occurrence and population trends of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) in pomegranate orchards by using pheromone traps. Entomology and Applied Science Letters, 3(1):26-31. <http://easletters.com/volume3-issue1-2016/EASL-2016-3-1-26-31.pdf>

Dhouibi, M. 1982. Etude bioecologique D' *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae) dans les zones presariennes de la Tunisie. Université Pierre et Marie Curie. Tesis doctoral.

Don R.H.; Cox P.T.; Wainwright B.J.; Baker K.; Mattick, J.S. 1991. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Research, 19(14): 4008.

García Marí, F.; Navarro Campos, C.; Marzal, C.; Aguilar, A. 2010. Presencia del microlepidóptero *Anatrachyntis badia* en cítricos. Descripción, comportamiento y daños al fruto. Levante Agrícola, 402: 270-276.

García Morales M, Denno BD, Miller DR, Miller GL, Ben-Dov Y, Hardy NB. 2016. ScaleNet: A literature-based model of scale insect biology and systematics. Database. <http://dx.doi.org/10.1093/database/bav118> . <http://scalenet.info>

Guirao, P: 2015. Granada: Aspectos agronómicos y plagas. Tema 26 de los apuntes de la asignatura Gestión Integrada en Frutales Máster Interuniversitario en Sanidad Vegetal. Universidades Politécnica de Valencia, Politécnica de Cartagena, Miguel Hernández, y U. de Almería.

Hayon, I.; Mendel, Z.; Dorchin, N. 2016. Predatory gall midges on mealybug pests – Diversity, life history, and feeding behavior in diverse agricultural settings. Biological Control, 99:19-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.04.008>

Hermoso De Mendoza, A. 1984. Pulgons (Homoptera, Aphidinea) transmissors de la "tristeza" dels cítrics al País Valencià. Tesi Doctoral. Universitat Politècnica de València. 208 pp.

Heydari, M.; Izadi, H. 2014. Effects of seasonal acclimation on cold tolerance and biochemical status of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* Zeller, last instar larvae. Bulletin of entomological research, 104(5):592-600. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485314000364>

Holman, J. 2009. Host Plant Catalog of Aphids. Palearctic Region. Editorial Springer Netherlands. 1140 pp. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8286-3>

Kinawy, M. M.; Al-Waili, H. M.; Almandhari, A. M. 2008. Review of the Successful Classical Biological Control Programs in Sultanate of Oman. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 18 (1): 1-10.

Lee, Y.; Lee, W.; Kim, H.; Lee, S. 2015. A new record of *Aphis punicae* Passerini, 1863 (Hemiptera: Aphididae) from Korea. Journal of Asia-Pacific Entomology, 18(2):157-163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2014.12.008>

Malloch, G.; Hight, 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.; Shivaraju, C. 2016. Mealybugs and their Management in Agricultural and Horticultural crops. Springer. 655 pp. <http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-2677-2>

Melgarejo Moreno, P.; Salazar Hernández D.M. 2003. Tratado de fruticultura para zonas semiáridas Vol. II. Edit. Mundi Prensa. 430 pp.

Miller, D., A.; Rung, G.; Parikh, G.; Venable, A.J.; Redford, G.A.; Evans, and R.J. Gill.; 2014. Scale Insects, Edition 2. USDA APHIS Identification Technology Program (ITP). Fort Collins, CO. Consultada en julio de 2016 <http://idtools.org/id/scales/>

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de estadística 2014. 2015. Madrid. 1051 pp.

[http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2014/AE\\_2014\\_Completo.pdf](http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2014/AE_2014_Completo.pdf)

Mozaffarian F.; Sarafrazi A.; Nouri Ganbalani, G.; Ariana, A. 2007b Morphological variation among Iranian populations of the Carob Moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller, 1839) (Lepidoptera: Pyralidae), Zoology in the Middle East, 41:1, 81-91. . <http://dx.doi.org/10.1080/09397140.2007.10638230>

Mozaffarian, F.; Sarafrazi, A.; Nouri Ganbalani, G. 2007a. Host plant-associated population variation in the carob moth *Ectomyelois ceratoniae* in Iran: A geometric morphometric analysis suggests a nutritional basis. Journal of Insect Science 7:02

Neunzig, H.H. 1986. The Moths of America North of Mexico. Fascicle 15.2 Pyraloidea Pyralidae (Part) The wedge entomological research foundation.

Nieto Nafría, J.M.; Mier Durante, M.P. 1998. Hemiptera, Aphididae I. En: Fauna Ibérica, vol. 11. Ramos, M.A. *et al.*, (Eds.) Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC. Madrid. 424 pp.

Nieto Nafría, J.M.; Mier Durante, M.P.; Binazzi, A.; Pérez Hidalgo, N. 2002. Hemiptera, Aphididae II. En: Fauna Ibérica, vol.19. Ramos, M.A. *et al.*, (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid. 352 pp.

Nieto Nafría, J.M.; Mier Durante; M.P., García Prieto, F.; Pérez Hidalgo, N., 2005. Hemiptera, Aphididae III. En: Fauna Ibérica, vol.28. Ramos, M.A. *et al.*, (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid. 362 pp.

Öztürk, N.; Ulusoy, M.R.; Bayhan, E. 2005. Pest and natural enemy species determined in pomegranate orchards in the Eastern Mediterranean Region, Turkey. Türkiye Entomoloji Dergisi 29(3): 225-235. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20063044358>

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>

Sawsan, S.; Al-Barty, M.F. 2009. Male genitalia Morphology of the carob Moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) with References to Their Chemoreceptor. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3(1): 89-95.

Sayed, S.M.; Elsayed, G.; Mahmoud, S.F.; Elzahrany, O.M. 2015. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* and Indigenous *Trichogramma turkistanica* for Controlling Lepidopterous Pests on Taify Pomegranate Fruits. African Entomology, 23(2):443-450. <http://dx.doi.org/10.4001/003.023.0229>

Silva, E.B.; Mexia, A. 1999. The pest complex *Cryptoblabes gnidiella* (Millière) (Lepidoptera: Pyralidae) and *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae) on sweetorange groves (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) in Portugal: Interspecific associaton. Boletín de sanidad vegetal de plagas, 25: 89-98.

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.

Sobhani, M.; Goldansaz, S.H.; Hatami, B.; Hosseini, S.A. 2015. A field screening of pomegranate cultivars for resistance to the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae*, and compatibility with its larval parasitoids. International Journal of Pest Management, 61:4, 346-352. <http://dx.doi.org/10.1080/09670874.2015.1069418>

Sugimoto, S. 2011. The taxonomic identity of *Aphis punicae* Shinji, 1922 (Hemiptera: Aphididae). Entomological Science, 14(1): 68–74. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1479-8298.2010.00405.x>

Toledo J.; Albuje E. 2000 Project of technical standards for pomegranate integrated production in Valencia. En: Melgarejo P., Martínez-Nicolás J.J., Martínez-Tomé J. (eds). Production, processing and marketing of pomegranate in the Mediterranean region: Advances in research and technology. Zaragoza: CIHEAM, 2000.M p. 149-155 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 42) <http://om.ciheam.org/om/pdf/a42/00600265.pdf>



Toledo, J.; Sánchez J.; Lozano, M.; Albuje, E. 1991. Plagas del granado- Estrategia de lucha. Sèrie divulgación tècnica. Generalitat Valenciana.

Wang, L.; Zhang, S.; Luo, J-Y.; Wang, C-Y; Lv, L-M.; Zhu, X-Z.; 2016. Identification of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) Biotypes from Different Host Plants in North China. PLoS ONE 11(1): e0146345. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146345>

White, J. 2012. Greenhouse pest alert. The European Pepper Moth, *Duponchelia fovealis*. University of Kentucky – College of agricultura. <https://entomology.ca.uky.edu/files/efpdf2/ef324.pdf>

Wohlfarter, M.; Giliomee, J.H.; Venter E. 2010. A Survey of the Arthropod Pests Associated with Commercial Pomegranates, *Punica granatum* (Lythraceae), in South Africa. African Entomology, 18(1):192-199. <http://dx.doi.org/10.4001/003.018.0115>

Yıldırım, E.M.; Başpınar, H. 2015. The population fluctuations of carob moth, *Apomyelois ceratoniae* (Zell.) (Lepidoptera: Pyralidae) and honeydew moth *Cryptoblabes gnidiella* Mill. (Lepidoptera: Pyralidae), and investigation on their damage and natural enemies on pomegranate in west aegean region of Turkey. Agriculture & Food, 3: 186-192. <http://www.scientific-publications.net/get/1000010/1432395255674914.pdf>

Yoshiyasu, Y.; Kitatsuji, R. 2008. Discovery of *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera, Pyralidae) in a peach orchard in Japan. Scientific Reports of Kyoto Prefectural University. Life and Environmental Sciences (Japan), 60: 31-37.

Zawadneak, M. A.; Gonçalves, R.G. Pimentel, I.C.; Schuber, J.M.; Santos, B.; Poltronieri, A.S.; Solis, A. 2016. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). South America. Idesia [online], 34(3):91-95 <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292016000300011>.