



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA

400282  61060

**Efecto de extractos vegetales en la transmisión  
de Tospovirus por *Frankliniella occidentalis* Pergande.  
Thysanoptera: Thripidae).**

BO 1166/95  
Ej. 3

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A :  
LOURDES CERVANTES DIAZ

DIRECTOR: DRA. EMMA ZAVALA-MEJIA



MEXICO, D. F.

OCTUBRE, 1995



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA  
JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA

Los Reyes Iztacala, a 11 de septiembre de 1995

APROBACION DE TESIS

JEFE DE LA UNIDAD  
DE ADMINISTRACION ESCOLAR.  
P R E S E N T E .

Por medio de la presente manifestamos a Ud. que como Miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de Tesis del Pasante de Biología: Lourdes Cervantes Díaz

titulado: Efecto de extractos vegetales en la transmisión de Tospovirus por Frankliniella occidentalis Pergande. (Thysanoptera: Thripidae)

para obtener el grado de Licenciatura, después de haber sido cuidadosamente revisado y realizadas las correcciones que se consideraron pertinentes, declaramos nuestra aprobación del trabajo escrito, ya que reúne las características, calidad y decoro académico del título al que aspira.

A t e n t a m e n t e  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Biól. Alberto Arriaga Frías

Biól. Ana Lilia Muñoz Viveros

Biól. J.Gerardo Ortíz Montiel

Biól. Hugo Perales Vela

Dra. Emma Zavaleta-Mejía

(Nombre completo)

(Firma)

Esta investigación forma parte del proyecto "Epidemiología del Virus Marchitez manchado del Tomate en crisantemo", con clave 1750-A. Financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

*siempre hay algo que cultivar  
en todas las dimensiones de la libertad...  
esas flores tan difíciles en estos tiempos  
de tan escasos jardines*

*Anónimo*

## AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología apoyó el financiamiento de la presente investigación.

A la Dra. Emma Zavaleta-Mejía, por su dedicación constante y gran apoyo para la realización de esta investigación.

Al M.C. Rodolfo de la Torre Almaráz, por su enseñanza en el área de la Virología y en especial su agradable amistad.

Al Dr. Roberto Johansen Naime y la M.C Aurea Mújica Guzmán por la identificación de trips, y en especial su calidez humana y sencillez profesional.

A los compañeros del laboratorio: "Fisiología de la Interacción planta-patógeno", del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados por su amistad y apoyo brindado, pero sobre todo por ser cada uno de ellos fuente de inspiración para seguir adelante mi vida académica.

Al Biól. Miguel Angel Molina Báez y Prog. Verónica Romero Valencia, por su gran ayuda en el diseño e impresión del presente trabajo y su valiosa amistad brindada.

## DEDICATORIA

Dedico especialmente este trabajo a las personas que son una de las principales razones de vivir **mi vida**...

*A papá...*

por el infinito amor, paciencia y comprensión para soportar las vicisitudes de tener una hija, que además de ser bióloga..."está loca" y sobre todo por ser mi Juez severo, el cual me guía y motiva para alcanzar mis objetivos y con ello mi felicidad.

*A linda...*

por la gran bendición que Dios me brindó al tenerte como madre.

*A mis queridos hermanos...*

Carlos.

Y la flor que llegó en el preciso momento de mi vida: mi pequeña Xiadani

*A Daniel el travieso y Lore*

Por la dicha de tenerlos a mi lado

Bienaventurados mis amigos, que no preguntan porqué me fui... ni a que he venido.

*Miky*

*Angélica E.*

*Eunice A.*

*Edgar*

*Horacio Q.*

*Miguel M.*

*Mónica A.*

*Verónica F.*

*Teresa D.*

Con ellos fortalezco los principios que me permiten tener la sinceridad como una cualidad extremadamente sensible.

Como un reconocimiento a todos y cada uno de mis profesores que han contribuido e influenciado en mi vida por la magnitud de sus valores humanos y profesionales, en especial a la *Dra Emma Zavaleta*.



*A Miky... quien me ha ayudado a florecer...*

# CONTENIDO

INDICE DE CUADROS .....	ix
INDICE DE FIGURAS .....	x
RESUMEN .....	xi
1. INTRODUCCION .....	1
1.1 Objetivos .....	2
2. REVISION DE LITERATURA .....	4
2.1 Biología molecular de Tospovirus .....	4
2.1.1 Estructura viral .....	5
2.1.2 Genoma viral .....	6
2.1.3 Estrategias de replicación .....	6
2.2 Hospederos de Tospovirus. ....	9
2.3 Sintomatología .....	9
2.4 Especies de trips que transmiten Tospovirus y su diseminación en el campo ....	10
2.5 Mecanismo de transmisión de Tospovirus por trips .....	11
2.5.1 Aparato bucal de trips y adquisición de Tospovirus .....	14
2.6 Daños y pérdidas ocasionados por Tospovirus .....	16
2.7 Medidas de control empleadas contra los Tospovirus .....	16
2.7.1 Control genético .....	16
2.7.2 Control químico. ....	17
2.7.3 Control integrado .....	18
2.8 Efecto de extractos vegetales sobre insectos plaga. ....	19
3. MATERIALES Y METODOS .....	22
3.1 Cría de trips .....	22
3.1.2 Establecimiento de la colonia de <i>Frankliniella occidentalis</i> Pergande .....	22

3.1.3 Comprobación de la adquisición deTospovirus por <i>F. occidentalis</i> . . . . .	26
3.2 Ensayos con extractos de plantas . . . . .	26
3.2.1 Material vegetal empleado . . . . .	26
3.2.2 Pruebas de fitotoxicidad de los extractos vegetales . . . . .	27
3.2.3 Efecto de los extractos vegetales en la transmisión de Tospovirus por trips . . . . .	28
4. RESULTADOS . . . . .	33
4.1 Establecimiento de la colonia de <i>F. occidentalis</i> . . . . .	33
4.2 Transmisión de Tospovirus por trips . . . . .	33
4.3 Fitotoxicidad de los extractos vegetales. . . . .	34
4.4 Curva de concentración viral en <i>Datura stramonium</i> . . . . .	36
4.5 Efecto de los extractos vegetales en la transmisión de Tospovirus por trips . . . . .	36
5. DISCUSION . . . . .	41
6. CONCLUSIONES. . . . .	46
7. LITERATURA CITADA . . . . .	47
APENDICE. . . . .	59

## INDICE DE CUADROS

Cuadro	Págs.
1 Parte vegetal utilizada para la preparación de los extractos vegetales .....	27
2 Expresión de síntomas y reacción serológica en plantas de <i>Datura stramonium</i> expuestas a trips virulíferos dentro de la jaula entomológica .....	34
3 Porcentaje de plantas con síntomas de fitotoxicidad inducidos por los extractos vegetales (infusión o macerado) a diferentes concentraciones .....	35
4 Efecto de los tratamientos en la incidencia (%) de plantas con síntomas de Tospovirus y severidad, daños alimenticios, número de insectos muertos y comprobación de la presencia de Tospovirus mediante ELISA en "gota" y lesiones locales en planta indicadora .....	38

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1	Partícula de Tospovirus mostrando la envoltura viral constituida por las glicoproteínas G1 y G2, la proteína interna de la nucleocápside (N), una proteína grande (L), y su genoma constituido de tres filamentos sencillos (S, M y L) de ARN ..... 5
2	Representación esquemática de la estructura y expresión del filamento de ARN S del TSWV ..... 7
3	Representación esquemática del filamento M del INSV ..... 7
4	Representación esquemática del filamento L del TSWV ..... 9
5	Diagrama de flujo de la metodología ..... 23
6	Jaula utilizada para el establecimiento y cría de <i>Frankliniella occidentalis</i> P. en condiciones de invernadero ..... 25
7	Jaula utilizada para las pruebas de transmisión con el vector <i>Frankliniella occidentalis</i> ..... 30
8	Curva de concentración viral obtenida en base al número de lesiones locales contadas en <i>Nicotiana glutinosa</i> , inoculada con savia de <i>Datura stramonium</i> obtenida a diferentes tiempos posteriores a su inoculación mecánica con Tospovirus ..... 37
9	Efecto de los tratamientos en la incidencia, inducidos por Tospovirus en plantas de <i>Datura stramonium</i> ..... 39
10	Efecto de los tratamientos en la severidad de los síntomas inducidos por Tospovirus en plantas de <i>Datura stramonium</i> (se muestran valores de en cada tratamiento ..... 39

## RESUMEN

Hasta el momento se cuenta con escasos productos terapéuticos a virus fitopatógenos, así que el control se dirige al insecto vector. Una de las estrategias más frecuentemente utilizadas es la aplicación de insecticidas, desafortunadamente su empleo inadecuado está provocando resistencia a éstos en varias plagas de interés económico. Una alternativa de control la constituye el uso de productos naturales, como los extractos vegetales, que no causan contaminación y son de fácil obtención y aplicación. Tales extractos pueden actuar como insecticidas de contacto, sustancias antialimentarias y agentes morfogénicos. En el caso de virus transmitidos por insectos, una estrategia de control con gran potencial sería la de interferir en la adquisición o transmisión del virus por el vector mediante la aplicación de extractos vegetales. El propósito de este estudio fue conocer el efecto de extractos vegetales en la transmisión de *Tospovirus* por *Frankliniella occidentalis* Pergande.

Se evaluaron siete extractos vegetales: *Allium sativum*, *Nicotiana tabacum*, *N. glauca*, *Gossypium hirsutum*, *Delphinium sp.* *Lonchocarpus sp.* y *Brassica oleracea var. italica*. Estos tuvieron dos variantes: macerado e infusión y se prepararon a 10% de concentración peso-volumen (p/v). Las pruebas de transmisión se realizaron en plantas sanas de *Datura stramonium* (10/tratamiento) que se asperjaron con el extracto correspondiente para después colocar trips adultos virulíferos, obtenidos de una colonia que previamente se estableció en condiciones de invernadero.

De todos los extractos probados solamente con el macerado de *Delphinium sp.* se obtuvo una reducción significativa de 70% en la incidencia (de plantas con síntomas) en comparación al testigo. A excepción de los tratamientos con las infusiones de *G. hirsutum*, *A. sativum* y *Lonchocarpus sp.* y el macerado de *N. glauca*, todos los demás (tanto en infusión como macerado) redujeron significativamente la severidad (desde un 32 a 75%) con respecto al testigo.

## 1. INTRODUCCION

Las enfermedades virales en las plantas constituyen una de las amenazas más grandes debido a que son limitantes económicas de gran importancia en la agricultura. Los daños causados por los virus a las plantas son significativos porque una vez que las partículas virales entran en el hospedero no es posible eliminarlas sin causar daños a éste, ya que afectan de manera directa la información genética de las plantas (Matthews, 1991).

Recientemente en México se detectó la presencia de Tospovirus, los cuales están afectando cultivos de importancia económica. Verdugo (1989) describió la presencia del Virus Marchitez Manchada del Jitomate (TSWV) en el cultivo de jitomate en el estado de Sinaloa y señaló a *Frankliniella fusca* como vector del virus. En Villa Guerrero, Edo. de Méx, zona productora de flor más importante a nivel nacional, los Tospovirus TSWV y Virus Mancha Necrótica de los Belenes (INSV) están provocando pérdidas hasta de un 60% en crisantemo, lo cual ha repercutido en el abandono del cultivo por algunos floricultores (Ochoa *et al*, 1994). Por otro lado debido al amplio rango de hospedantes que tienen los Tospovirus (German *et al*, 1992), constituyen un peligro potencial para la producción de otras especies hortícolas y ornamentales cultivadas en México.

En la actualidad, se cuenta escasos con productos terapéuticos a virus fitopatógenos, por tal motivo el control se dirige al insecto vector. Una de las estrategias más frecuentemente utilizada es la aplicación de insecticidas. Sin embargo, el mal manejo que se ha hecho de estos productos está ocasionando resistencia a insecticidas en varias plagas de importancia económica, además de provocar serios problemas de intoxicación y/o contaminación ambiental (Lagunes, 1984).

Una alternativa de control la constituye el uso de productos naturales que no causan contaminación, son económicos y de fácil obtención y aplicación, entre estos sobresale el empleo de polvos minerales y vegetales, aceites vegetales y extractos

vegetales. Los primeros se han empleado para proteger y prevenir la invasión de insectos plaga en semillas almacenadas, ya que cuando se mezcla un polvo químicamente activo y finamente pulverizado se presenta un considerable descenso del grado de humedad en el grano y la del cuerpo de los insectos, produciéndose en éstos la muerte por desecación (Cotton, 1979; Golob y Webley, 1980). En cuanto al empleo de aceites y extractos vegetales se ha encontrado que actúan como insecticidas de contacto, sustancias antialimentarias y agentes morfogénicos en el insecto (Lagunes, 1984; Malik y Mujtaba, 1984).

Se tiene conocimiento de aproximadamente 1600 especies de plantas tóxicas a diversos organismos, de éstas 1005 especies tienen propiedades insecticidas y solamente se reportan 6 especies con acción insecticida que afectan a organismos del orden Thysanoptera (Greinge y Ahmed, 1988).

En el caso de los virus transmitidos por insectos una estrategia de control con gran potencial podría ser la de interferir con la adquisición o transmisión del virus por el vector mediante la aplicación de extractos vegetales.

### 1.1 Objetivos

Por lo tanto en el presente estudio el objetivo general propuesto fue:

- Evaluar el efecto de siete extractos vegetales en la transmisión de Tospovirus por *Frankliniella occidentalis* P.

Para cumplir con el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Establecer una colonia de tisanopteros de la especie *Frankliniella occidentalis* Pergande para realizar las pruebas de transmisión.
- Comprobar la adquisición y trasmisión de Tospovirus en la colonia de *F. occidentalis* P.



- Evaluar la fitotoxicidad de siete extractos vegetales en plantas de *Datura stramonium*.
- Detectar la presencia de Tospovirus por medio de la técnica serológica ELISA y plantas diferenciales.

## 2. REVISION DE LITERATURA

El primer registro de la enfermedad conocida como "marchitez manchada" del tomate se realizó en Australia en 1915 (Brittlebank, 1919) y en 1930 Samuel y colaboradores demostraron su etiología viral.

La presencia de estos virus pertenecientes al género *Tospovirus* han sido la causa de epidemias y enfermedades de plantas en el trópico, subtropical y regiones templadas, presentando una amplia distribución mundial (Best, 1968; Francki y Hatta, 1981; Stoobs *et al*, 1992).

Causan grandes pérdidas económicas debido a que afectan importantes cultivos hortícolas, ornamentales y frutales (Iwaki, 1984; Cho y Mitchell, 1984; Cho *et al*, 1991; Allen y Broadbent, 1986), con tasas de infección que van del 50 al 90% (Cho y Mitchell, 1984).

### 2.1. Biología molecular de *Tospovirus*

El género *Tospovirus*, al cual pertenecen los Virus Marchitez Manchada del Jitomate (TSWV), Mancha Necrótica de los Belenes (INSV), Necrótico de las Yemas (BNV) y Mancha Amarilla del Cacahuete (PYSV) (De Avila, 1993), se ubican dentro de la familia *Bunyaviridae* (German *et al*, 1992). Esta familia consta de cinco géneros más: *Plhebovirus*, *Uukuvirus*, *Nariovirus*, *Bunyavirus* y *Hantavirus*.

La mayoría de los miembros de esta familia se desarrollan en artrópodos, causándoles una infección persistente no letal a lo largo de su vida. Sin embargo, el género *Tospovirus* es el único capaz de infectar plantas (German *et al*, 1992), no obstante se incluye en esta familia principalmente por sus similitudes morfológicas, genoma y estrategias de replicación.

### 2.1.1. Estructura viral

Las partículas de Tospovirus son esféricas a pleomórficas, tienen un tamaño que va de 80 a 110 nanómetros (nm). Presentan una envoltura que contiene glicoproteínas, que son los principales componentes de esta membrana, la cual rodea un centro en donde se encuentra el genoma y proteínas asociadas.

Los viriones están compuestos de cuatro proteínas: una proteína interna de la nucleocápside (N) de 29 kilodaltones (kd), dos glicoproteínas (G1 y G2) que constituyen la membrana, con pesos de 78 y 58 kd, respectivamente y una proteína grande (L) de aproximadamente 200 kd (Fig. 1) (Mohamed et al, 1973; Tass et al, 1977).

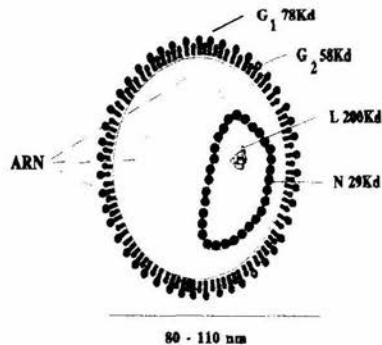


Fig. 1 Partícula de Tospovirus mostrando la envoltura viral constituida por las glicoproteínas G1 y G2, la proteína interna de la nucleocápside (N), una proteína grande (L), y su genoma constituido de tres filamentos sencillos (S, M y L) de ARN.

### **2.1.2. Genoma viral**

Los Tospovirus tienen un genoma constituido de tres filamentos sencillos de moléculas de ácido ribonucleico (ARN). Un filamento largo denominado L (ARN L) de 8.9 kd, y que codifica para la polimerasa. Y los filamentos cortos M y S (ARN M y ARN S) de 5 y 2.9 kd, respectivamente. El primero contiene la información para las glicoproteínas G1 y G2 de la membrana viral y el segundo para la proteína N (Fig. 1) (Van den Hurk et al, 1977; De Haan y Wagemakers, 1989).

### **2.1.3. Estrategias de replicación**

El filamento S tiene, como se mencionó anteriormente, una longitud de 2.9 kb (ó 2916 nucleótidos). Este filamento genómico presenta dos "fragmentos de lectura abierta" (FLA) que son sitios específicos que se traducirán a proteínas por medio de un ARN mensajero (ARN m), uno se localiza en el filamento viral (ARN v) que al ser transcrito en un ARN mensajero (ARNm) codifica una proteína de 52.4 kb denominada NSs y otro se presenta en el filamento complementario viral (ARN cv) que codifica otra proteína de 29 kd denominada N; ambas proteínas se expresan por traducción de una especie de ARN mensajero subgenómico (Fig. 2).

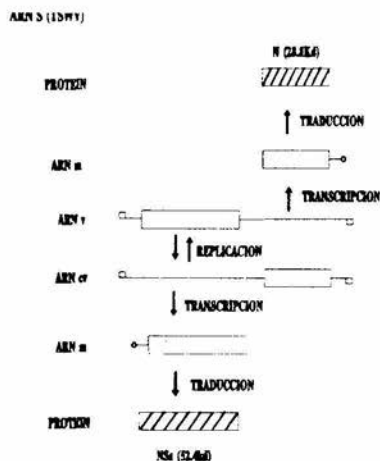


Fig 2 Representación esquemática de la estructura y expresión del filamento de ARN S del TSWV. Las líneas representan el ARN. Los rectángulos blancos y sombreados indican los fragmentos de lectura abierta (FLA) y las proteínas derivadas de su lectura, respectivamente. Los extremos del ARN viral (ARN v) y el ARN complementario viral (ARN cv) representan las terminales complementarias, y los extremos del ARN subgenómico (ARN m) indican las terminaciones 5'. Se muestra en el diagrama la transcripción a partir del ARN v que produce la proteína N de 29 Kd. Y la transcripción del ARN cv se traduce a una proteína no estructural denominada NSs con peso molecular de 52.4 Kd.

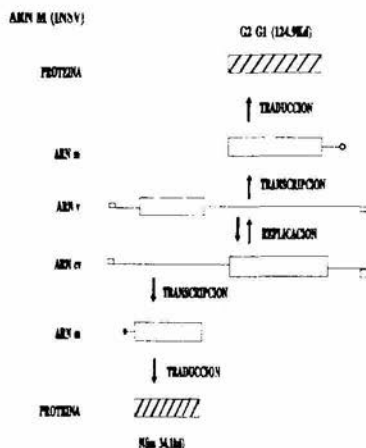


Fig.3 Representación esquemática del filamento M del INSV. Este filamento se traduce en ambos sentidos a partir del ARN cv una proteína con peso molecular de 124.9 kd que forman las glicoproteínas. Otro FLA ayuda a codificar a a partir del ARN v una proteína de 34.1 kd designada NSm.

En el caso del Virus Marchitez Manchada del Jitomate (TSWV), el filamento M tiene una longitud de 5000 nucleótidos (Nt) y presenta solo polaridad negativa. Del filamento complementario viral se traduce ya sea una proteína de 35 kd ó una de 185 kd, ya que el ARN *cv* contiene un FLA con un codón de terminación UGA, que es probablemente sujeto a traslocación a través de la lectura, lo cual puede dar como resultado la síntesis de diferentes proteínas como producto de su lectura (German *et al*, 1992).

Por otra parte, el Virus Mancha Necrótica de los Belenes (INSV), anteriormente conocido como TSWV variante I (German, *et al*, 1992), presenta un filamento M con longitud de 4500 Nt y de doble polaridad. Cuenta con dos FLA, uno interviene para codificar, a partir del ARN *cv*, una proteína con peso molecular de 124.9 kd que formarán las glicoproteínas G1 y G2 de la membrana viral. Un segundo FLA ayuda a codificar, a partir del ARN *v*, un polipéptido de 34.1 kd designado NS m (proteína no estructural codificada por el segmento del ARN M) (Fig. 3) (Law, *et al*, 1992).

En ambos virus (TSWV e INSV), el filamento L tiene una longitud de 8900 Nt, presenta un FLA sobre el ARN *cv* que se expresa de un ARN *m* casi del tamaño del genoma, el cual se traduce en una proteína con un peso molecular de 331.5 kb, que se cree tiene función de polimerasa (Fig. 4) (De Haan *et al*, 1991)

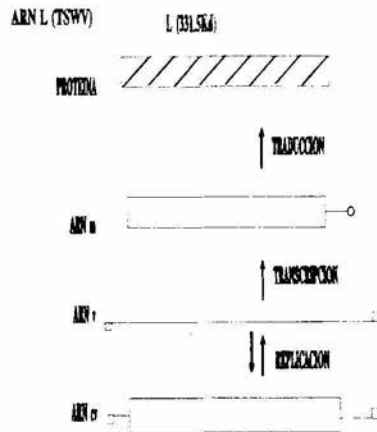


Fig. 4 Representación esquemática del filamento L del TSWV (en la fig. 2 se menciona lo que indica cada símbolo). El ARN v es de polaridad negativa y al ser transcrito por un ARN m producirá la proteína L con un peso molecular de 331.5 kd.

## 2.2. Hospederos de Tospovirus

El género Tospovirus presenta uno de los rangos de hospederos más amplios. Investigaciones realizadas por Best (1968) ayudaron en la compilación de una lista de hospederos de los que han sido aislados estos virus y la cual incluye 157 especies de dicotiledóneas y 6 especies de monocotiledóneas distribuidas en 29 y 5 familias, respectivamente. En una revisión más reciente (German *et al*, 1992) se consigna que el registro de hospederos continua en aumento y que actualmente abarca más de 500 especies. Solo dentro de la familia Solanacea, Compositae y Leguminosae se tienen registros de más de 100 especies reservorias (Peters *et al*, 1991))

## 2.3. Sintomatología

Los Tospovirus pueden inducir una amplia variedad de síntomas los cuales pueden variar aún incluso dentro de la misma especie hospedera debido a la edad y

estado nutricional de la planta, así como de las condiciones ambientales en las que se desarrolla. De manera general, causan necrosis sobre varias partes de la planta, clorosis, patrones anillados y/o longitudinales cloróticos a necróticos (Best y Gallus, 1953; Ie, 1970; Francki y Hatta, 1981; Peters *et al*, 1991).

Específicamente, en el caso de jitomate afectado por el Virus Marchitez Manchada del Jitomate los síntomas más característicos se observan en las hojas, presentándose un repentino color café-castaño, después empiezan a deformarse por la presencia de zonas cloróticas concéntricas a manera de anillos que se necrosan con el paso del tiempo. Los frutos que se forman después de la infección pueden desarrollar de un ligero moteado a manchas cloróticas intensas. Por otra parte, las especies del género *Nicotiana* generalmente desarrollan clorosis en hojas jóvenes y este síntoma se va intensificando con el tiempo, hay deformación de hojas, necrosis y crecimiento retardado. Típicamente en tabaco y jitomate, como en otras especies hospederas, la severidad de los síntomas se presenta más sobre un lado de la planta, lo cual da como resultado un desarrollo asimétrico en ésta (Franki y Hatta, 1981).

Los cultivos de importancia económica susceptibles a la infección por Tospovirus, especialmente por el Virus de la Marchitez Manchada del Jitomate (TSWV) y Virus de la Mancha Necrótica de los Belenes (INSV), incluye jitomate, papa, tabaco, cacahuete, chile, lechuga, papaya y ornamentales como crisantemo, begonia, dhalia y belenes (Jones y Baker, 1991). El cultivo más importante de monocotiledoneas afectado por el TSWV es la piña, en la cual la enfermedad se conoce como mancha amarilla de la piña (Carter, 1975).

#### **2.4. Especies de trips que transmiten Tospovirus y su diseminación en el campo**

A la fecha solamente se han consignado a trips (Thysanoptera: Thripidae) como vectores de Tospovirus. Se ha demostrado que solamente nueve especies pertenecientes a tres géneros son vectoras (German *et al*, 1992; Hunter 1995): *Frankliniella occidentalis* Pergande ó trips de las flores del occidente (Paliwal, 1976; Allen y Broadbent, 1986; Cho *et al*, 1986. and Mau *et al*, 1991); *F. fusca* Hinds ó trips del tabaco (Sakimura,



1963; Hobbs y Black, 1993); *F. schultzei* Trybom ó trips común de las flores (Sakimura, 1969; Amin y Reddy, 1981; Cho *et al*, 1986); *F. intonsa* Trybom (Hunter, 1995); *F. tenuicornis* Uzel (Hunter, 1995); *Thrips tabaci* Lindeman ó trips de la cebolla (Pittman, 1927; Linford, 1932; Sakimura, 1940b; 1963; Cho *et al*, 1989); *T. setosus* Moulton (Sakimura, 1962); *T. palmi* Karny ó trips del melón (Iwaki *et al*, 1984; Ullman *et al*, 1989) y *Scirtothrips dorsalis* Hood ó trips del chile (Sakimura, 1962; Amin y Reddy, 1981). De este modo en la naturaleza, la diseminación en el campo se debe solamente a la actividad de estos vectores. Sin embargo, en algunas zonas se ha observado incompatibilidad entre una especie vectora y el virus, como en el caso de *T. tabaci* que en experimentos realizados en Canadá mostró ser incapaz de transmitir el TSWV (Paliwal, 1976).

Se tiene conocimiento que los Tospovirus pueden ser adquiridos solamente por larvas de trips (Bald y Samuel, Sakimura, 1962), determinando que el periodo mínimo para la adquisición del virus parece ser de 5 minutos, pero la eficiencia en la transmisión se incrementa conforme aumenta el tiempo de alimentación y la inoculación del virus se logra con la alimentación superficial sobre las células epidermales de las plantas (Sakimura, 1962; 1963; Lewis, 1973). Los vectores retienen el virus toda su vida (Sakimura, 1963; German *et al*, 1992; Ullman y Cho, 1992) lo cual indica que el virus es persistente en el vector, aunque Paliwal (1979) no observó partículas virales en tejidos de trips virulíferos mediante técnicas citológicas, pero si por medio de serología. No se tiene evidencia que exista transmisión transovárica (Sakimura, 1962;1963; Ullman y Cho, 1992), sin embargo, se presenta replicación viral en células de trips (Ullman y Cho, 1992).

## 2.5. Mecanismos de transmisión de Tospovirus por trips

Cada virus posee una combinación de propiedades particulares que le permiten diseminarse de una planta a otra en el campo, para así lograr perpetuarse y sobrevivir en una localidad determinada. La diseminación de los virus ocurre de varias formas: 1) contacto directo (transmisión mecánica), 2) semilla, 3) injertos naturales y

artificiales, 4) vectores habitantes del suelo (hongos y nematodos) y 5) vectores aéreos (insectos o ácaros) (Rocha y González, 1985). Por lo tanto la diseminación se puede llevar a cabo con o sin la ayuda de vectores. La mayoría de los cultivos intensivos se infectan por virus transmitidos por contacto a causa de implementos de labranza y manos de los trabajadores, entre otros, ya que los sistemas de cultivo intensivo implican la frecuente manipulación de plantas lo que favorece que los virus se diseminen por contacto. Por otra parte, la forma más común de transmisión de virus en la naturaleza es a través de organismos vectores. Tales agentes diseminadores de enfermedades principalmente incluyen en primer orden a los insectos y en menor proporción a los ácaros, a los hongos y a los nemátodos; la diseminación de los virus de una planta a otra se lleva a cabo durante el proceso de alimentación sobre sus hospedantes o cuando se reproducen sobre ellos (Carter, 1973).

En la actualidad los investigadores para clasificar la forma de transmisión de virus por insectos se basan en el tiempo que dura el insecto virulífero después de que adquiere el virus (periodo de retención) y en la ruta que lleva el virus dentro del cuerpo del insecto. Así, Watson y Roberts (citado por Acosta y Delgadillo, 1989), en relación al periodo de retención clasifican a los virus en persistentes y no persistentes. Los primeros se caracterizan porque una vez que el insecto adquiere el virus permanecerá virulífero por el resto de su vida a pesar de que éste presente una o varias mudas de su exoesqueleto. Por el contrario, en la transmisión no persistente el insecto dejará de transmitir el virus después de uno o más intentos por alimentarse, al igual lo perderá al mudar ya que el virus queda adherido a la exuvia (Pirone y Harris, 1977).

Otros investigadores mencionan que se presenta un tercer tipo de transmisión intermedia entre la transmisión persistente y no persistente a la cual se le denomina de tipo semipersistente (Walkey, 1985) y se caracteriza porque el insecto deja de transmitir el virus después de varios días, pero si se alimenta por largo tiempo sobre la fuente del inóculo se incrementa el porcentaje de transmisión y el periodo de retención es más largo (Acosta y Delgadillo, 1989).

Debido a que el periodo de retención es un parámetro variable en cuanto al

tiempo que se tarda en retener el insecto al virus, también se ha optado en clasificarlos en circulativos y no circulativos (Acosta y Delgadillo, 1989). En el caso de los virus no persistentes o no circulativos, el virus que causa la infección al ser ingerido por el insecto no llega al tracto digestivo ni hemolinfa, sólo se adhiere en forma específica a la cutícula que reviste al estilete, la faringe o el esófago (Lim y Hagerdon, 1977). En la transmisión persistente o circulativa el virus al ser ingerido pasa del tracto digestivo a la hemolinfa (Gildow, 1982). En este grupo se encuentran los Tospovirus.

Walkey (1985) y Acosta y Delgadillo (1989) mencionan que las características más comunes de los virus que son transmitidos de manera persistente son las siguientes:

- El insecto adquiere el virus mediante un periodo efectivo de alimentación sobre la planta infectada de por lo menos 5 minutos. A este proceso se le conoce como periodo de alimentación para la adquisición, en el caso de *Frankliniella fusca* (trips del tabaco) adquiere al Tospovirus a través de un periodo de alimentación de 3 minutos (Razvyazkina, 1953).
- Para que el virus sea transmitido a otra planta sana susceptible, debe transcurrir un periodo de tiempo que va de 5 minutos a varias horas para que el insecto inocule el virus a nivel de haces vasculares. A este proceso se le conoce como periodo de alimentación para la inoculación. Sakimura (1963) menciona que se requiere por lo menos 15 minutos de alimentación para infectar plantas sanas. En los trips *Frankliniella occidentalis*, *F. schulzei* y *Scirtothrips dorsalis* se han registrado tiempos de inoculación que van de 5 a 30 minutos (Razvyazkina, 1953; Sakimura, 1963; Amin y Reddy, 1981; Allen y Broadbent, 1986).
- El insecto transmitirá el virus durante todo su ciclo de vida después de haberse alimentado de una planta enferma.
- Los virus persistentes se localizan en las glándulas salivales, una vez que son ingeridos pasan al tracto digestivo y luego a la hemolinfa para posteriormente atravesar la membrana de las glándulas salivales donde se replican. En el caso de los trips, solamente las partículas virales adquiridas por el insecto durante los primeros estadios larvales permiten que al llegar éste a su estado adulto nunca

pierda la capacidad de transmitir el virus. Esto se debe, a que el lumen del intestino medio en estadios larvales es permeable a las partículas de Tospovirus ya que se presenta una endocitosis receptor-mediador donde el plasmalema de las células epiteliales tienen receptores para el virus. Por el contrario, las partículas virales adquiridas por individuos adultos al llegar a las células epiteliales son empaquetadas por el retículo endoplásmico rugoso quedando así secuestradas y destruidas dentro de ellas (German *et al.*, 1992; Ullman *et al.*, 1992).

### **2.5.1. Aparato bucal de trips y adquisición de Tospovirus**

Las piezas bucales de los trips forman una larga proboscis o cono bucal que se encuentra en la parte inferior de la cabeza, el extremo del cono está generalmente dirigido hacia abajo pero en algunos grupos especializados hacia atrás. Cuando el insecto está en reposo el cono bucal se coloca debajo del primer segmento torácico (Lewis, 1973).

En todos los trips las piezas bucales son asimétricas. Su aparato bucal permite un modo de alimentación de tipo raspador-chupador. La parte dorsal del cono está constituido por el clipeo y labrum, separados por una membrana, los lados están formados por las maxilas y la parte ventral por el labium. Tanto las maxilas como el labio poseen palpos, constituidos por dos a ocho artejos en las maxilas y por uno a cuatro en los labiales (Quintanilla, 1980). Dentro del cono se encuentran las demás piezas bucales dispuestas asimétricamente, constituidas por la mandíbula izquierda, ya que la derecha está atrofiada. En algunas especies la hipofaringe puede servir como un cuarto estilete (Mound, 1971; Chisholm y Lewis, 1984; Hunter y Ullman, 1989).

La mandíbula funcional es de forma tubular, muy esclerosada en el ápice. En cambio los estiletos maxilares son acanalados con la parte apical muy delgada presentando un complicado arreglo de proyecciones que forman una abertura subapical. Los márgenes de estos estiletos se acomodan longitudinalmente uno a otro para formar un tubo largo.

Durante la alimentación los líquidos nutricios son ingeridos gracias a la ayuda de los músculos de la cabeza y labrum y pequeños músculos circulares que rodean la parte terminal de la faringe funcionando a manera de bomba. Primeramente los músculos se contraen para cerrar el esófago y abrir la faringe para succionar el alimento hacia ésta, al abrir y cerrar el cono bucal se abre el esófago y los músculos se relajan para colapsar la faringe e impulsar el alimento hacia el esófago. El flujo de saliva es controlado de manera similar (Hunter y Ullman, 1989).

La presencia de estructuras sensoriales en el cono bucal y dentro del canal alimenticio, sugiere que el insecto elige el sitio de alimentación por medio de inserciones de su aparato bucal seleccionando el punto de penetración con la ayuda de estos órganos sensoriales (Chisholm y Lewis, 1984; Hunter y Ullman, 1989). Cuando el insecto detecta el sitio apropiado ingiere un gran cantidad de citoplasma vaciando más células y por lo tanto provocando más daños ocasionados por la alimentación, caso contrario sucede en las plantas que son consideradas como menos atractivas o favorables.

Aunado a esto, si el insecto se alimenta sobre una planta que además de ser hospedera está infectada con Tosopovirus, el incremento de la ingestión de los fluidos de la planta ocasiona un incremento del número de partículas virales que entran al intestino del insecto. Por otra parte se tiene conocimiento de que si la distribución de células infectadas de la planta hospedera es uniforme existe una alta probabilidad de que el virus sea adquirido por las larvas debido a la ingestión de una gran cantidad de partículas virales; lo opuesto ocurre cuando los trips se alimentan de una planta que no tiene una infección de células uniforme (Cho *et al*, 1991). Por medio de técnicas serológicas y observaciones realizadas a través de microscopía electrónica se ha encontrado que en hojas de *Datura stramonium* infectadas sistémicamente con el TSWV se presenta una distribución uniforme de células infectadas (Francki y Grivell, 1970), no presentándose esto en hojas de *Articum lappa* (German *et al*, 1992). Cho y colaboradores (1991) detectaron que a pesar de que ambas plantas son hospederas para el desarrollo de huevecillos y larvas de *F. occidentalis*, cuando éstas se alimentan sobre *D. stramonium* adquieren altas concentraciones del TSWV que cuando se

alimentan sobre *A. lappa*, produciéndose un incremento en el porcentaje de trips virulíferos.

## **2.6. Daños y pérdidas ocasionadas por Tospovirus**

Los Tospovirus (TSWV e INSV) son un serio problema fitopatológico e inducen una gran variedad de síntomas dependiendo de la especie afectada. Los síntomas comunes consisten en: manchas anulares cloróticas a necróticas en hojas y frutos, necrosis de tallos, mosaico y deformación de hojas jóvenes y reducción en el tamaño de frutos; tales síntomas se presentan en cultivos alimenticios y ornamentales en todo el mundo (Peters *et al*, 1991).

En Estados Unidos y Canadá se reportan incidencias que van de 60 hasta 100% en cultivos comerciales. Lo cual repercute en la producción agrícola ocasionando grandes pérdidas económicas (Bond *et al*, 1983; Greenough *et al*, 1985; Hoobs y Black, 1993).

En México, Verdugo (1989) describió la presencia del TSWV en jitomate en el Estado de Sinaloa y logró su transmisión con *Frankliniella fusca*. Recientemente en Villa Guerrero, Edo. de México, zona florícola más importante a nivel nacional, el cultivo y producción de flor de crisantemo ha sido seriamente afectado por Tospovirus provocando fuertes pérdidas de hasta un 60% de las plantas, lo cual repercute en el abandono del cultivo por algunos floricultores (Ochoa *et al*, 1994). Además, debido al amplio rango de hospedantes que tienen los Tospovirus (German *et al*, 1992) constituye un peligro potencial para la producción de otras especies ornamentales y hortícolas cultivadas en México.

## **2.7. Medidas de control**

### **2.7.1. Control Genético**

A pesar de que el control genético es muy eficiente y relativamente barato para controlar los diferentes tipos de enfermedades, especialmente las de tipo viral

desafortunadamente hay pocos avances sobre el conocimiento de líneas adecuadas de resistencia, ya que no se ha encontrado compatibilidad entre varias especies para la creación y establecimiento de variedades resistentes. La resistencia genética a Tospovirus ha sido difícil de identificar, caracterizar e incorporar a cultivos comerciales (German *et al*, 1992). Actualmente solo con lechuga y tomate se tienen perspectivas alentadoras.

El primer registro sobre resistencia a Tospovirus fue en tomate, en las especies *Lycopersicon pimpinellifolium*, *L. hirsutum* y *L. peruvianum* (Samuel *et al*, 1930). Posteriormente se obtuvo una variedad resistente al combinar *L. sculemtum* y *L. pimpinellifolium* (Smith, 1944). Esta fuente de resistencia sirvió para que se desarrollara un nuevo cultivo resistente denominado Pearl Harbor, pero desafortunadamente solo se logró obtener resistencia específica a una variante. En 1953, Finlay encontró cinco genes que dan resistencia a cinco diferentes variantes de Tospovirus. Posteriormente se encontró que *L. peruvianum* es muy resistente a todas ellas y se está utilizando para desarrollar cultivos resistentes (Cho *et al*, 1989).

En lechuga se ha detectado resistencia a ciertos aislamientos de Tospovirus y solo una línea de la especie *Lactuca saligna* ha mostrado una mayor resistencia (Cho *et al*, 1989).

Actualmente se están estudiando los genes que codifican las proteínas de la envoltura viral para conocer la secuencia de ácidos nucleicos y desarrollar plantas resistentes al virus. Hasta el momento solo se ha trabajado con plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* var. xanthi, las cuales han mostrado resistencia a la infección debido a una reducción en la replicación viral y expresión de los síntomas (Mackenzie y Ellis, 1992).

### 2.7.2. Control Químico

En cuanto al control químico se tiene que los tisanópteros y en especial, la principal especie vectora *Frankliniella occidentalis*, son altamente resistentes a la mayoría de los insecticidas (Ronald y Baker, 1991). Aunado a esto, las poblaciones de

tisanopteros son muy difíciles de controlar en los cultivos debido al gran número de individuos que infestan una sola planta y al rápido incremento de las poblaciones ocasionado por su ciclo reproductivo y/o la inmigración de nuevos organismos.

Hasta el momento ningún tratamiento con insecticidas ha sido efectivo para eliminar la enfermedad ocasionada por Tospovirus (Cho *et al*, 1989). Sin embargo, se recomienda la aplicación de los siguientes insecticidas (nombres comunes) para controlar las poblaciones de trips: acefato, malation, fluvalinato, metomil, entre otros, a razón de 300 l/ha una a dos veces por semana (Cho *et al*, 1989).

Por otra parte se están empezando a estudiar sustancias que puedan interferir con la transmisión del virus por el vector ya sea por alteración del comportamiento alimenticio o modificación de la partícula viral, entre otros. En 1993, Allen y colaboradores evaluaron aceites hortícolas e insecticidas jabonosos para conocer sus efectos en la reproducción y alimentación de *F. occidentalis*, así como su eficacia en la reducción de la transmisión del virus, encontrando que los aceites hortícolas (White-Prot y Dow-Corning 36 al 2%) redujeron en un 46% la transmisión de Tospovirus sin que hubiese una aparente disminución en la actividad alimentaria de éstos.

### 2.7.3. Control Integrado

En la actualidad lo que resulta más redituable y eficaz para el control de enfermedades virales es el uso combinado de las diferentes prácticas de control cultural, químico y genético existentes.

En un estudio realizado en Hawaii, se identificaron varias prácticas culturales que ayudan a disminuir la incidencia de Tospovirus las cuales se dividen en relación a las fases del ciclo del cultivo. En la fase de precultivo se sugiere intercalar cultivos susceptibles con otros que no sean hospedantes para reducir la fuente de inóculo, así como eliminar las plantas hospederas o maleza adyacentes a los cultivos y que pueden servir de refugio a los vectores. En la fase de cultivo se recomienda emplear semilla libre de virus y aplicar regularmente insecticidas para controlar las poblaciones de trips. Por último en la fase de postcosecha se deben realizar fumigaciones al suelo, por



ejemplo con metil-sodio o 1,3-dicloropropeno para eliminar a los trips que permanecen en el suelo y en restos del cultivo (Cho *et al*, 1989).

Otra práctica de control que se empieza a utilizar para reducir el número de trips alados que llegan a los cultivos es el uso de tiras reflejantes de aluminio que repelen al vector; Greenough y colaboradores (1990) utilizaron este tipo de material en cultivos de tomate, chile y tabaco encontrando una disminución en la inmigración de trips y por consiguiente una reducción en la incidencia de Tospovirus en estos cultivos.

## 2.8. Efecto de extractos vegetales sobre insectos plaga

Greinge y Ahmed (1988) publicaron una lista de aproximadamente 1600 especies de plantas tóxicas a diversos organismos, de estas 1005 especies tienen propiedades insecticidas y solamente reportan seis especies con acción insecticida que afectan a organismos del orden Thysanoptera.

Riquelme (1910) menciona que en México fue muy utilizado el tabaco (*Nicotiana tabacum*) en forma de macerado para el control de la conchuela del frijol. La nicotina es el principal alcaloide que se encuentra en esta planta y es un insecticida que se ha utilizado contra trips del gladiolo y cítricos (Richardson, 1934), la palomilla del manzano, pulgones, mosquita blanca y otros insectos de cuerpos blandos que atacan diversos cultivos (Vélez, 1974).

Hall y colaboradores (1969) indican que la toxicidad del macerado de *Prunus carolineata* (Rosaceae) de donde se aisló el ácido hidroceánico es muy activo contra moscas. Los extractos de hojas jóvenes de *Clerodendron tricotomum* (Verbenaceae) son repelentes a larvas de *Agrotis segetum* en concentraciones del 5 al 10% de acuerdo con el estado de desarrollo de las hojas. Los extractos crudos de hojas maduras a una concentración del 1% inhibieron en un 100% la actividad alimenticia (Kato *et al*, 1972).

El extracto del rizoma de *Acurus calamus* (Araceae) causa mortalidad en ninfas de *Dysdercus cingulatus* en dosis de 7 a 10 microlitros por ninfa, los extractos de *Allium sativum* (Amarillidaceae), *Ocimum sanctum* (Labiatae) y *Datura stramonium*

(Solanaceae) provocan mortalidad significativa en el tercer instar larval de *Spodoptera litura* (Rajendran y Gopalan, 1979).

La actividad antialimentaria de *Mentha pulegium* (Labiatae) y *Vigna unguiculata* (Leguminosae) fue evaluada en *Spodoptera frugiperda* (Zalkow et al, 1979). Otra investigación similar fue realizada por Meisner et al (1981) para evaluar el efecto antialimentario del extracto de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) en larvas de *Spodoptera littoralis*.

El extracto etanólico de las semillas *Thevetia thevetioides* (Apocynaceae) tiene un efecto detrimental contra *Ostrinia nubilalis*, cuando éste se incorpora a la dieta artificial (Mclaughling et al, 1980). Judd y Borden (1980) mencionan que el extracto acuoso de *Lemna minor* (Lemnaceae) impide la oviposición del mosquito *Anopheles aegypti*. El extracto acuoso de *Tanacetum vulgare* (Compositae) también tiene sustancias que provocan efecto antialimentario en *Pieris rapae*, *Trichoplusia ni* y *Plutella xilostella* según Brewer y Ball (1981). Se tiene conocimiento del aislamiento de dos compuestos de la planta *Toona ciliata* (Meliaceae) que actúan como inhibidores del apetito de la conchuela del frijol (Hernández y Berderly, 1982). Las investigaciones realizadas por Bentley y colaboradores (1984a) indican un efecto antialimentario de *Lupinus polyphyllus* (Leguminosae) contra el sexto instar larval de *Choristoneura fumiferana*. En ese mismo año (1984b) los autores antes mencionados, reportaron también a *Tussilago farfara* (Compositae) con propiedades antialimentarias contra insectos. Entre las plantas de la familia Compositae con toxicidad a insectos se encuentra *Artemisia vulgaris* (Compositae) que según Huang (1984), ha sido utilizada desde hace muchos años en áreas rurales de China como repelente de insectos, y que la presencia de algunas sustancias como la glaucólida, tienen la particularidad de hacer poco apetecible a la planta tratada con ellas y los insectos mueren de inanición o se devoran entre sí.

Malik y Mujtaba (1984) encontraron que los rizomas de *Saussurea lappa* muestran una actividad repelente sobre *Tribolium castaneum*, mientras que las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae) ejercieron una actividad antialimentaria sobre *Rhyzoperta dominica*. El extracto de corteza y hojas de roble

blanco (*Quercus arba*) inhibieron la alimentación de larvas y adultos de *Leptinotarsa decemlineata* (Drumond, 1985).

Una de las plantas más efectivas contra varias especies de insectos es *Azadirachta indica* (Meliaceae) la cual en forma de extracto se ha evaluado contra *Lyrtozyma sativae* y *L. trifolii* en hortalizas y en crisantemo (Webb *et al*, 1983; Stein y Parella, 1985).

Actualmente en México se están realizando algunas investigaciones sobre sustancias vegetales tóxicas a insectos. Lagunes y asociados (1984) evaluaron a nivel de laboratorio 437 especies de plantas y solo 58 especies tuvieron efecto nocivo, principalmente antialimentario contra *Spodoptera frugiperda*, contra larvas del mosquito doméstico (*Culex quinquefasciatus*), contra el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*) y conchuela del frijol (*Epilachna varivestis*).

Arenas (1984), cita 1093 especies de plantas pertenecientes a 159 familias que en extracto acuoso o en polvo tienen efectos nocivos contra 112 especies de artrópodos. De estas plantas por lo menos el 20% forma parte de la flora mexicana. De las 112 especies de artrópodos 32 se reportan en México como plagas importantes en cultivos, incluyendo especies de la familia Thripidae que están causando serios problemas en cultivos horticolas y ornamentales (Verdugo, 1989; Ochoa *et al*, 1994), principalmente por ser transmisores de virus.

Por todo lo anteriormente expuesto, es evidente que en el caso de virus transmitidos por insectos una estrategia de control con gran potencial podría ser la de interferir con la adquisición o transmisión del virus por el vector, mediante la aplicación de extractos vegetales.

### 3. MATERIALES Y METODOS

En la figura 5 se resume la metodología del siguiente trabajo de investigación.

#### 3.1. Cria de trips

El material biológico utilizado en la presente investigación consistió de insectos de la especie *Frankliniella occidentalis* Pergande. La determinación a especie fue realizada por el Dr. Roberto Johansen Naime, en el Laboratorio de Entomología del Instituto de Biología, UNAM.

Se eligió trabajar con este organismo debido a que es una de las principales especies vectoras de Tospovirus; además presenta un alto poder reproductivo y se desarrolla fácilmente sobre una amplia gama de plantas hospederas (Allen et al, 1991).

La cría de *F. occidentalis* se realizó a una temperatura de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y a una humedad relativa de 40 a 50%.

##### 3.1.1. Establecimiento de la colonia de *F. occidentalis* Pergande

Debido al conocimiento de la presencia de esta especie vectora en el área circunvecina de Chapingo, Edo de México (com. per. del Dr. Roberto Johansen), para iniciar la cría masiva de trips se obtuvieron ejemplares colectados sobre diversas plantas hospederas en dicha área. La forma de captura consistió en introducir en una bolsa de plástico la planta infestada sacudiéndola fuertemente para que los organismos cayeran en ella (Hernández, 1989). La captura se realizó principalmente en frijol, calabaza y rosas.

Previo a la colecta se sembraron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* var. jamapa) en macetas de 30 cm de altura X 20 cm de diámetro con suelo estéril, colocando una semilla en cada una de ellas, hasta completar 80 macetas. Una vez que las plantas presentaran tres hojas verdaderas, se les cubrió con una jaula de forma cilíndrica (30 cm de alto X 19 cm de

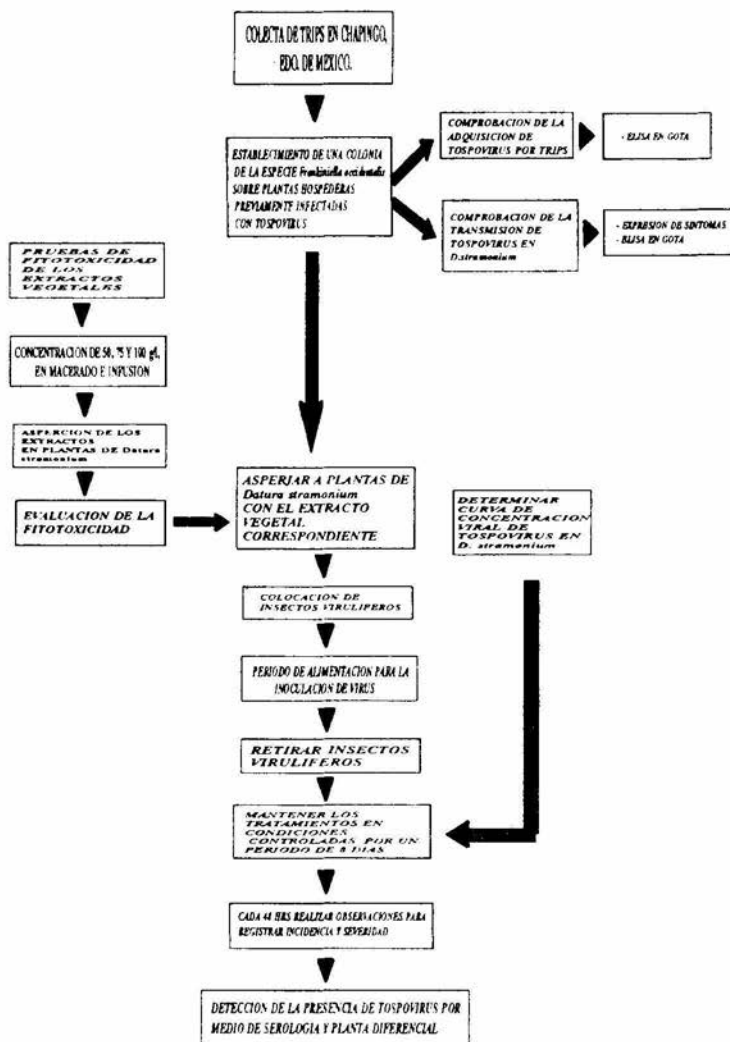


Fig. 5. Diagrama de flujo de la metodología.

diámetro) elaborada con alambre y tela de algodón que presentaba una abertura de malla menor de 2 mm. Se eligió trabajar con este tamaño de jaula debido a que cuando se intentó utilizar jaulas más pequeñas la planta al crecer dentro de ella se maltrataba debido al espacio reducido. Además la temperatura en el interior se incrementaba alrededor de 4 a 6 °C en comparación con el ambiente externo, lo cual ocasionaba que los primeros estadios larvales que permanecen en las hojas murieran por deshidratación.

En cada jaula, con su respectiva clave, se colocaron de uno a dos trips adultos con el propósito de que ovipositaran y hubiera un incremento en el número de organismos. Cuando se tuvo un número superior a 10 organismos, se procedió a colectar, de cada jaula, muestras de trips que se colocaron en viales que contenían alcohol al 70 % para su identificación.

Una vez determinado en qué jaula(s) se encontraba la especie vectora *F. occidentalis*, se transfirieron individuos con ayuda de un pincel de pelo de camello No. 5, húmedo, a otra jaula entomológica para dar inicio a la cría masiva de esta especie. Fue necesario tener una jaula entomológica amplia (100 X 100 X 100 cm) que pudiera albergar como mínimo tres plantas de cada especie hospedera que se utilizó. Esta jaula se cubrió con el mismo tipo de tela que se mencionó anteriormente, para evitar la fuga tanto de larvas como de adultos (Fig. 5).

Como una de las finalidades de esta colonia de tisanopteros era utilizarla para realizar ensayos de transmisión, a partir de este momento, en esta jaula entomológica se utilizaron plantas hospederas como frijol (*Phaseolus vulgaris* var. jamapa), calabaza (*Cucurbita pepo* var. zucchini) y toloache (*Datura stramonium*). Las dos últimas se inocularon mecánicamente con un aislamiento de Tosspovirus obtenido de plantas de crisantemo procedentes de Villa Guerrero, Edo. de México, y que se mantenía en plantas de toloache (*D. stramonium*) y chile (*Capsicum annuum* var. serrano). Para confirmar la presencia de Tosspovirus en estas fuentes utilizadas como inóculo, se procedió a realizar una prueba serológica mediante la técnica de ELISA "en gota" (Dot-immunobinding) modificada por Delgadillo (1992); ya que según Douglas (1990) tiene una alta sensibilidad para detectar este tipo de virus.

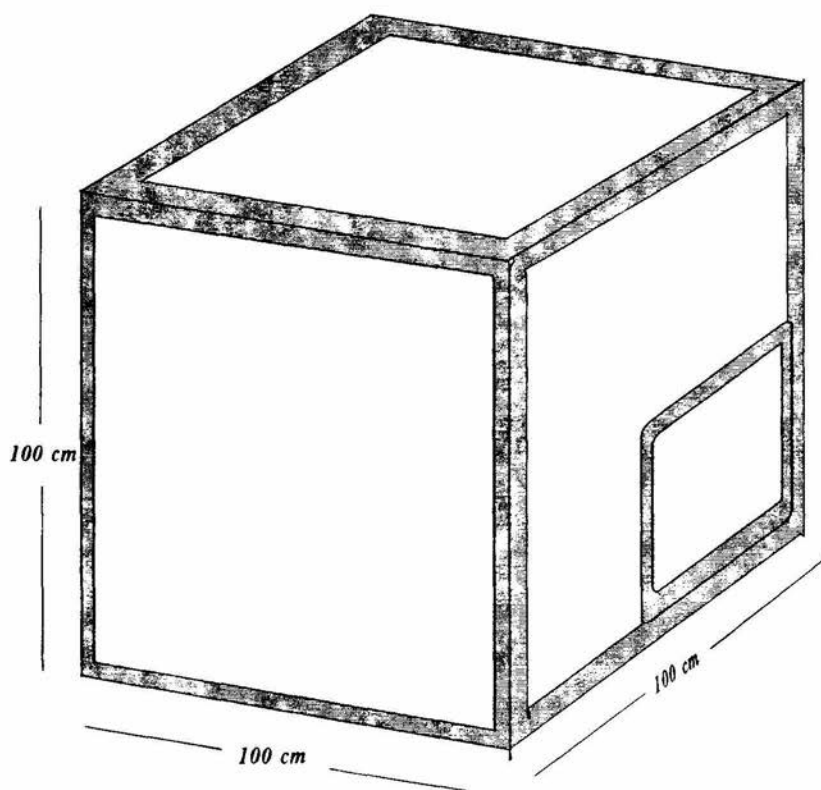


Fig. 6 Jaula utilizada para el establecimiento y cría de *Frankliniella occidentalis* en condiciones de invernadero.

Para la inoculación mecánica, hojas de toloache y chile infectados se maceraron, con ayuda de un mortero con pistilo, en solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M y 0.02 M Dieca (Dietilditiocarbaminato de sodio) pH 7.2 (Allen *et al.*, 1991), en una proporción de 1 ml de solución amortiguadora/g de tejido. Posteriormente con un isopo de algodón humedecido con inóculo se frotaron suavemente las hojas cotiledonales de cada planta (con cuatro a seis hojas verdaderas) que previamente habían sido espolvoreadas con carborundun 300 mallas. Finalmente se lavó con agua la zona inoculada.

### 3.1.2. Comprobación de la adquisición de *Tospovirus* por *F. occidentalis* P.

Una vez que la colonia de trips se alimentó sobre las plantas infectadas por un periodo de 100 días, se tomaron 200 trips y cada uno de ellos fue sometido también a serología, para comprobar si se había alcanzado un alto porcentaje de trips virulíferos. En la misma jaula donde se alimentaban y desarrollaban los trips, se introdujo un grupo de 20 plantas sanas de *Datura stramonium* con el objeto de observar la expresión de síntomas del virus y el tiempo en que tardan en aparecer. Posteriormente se tomaron muestras de cada una de estas plantas y fueron sometidas también a serología.

## 3.2. Ensayo con extractos de plantas

### 3.2.1. Material vegetal empleado

Se evaluaron los extractos vegetales de: *Allium sativum*, *Nicotiana tabacum*, *N. glauca*, *Gossypium hirsutum* (semilla), *Delphinium sp*, *Lonchocarpus sp* y *Brassica oleracea* var. *italica* (Cuadro 1). Todas, a excepción de la última, se menciona que tienen propiedades insecticidas que afectan al orden Thysanoptera (Grainge y Ahmed, 1988).

Las plantas fueron secadas en una bodega a temperatura ambiente.

Conjuntamente a estos tratamientos se probó también la cubierta epidermal Nu-Fil 17 (Dupont S.A.).



Cuadro 1. Parte vegetal utilizada para la preparación de los extractos.

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMON	PARTE UTILIZADA
<i>Allium sativum</i>	ajo	bulbo y hojas
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	brócoli	tallos e inflorescencia
<i>Delphinium</i> sp.	escuelita	tallos, hojas y flores
<i>Gossypium hirsutum</i>	algodón	semilla
<i>Lonchocarpus</i> sp.	barbasco	tallos y hojas
<i>Nicotiana glauca</i>	tabaco	tallos y hojas
<i>Nicotiana tabacum</i>	tabaco	tallos y hojas

### 3.2.2. Pruebas de fitotoxicidad de los extractos vegetales.

Los extractos se prepararon como se describe a continuación: a) Se añadió el tejido vegetal seco al momento en que hervía el agua y se dejó enfriar, a este tratamiento se le llamó té, b) el otro tratamiento se preparó en una licuadora convencional, se maceró el tejido seco durante 30 segundos. De esta manera por cada especie se tuvieron dos tratamientos: té y macerado. Los extractos se prepararon en proporciones de 50, 75 y 100 g de tejido/l de agua, se almacenaron en recipientes de vidrio con su clave o nombre correspondiente, a temperatura ambiente por 24 horas. Después se filtraron con tela de organdi para separar los sólidos y el líquido se colocó en un aspersor manual (Lagunes, 1984).

Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones y consistió en asperjar cada concentración de extracto acuoso a plantas de *D. stramonium* con 10 hojas verdaderas. Los testigos se asperjaron solo con agua. Se realizaron observaciones cada 24 horas durante siete días para registrar la posible presencia de síntomas de fitotoxicidad.

### 3.2.3. Efecto de los extractos vegetales en la transmisión de Tospovirus por trips

Se utilizó en las pruebas de transmisión plantas de la especie *D. stramonium* (con ocho a 10 hojas verdaderas) por ser un excelente hospedero para la alimentación y desarrollo de huevecillos de trips, es una especie indicadora para la expresión de síntomas del virus y además cuando se alimentan trips virulíferos sobre ellas se obtienen altas concentraciones de virus (Cho *et al*, 1991).

Individuos adultos obtenidos de la colonia de trips se transfirieron con ayuda de un pincel de pelo fino (No. 5) a cada una de las plantas sanas de *D. stramonium* previamente asperjadas con el extracto vegetal correspondiente (100g/l de agua). La misma concentración se utilizó para la cubierta epidermal Nu-film 17. Las plantas testigo se asperjaron sólo con agua. En cada planta se colocaron tres trampas en tres hojas, una en cada hoja. Las trampas (Fig. 6) fueron elaboradas con plástico de tipo mica, de forma cilíndrica de aproximadamente 2 cm de diámetro por 2 cm de alto y en la parte superior se cubrieron con tela. A cada jaula se le adhirió un broche con el propósito de poder sujetarla en la hoja, para ésto, una parte del broche tenía adherido a su vez una base de corcho de 2.5 cm<sup>2</sup>. De esta manera la trampa quedaba bien sujeta a las hojas y sin riesgo de que se escaparan los organismos al momento de colocarlos para realizar las pruebas de transmisión.

En cada trampa se colocaron tres insectos (nueve por planta) para que se alimentaran por un lapso de 24 hrs (Wikamp, 1993; Hoobs y Black, 1993). Las plantas se mantuvieron en una cámara bioclimática, a temperatura constante de 30±2°C con un fotoperiodo de 14-10 hrs (luz-obscuridad). Al cabo de este tiempo se retiraron los insectos de cada unidad experimental, teniendo cuidado de observar si se presentaban daños alimenticios sobre la superficie de la hojas que había sido cubierta por la jaula o bien muerte de los insectos.

Cada 48 hrs se hicieron observaciones para registrar el número de plantas que presentaron síntomas causados por Tospovirus (incidencia) y la expresión de síntomas (severidad). La severidad se evaluó con la siguiente escala:

0 = Sin síntomas

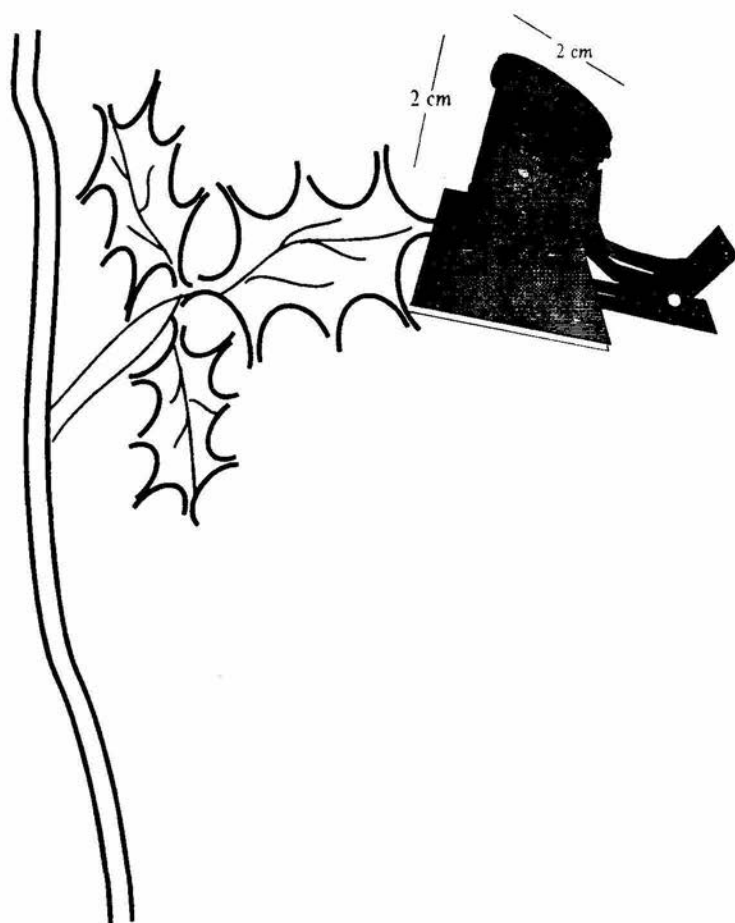
2 = Moteado y ligera clorosis en hojas apicales

- 3 = Mosaico sistémico presente en toda la planta
- 4 = Anillos concéntricos y patrones lineales cloróticos en hojas apicales con ligera deformación en hojas nuevas.
- 6 = Lesiones a manera de anillos concéntricos y patrones lineales necróticos con mosaico más acentuado en hojas apicales.
- 10 = Severa deformación en hojas apicales, presencia de anillos necróticos concéntricos en casi todas las hojas, que con el tiempo la necrosan por completo. Acortamiento de entrenudos.

El diseño experimental fue completamente al azar y cada tratamiento consistió de 10 repeticiones. Para conocer si había diferencias entre tratamientos en cuanto a incidencia y severidad, se procedió a realizar un análisis de varianza y prueba de Tukey. Los valores de severidad se transformaron a porcentajes para el análisis estadístico.

Con la finalidad de asegurar la detección de *Tospovirus* por serología en las plantas expuestas al vector, antes de establecer el experimento descrito fue necesario determinar la curva de concentración viral en *D. stramonium*. Para esto se inocularon de manera mecánica 12 plantas de *D. stramonium* (con ocho a 10 hojas verdaderas) con la fuente de inóculo anteriormente utilizada. Las plantas se mantuvieron a  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y con un fotoperiodo de 14-10 hrs (luz-obscuridad). Después de la inoculación cada dos días se tomaba una planta que serviría como inóculo, 2 g de ella se maceraban en 2 ml de sol. amortiguadora de fosfatos 0.25 M y 0.02 M Dieca, pH 7.2. La planta que se empleó como indicadora para la expresión de la infección y conteo de lesiones locales fue *Nicotiana glutinosa*, de la que se inocularon seis hojas por muestra. Estas plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero.

Después de mantener los tratamientos por un periodo de 8 días en condiciones controladas se dió por terminado el experimento y de cada planta se tomó una muestra para realizar la prueba de ELISA en "gota", para esto se tomaron las hojas donde se habían confinado los insectos virulíferos y hojas de todos los niveles de la planta (basal, medio y apical). Al mismo tiempo, una muestra de 1 g de cada planta se maceró con solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M y 0.02 M Dieca, pH 7.2 y se inoculó mecánicamente a plantas indicadoras de la especie *N. glutinosa*, cinco hojas por cada planta, para detectar la



**Fig. 7.** Jaula utilizada para pruebas de transmisión con el vector *Frankliniella occidentalis* P.

presencia o ausencia de virus mediante la expresión de lesiones locales en esta planta diferencial.

La técnica serológica se realizó de la siguiente manera: Se emplearon antisueños y positivos adquiridos en Agdia Inc. para los Virus Marchitez Manchada del Tomate (TSWV) y Mancha Necrótica del Impatiens (INSV), ya que son los únicos Tosopovirus que se han consignado en México (Verdugo, 1989; Ochoa et al, 1994).

Se maceraron de 3 a 5 g de hojas de cada planta en 3 ml de solución amortiguadora salina de fosfatos (SASF) pH 7.4. Los extractos se filtraron con tela de organdi para eliminar los restos de tejido y se dejaron reposar en tubos de vidrio por un lapso de 30 min en refrigeración.

Se lavó la membrana de nitrocelulosa (Sigma N-0139) por 1 ó 2 min en SASF pH 7.4. Después se colocó, utilizando pinzas para evitar tocarla con los dedos, sobre papel filtro y se aplicaron con una micropipeta las muestras (aproximadamente 5 microlitros): savia de cada unidad experimental (con una repetición), testigo positivo, testigo sano y SASF. La membrana se dejó secar al aire y reposar por 30 min.

En el caso de los insectos virulíferos que se analizaron, la muestra se preparó de la siguiente manera: se colocó directamente el insecto (de uno a tres organismos) sobre la membrana presionándolo sobre ella con la cabeza de un alfiler entomológico para que quedara adherido o bien, se maceró en 50 microlitros de SASF pH 7.4 (Cho *et al*, 1988) y de estos 5 microlitros se colocaron en la membrana. Después de secar, la membrana se incubó en una caja Petri con 10 ml de solución de bloqueo (SASF pH 7.4 + 3% p/v de proteína de leche descremada) durante 60 min procurando agitarla suavemente cada 15 min. Transcurrido este tiempo la membrana se lavó con agua destilada. Luego se incubó en el antisuero a una concentración 1:1000 (1 ml de sol. de bloqueo:1 microlitro de antisuero) por 60 min a temperatura ambiente.

Después se enjuagó la membrana tres veces por 5 min en solución de lavado (SASF pH 7.4 + 0.05% Tween-20). Enseguida se incubó la membrana en el conjugado de gammaglobulina anticonejo (Sigma a-0418) a una concentración 1:1000 (1 ml de sol. de bloqueo:1 microlitro de conjugado) por 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana tres veces por 5 min en sol. de lavado y un último lavado por 5 min en sol.

amortiguadora de dietanolamina 1 M pH 9.6 (5 ml de dietanolamina + 45 ml de agua destilada, ajustando el pH con ácido clorhídrico).

Finalmente se incubó la membrana en solución de revelado (18 ml de sol. amortiguadora de dietanolamina + 2 ml de NBT (P-nitro azul tetrazolio, Sigma N 6876, 1mg/ml de sol. amortiguadora de dietanolamina) + 0.2 ml de BCIP (sal de p-toluidina de fosfato de 5 bromo 4 cloro 2 inoil, Sigma B 8503, 5 ml/ml en sol. amortiguadora de dietanolamina) + 40 microlitros de cloruro de magnesio 2 M, y se colocó en la obscuridad y a temperatura ambiente durante el revelado. Se realizaron lecturas a los 15, 30 y 45 min. Por último se eliminó la solución de revelado y se lavó la membrana con agua destilada para detener la reacción. Las lecturas se realizaron en forma visual. Lo anterior se realizó para cada virus por separado.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Establecimiento de la colonia de *F. occidentalis*

Durante el desarrollo del trabajo se determinó que en condiciones de invernadero el rango óptimo de temperatura para mantener la población de tisanopteros fue de 15 a 27°C. Los trips solo se desarrollaron cuando la jaula entomológica fue amplia y contenía diferentes especies de plantas hospederas con un abundante follaje. Se determinó que el frijol (*Phaseolus vulgaris*), la calabaza (*Cucurbita pepo*) y el toloache (*D. stramonium*) fueron las plantas hospederas más adecuadas para la alimentación e incremento de la población de esta especie de tisanopteros bajo condiciones de invernadero.

### 4.2. Transmisión de Tospovirus por trips

En esta etapa del experimento, de los 200 insectos sometidos a la prueba serológica, 74 % dió reacción positiva para el Virus Marchitez Manchada del Jitomate (TSWV) y 50% para el Virus Mancha Necrótica de los Belenes (INSV).

En las plantas sanas de *D. stramonium* que se introdujeron en la jaula se observó que a partir del quinto día de estar expuestas a los trips virulíferos, sólo el 80% empezó a presentar en hojas apicales un ligero mosaico y en las demás hojas un moteado clorótico (Cuadro 2). Después de 8 a 12 días de estar expuestas a los insectos, solo el 13% de las plantas presentaron lesiones a manera de anillos concéntricos cloróticos y patrones lineales cloróticos que algunas veces se llegaron a necrosar, deformación en hojas nuevas y achaparramiento; finalmente del total de las 20 plantas expuestas a los trips virulíferos, en 4 de ellas no se observó ningún síntoma que indicara la presencia del virus. Cuando se tomaron muestras de esas mismas plantas para la prueba serológica, el 95% dió reacción positiva para el TSWV y de esos mismos solo el 70% para el INSV (Cuadro 2).

Cuadro 2. Expresión de síntomas y reacción serológica en plantas de *D. stramonium* expuestas a los trips dentro de la jaula entomológica.

PLANTA	EXPRESION DE SINTOMAS	REACCION SEROLOGICA	
		TSWV	INSV
1	-	+	-
2	1 <sup>a)</sup> y 2 <sup>b)</sup>	+	+
3	1 y 2	+	-
4	1 y 2	+	+
5	1	+	+
6	1	+	+
7	1 y 2	+	+
8	-	+	-
9	1 y 2	+	+
10	1 y 2	+	+
11	1	+	+
12	1	+	-
13	1 y 2	+	+
14	1 y 2	+	+
15	-	-	-
16	-	+	-
17	1 y 2	+	+
18	1 y 2	+	+
19	1 y 2	+	+
20	1	+	+
Porcentaje		95	70

- a) A partir del quinto día presencia de un ligero mosaico en hojas apicales. En las demás se presenta un moteado clorótico.
- b) Con el transcurso del tiempo los síntomas que se presentaron fueron lesiones a manera de anillos concéntricos cloróticos y patrones lineales cloróticos que se necrosaron, deformación de hojas nuevas y achaparramiento.

#### 4.3. Fitotoxicidad de los extractos vegetales

A una concentración de 50g de tejido vegetal/litro de agua, tanto en infusión como macerado, con excepción de *Allium sativum*, ninguna de las especies de plantas probadas provocó efecto fitotóxico en las plantas de *D. stramonium* (Cuadro 3).



Cuadro 3. Porcentaje de plantas con síntomas de fitotoxicidad inducidos por los extractos vegetales (infusión o macerado) a diferentes concentraciones.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION g/l	% DE PLANTAS CON DAÑOS	
		INFUSION	MACERADO
<b>Gossypium sp.</b>	50	0	0
	75	0	0
	100	0	40
<b>Allium sativum</b>	50	20	20
	75	20	0
	100	60	40
<b>Lonchocarpus sp.</b>	50	0	0
	75	0	0
	100	0	0
<b>Nicotiana tabacum</b>	50	0	0
	75	0	20
	100	40	20
<b>Brassica oleracea</b> var. <i>italica</i>	50	0	0
	75	20	0
	100	20	20
<b>Delphinium sp.</b>	50	0	0
	75	20	20
	100	20	20
<b>Nicotiana glauca</b>	50	0	0
	75	20	20
	100	20	20

Exceptuando a *Lonchocarpus sp.* que no presentó efecto fitotóxico a concentración de 75 y 100 g/l en ninguna de las dos formas de extracto, se observó de manera general, que en todas las demás especies, de un 20 a 40% de las plantas tratadas mostraron síntomas de fitotoxicidad independientemente que se tratara de infusión o macerado. El daño fitotóxico consistió principalmente de un ligero necrosamiento en las puntas de las hojas o en todo el

márgen y en algunas ocasiones se presentaron pequeñas manchas cloróticas que se tornaron café y luego se secaron. Sin embargo las plantas crecieron normalmente no mostrando diferencias en comparación con los testigos. Con base en esto fue que se optó por trabajar con la mayor concentración probada (100 g/l), ya que de esta manera se tenían más posibilidades de detectar algún efecto en la transmisión de Tospovirus por trips.

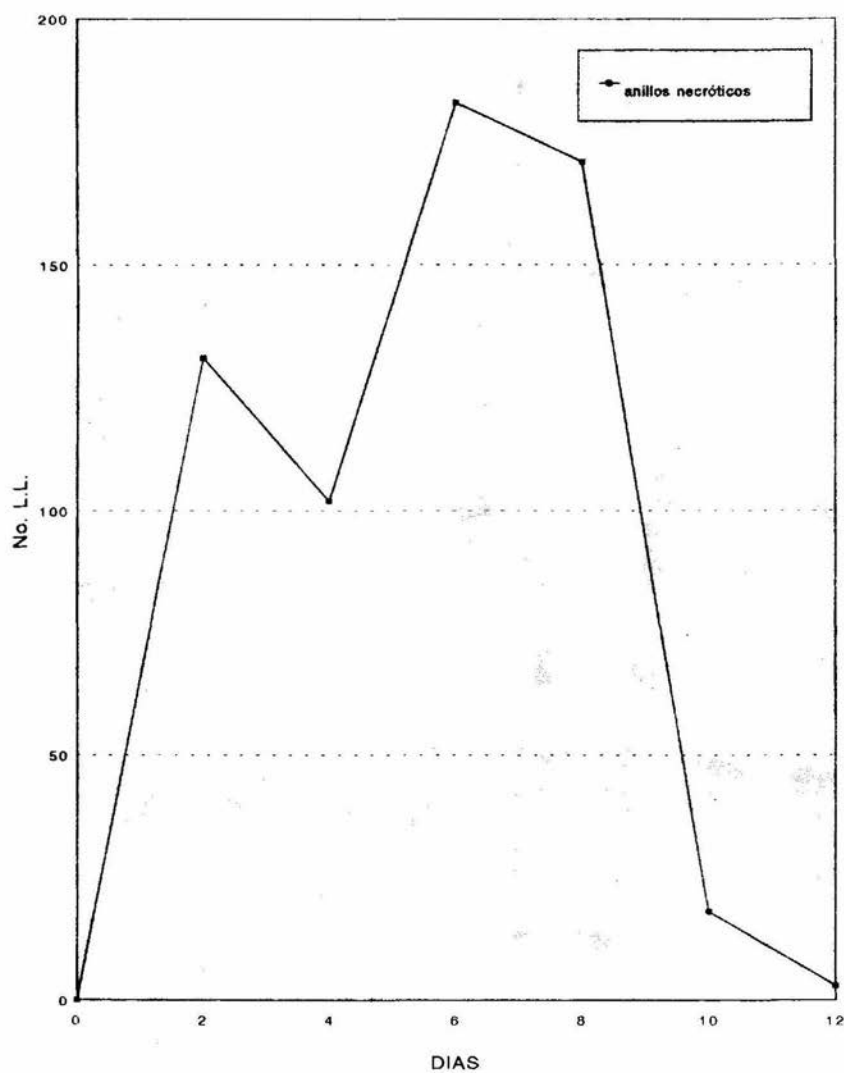
### 5.3. Curva de concentración viral en *D. stramonium*

Se observó que la máxima concentración de virus se presentó entre el 5º y 9º día posteriores a la inoculación, según lo indicó la presencia de lesiones locales en plantas de *Nicotiana glutinosa* (Fig. 8). A los 12 días posteriores a la inoculación ya no se presentaron lesiones en la planta indicadora *N. glutinosa*.

### 5.4. Efecto de los extractos vegetales en la transmisión de Tospovirus por trips

Los resultados del efecto de los tratamientos en la incidencia y severidad de los síntomas inducidos por Tospovirus en plantas de *D. stramonium* se presentan en el Cuadro 4. El tratamiento con *Delphinium sp.* en forma de macerado, bajo las condiciones de nuestro ensayo, presentó la menor incidencia (30%) de plantas con síntomas, mostrando así una reducción significativa en la transmisión de Tospovirus por trips en un 70% con respecto al testigo. El resto de los tratamientos con excepción de *Gossypium hirsutum* e infusión de *A. sativum* y *Lonchocarpus sp.*, mostraron reducción en la incidencia de 10 a 50%, no obstante, éstas no fueron estadísticamente significativas (Fig. 9).

En cuanto a severidad se encontró nuevamente que los tratamientos con *Delphinium sp.* fueron los que presentaron menor porcentaje de severidad (14 y 18%) no difiriendo estadísticamente con los tratamientos con la cubierta epidermal Nu-film 17, *Nicotiana tabacum*, *N. glauca* (infusión), *Brassica oleracea* (macerado), *Lonchocarpus sp.* (macerado) y *Gossypium hirsutum* (macerado) los cuales presentaron de 26 a 34% de severidad. Las plantas de *D. stramonium* asperjadas con los tratamientos en infusión de *G. hirsutum*,



**Fig.8.** Curva de concentración viral obtenida con base a el número de lesiones contadas en *Nicotiana glutinosa*, inoculada con savia de *Datura stramonium* obtenida a diferentes tiempos posteriores a su inoculación mecánica con *Tospovirus*.

Cuadro 4. Efecto de los tratamientos en la incidencia (%) de plantas con síntomas de *Tospovirus* y severidad (%). Daños alimenticios y muerte de insectos detectados posteriormente a las pruebas de transmisión. Y comprobación de la presencia de *Tospovirus* mediante serología y lesiones locales en planta indicadora.

TRATAMIENTO	EXTRACTO	INCIDENCIA (%)	SEVERIDAD	SEROLOGIA <sup>a</sup>		LESIONES EN <i>N. glutinosa</i> <sup>b</sup>	INSECTOS MUERTOS <sup>c</sup>	DAÑOS POR INSECTOS <sup>d</sup>
				TSWV	INSV			
<i>Gossypium hirsutum</i>	infusión	100 A	36 AB	10/10	0/10	10/10	0	2.4
	macerado	100 A	28 B	10/10	0/10	9/10	0	3
<i>Allium sativum</i>	infusión	100 A	48 AB	10/10	3/10	8/10	3	2.6
	macerado	90 AB	34 B	10/10	2/10	9/10	1	2.5
<i>Lonchocarpus sp.</i>	Infusión	100 A	46 AB	7/10	0/10	10/10	0	3
	macerado	70 AB	30 B	9/10	0/10	10/10	0	2.1
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	infusión	80 AB	34 B	9/10	0/10	4/10	1	2.2
	macerado	60 AB	28 B	6/10	0/10	6/10	0	2.3
<i>Nicotiana glauca</i>	infusión	70 AB	30 B	7/10	3/10	9/10	1	1.9
	macerado	90 AB	46 AB	9/10	0/10	10/10	1	1.8
<i>Nicotiana tabacum</i>	infusión	60 AB	26 B	9/10	5/10	9/10	1	1.6
	macerado	60 AB	28 B	6/10	1/10	7/10	1	2.8
<i>Delphinium sp.</i>	infusión	60 AB	18 B	5/10	0/10	10/10	3	6.5
	macerado	30 B	14 B	8/10	2/10	9/10	1	1.1
Nu-film 17	agua	50 AB	28 B	5/10	3/10	8/10	0	3
TESTIGO	agua	100 A	70 A	10/10	1/10	10/10	0	3

- a) Número de plantas, de un total de 10, dónde se detectó el virus.  
 b) Número de plantas, de un total de 10, que dieron lesiones locales (se inocularon tres hojas por planta).  
 c) De un total de 90 trips virulíferos utilizados en cada tratamiento.  
 d) Promedio de las observaciones realizadas en 30 jaulas por tratamiento.  
 Tratamientos seguidos por la misma letra son estadísticamente similares (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

*Lonchocarpus sp.*, *Allium sativum* y macerado de *Nicotiana glauca* mostraron de 36 a 48% de severidad de síntomas inducidos por *Tospovirus* (Fig. 10).

Con la técnica serológica de "gota" se encontró que sólo en los tratamientos de *G. hirsutum* e infusión de *A. sativum* todas las plantas de *D. stramonium* dieron reacción positiva para el TSWV. Del mismo modo, en los tratamientos *B. oleracea* (macerado), *N. glauca*, *N. tabacum* (macerado) y Nu-film 17, hubo completa correspondencia entre el número de plantas con síntomas y el número de plantas que dieron reacción positiva para el TSWV. En el caso de *Delphinium sp.* (macerado) se encontró que el porcentaje de

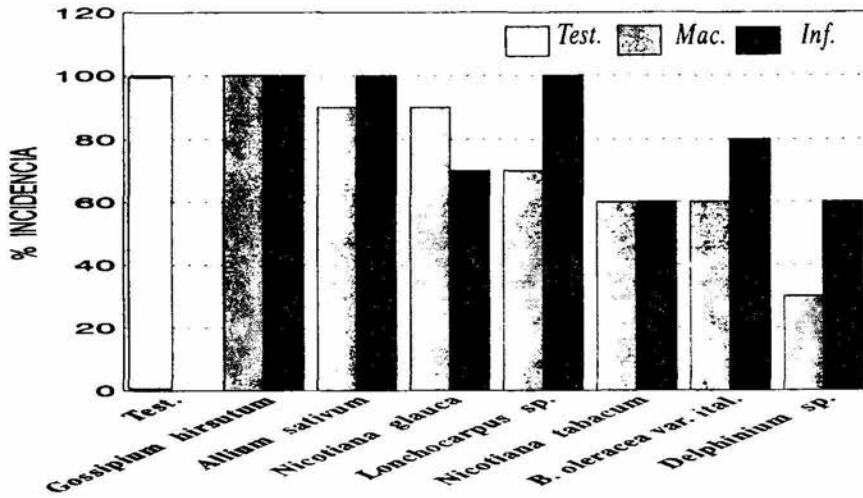


Fig.9. Efecto de los tratamientos en la incidencia, inducidos por Tospovirus en plantas de *Datura stramonium*.

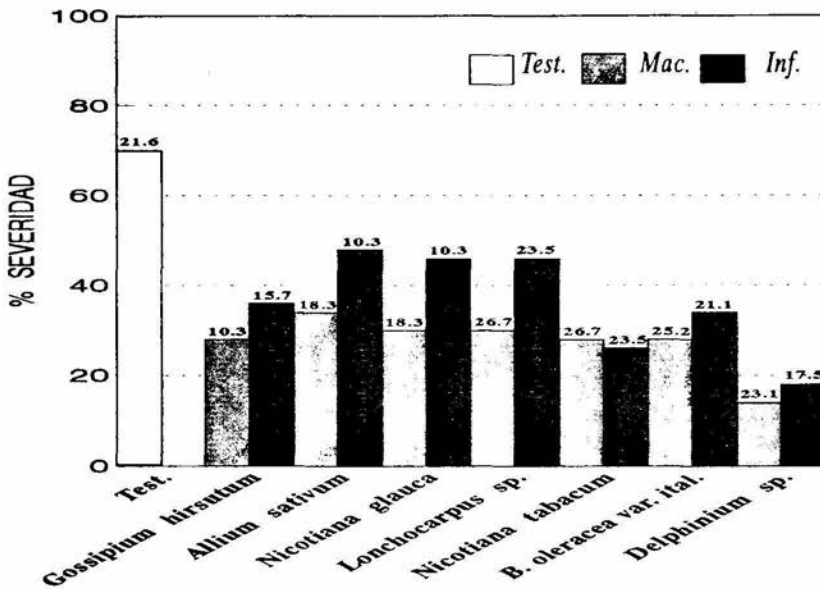


Fig.10. Efecto de los tratamientos en la severidad de los síntomas inducidos por Tospovirus en plantas de *Datura stramonium* (se muestran valores de  $\sigma$  en cada tratamiento).

incidencia (30%) no concordó con el número de plantas que dieron reacción positiva (ocho de 10) (Cuadro 4). Lo mismo sucedió con los tratamientos macerado e infusión de *Lonchocarpus sp.* e infusión de *B. oleracea*, en donde se tuvieron incidencias de 70, 100 y 80%, respectivamente, y por serología 9, 7 y 9 plantas de 10 dieron reacción positiva al TSWV, respectivamente. Por otro lado la presencia del Virus de la Mancha Necrótica de los Belenes solo se detectó en seis tratamientos pero en un número reducido de plantas (Cuadro 4).

Con excepción de los tratamientos *B. oleracea* var. *italica*, *Delphinium sp.* (infusión) y Nu-film 17, en todos los demás hubo una estrecha relación (correspondencia) entre el número de plantas que dieron reacción positiva para el TSWV mediante serología y el número de plantas en el que se detectó el virus mediante la presencia de lesiones locales en planta indicadora.

Ningún extracto tuvo acción insecticida ya que de 90 trips utilizados por cada tratamiento para probar su posible eficacia en impedir la transmisión de virus por este vector, sólo se encontró en promedio de uno a tres insectos muertos (Cuadro 4).

En cuanto a los daños alimenticios que se encontraron debido al periodo de alimentación de 24 hrs a que estuvieron expuestas las plantas de *D. stramonium* a los trips virulíferos, se observó, al momento de retirar las jaulas donde estaban confinados éstos, que solo las plantas asperjadas con los extractos de *Delphinium sp.* presentaron menos daños alimenticios con respecto a los demás tratamientos (Cuadro 4). Y coincidentemente fueron las plantas que menor incidencia de la enfermedad presentaron en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 4).

## 5. DISCUSION

Los trips solamente se desarrollaron cuando la jaula entomológica fue amplia y contenía plantas hospederas con abundante follaje, ya que ésto permitió mantener un microambiente más estable que favoreció la reproducción y por ende el rápido incremento de la población de trips.

En el presente estudio se observó que para lograr el establecimiento de la colonia de *F. occidentalis* fue necesario mantenerla en un rango de temperatura de 15 a 27°C; debido a que al aumentar la temperatura y disminuir la humedad relativa a menos de un 50% se favorecía la proliferación de ácaros que afectaban la fuente de alimento de la colonia. Además se encontró que un gran número de trips adultos se mantenían bajo estas condiciones de temperatura. Se tiene conocimiento que la temperatura umbral mínima de desarrollo para esta especie es de 10°C (Lowry *et al*, 1992) y que una temperatura elevada (entre los 27 y 30 °C) favorece su reproducción obteniéndose una mayor progenie (Robb *et al*, 1989).

El frijol y la calabaza fueron hospederos adecuados en estas condiciones, ya que los adultos prefirieron estas plantas para ovipositar y por consiguiente se logró el desarrollo de una gran cantidad de larvas. Por otro lado, estas plantas son hospederos naturales que toleran el daño alimenticio que ocasionan los trips. El toloache (*D. stramonium*), además de tener las características anteriores, es un hospedero del virus que al presentar infección sistémica constituyó una fuente adecuada de inóculo para la adquisición de Tospovirus por parte de los trips; aunado a esto, en *D. stramonium* la distribución de células infectadas es más uniforme y por lo tanto se tiene una alta probabilidad de que el virus sea adquirido por las larvas debido a la ingestión de una gran cantidad de partículas virales (Francki y Grivell, 1970).

La reacción positiva, para ambos virus, obtenida en la muestra de insectos provenientes de esta colonia, indicó que el trips adquirió tanto el Virus de la Marchitez Manchada del Jitomate como el Virus de la Mancha Necrótica de los Belenes; se ha

mencionado que *F. occidentalis* es la única especie que adquiere y transmite a ambos virus (Hunter et al, 1995). Lo anterior sugiere que en la fuente original de inóculo (plantas de crisantemo) venían mezclados ambos Tospovirus. Los insectos adquirieron en un mayor porcentaje (74%) al TSWV comparado con el INSV (50%).

Las plantas sanas de *D. stramonium* empezaron a manifestar lesiones a manera de anillos concéntricos y patrones lineales cloróticos a necróticos, mosaico y deformación de hojas apicales a partir del octavo día de estar expuestas a los trips virulíferos (Cuadro 2). En estas plantas se comprobó la presencia de Tospovirus por medio de serología, encontrándose que el TSWV se presentó en un mayor número de plantas (95%) en comparación con el INSV (70%) (Cuadro 2).

Los extractos vegetales, con excepción de los tratamientos con *G. hirsutum* e infusión de *A. sativum* y *Lonchocarpus sp.*, en mayor o menor grado redujeron la incidencia de plantas enfermas; no obstante, sólo la reducción (70%) obtenida con el macerado de *Delphinium sp.* fue estadísticamente significativa. En el caso de la infusión de esta misma planta se encontró que no causó una disminución significativa con respecto a los demás tratamientos, sugiriendo que la alta temperatura pudo haber interferido con su actividad. De manera similar, Rodríguez (1986) al evaluar la actividad tóxica de plantas de diferentes especies del género *Cestrum spp.*, en forma de infusión y macerado, contra larvas del mosquito casero *Culex quinquefasciatus*, encontró que solamente los macerados resultaron tóxicos contra estadios larvales y en ninguna especie la infusión fue tóxica.

También fue evidente que en todos los tratamientos, independientemente que se tratara de infusión o macerado, se presentó una reducción en la severidad de síntomas desde un 32% (infusión de *A. sativum*) hasta un 80% (*Delphinium sp.*) en las plantas de *D. stramonium* asperjadas con ellos, sin que en general hubiese aparentemente una disminución de los daños alimenticios ni muerte de trips (Cuadro 4). Esto indica que los extractos en sí no presentaron propiedades antialimentarias, repelentes ni insecticidas. Los insectos no murieron aún cuando estuvieron en contacto directo con los extractos vegetales de *N. tabacum* y *N. glauca* que poseen alcaloides tóxicos, como la nicotina y la anabasina o neonicotina, utilizados como insecticidas de



contacto para el combate de trips, áfidos, minadores, palomilla del manzano y mosquita blanca, entre otros (Richardson, 1934; Smith, 1935; McGregor, 1944; Lagunes *et al*, 1984).

El que no haya habido en general una reducción significativa en la incidencia pero sí en la severidad y el que no se haya observado una disminución de los daños alimenticios, sugiere que los extractos más que interferir en la alimentación, probablemente modificaron el tipo de alimentación asociado con la transmisión de virus. A este respecto German y colaboradores (1992) mencionan que la inoculación de Tospovirus ocurre más fácilmente durante las pruebas de alimentación del insecto que son breves y superficiales y las cuales están asociadas con la salivación y descarga del virus por los trips; en estas pruebas el daño que se presenta es mínimo, no observándose heridas causadas por la alimentación del insecto y por lo tanto el daño en las células no es letal. En cambio, las pruebas de alimentación asociadas con la ingestión del contenido celular ocurren con lapsos de tiempo más largos y sin salivación y consecuentemente sin descarga del virus, la célula muere dando como resultado una lesión evidente y característica; de este modo al presentarse más células dañadas disminuye la oportunidad de que se lleve a cabo el proceso infeccioso. En nuestro ensayo probablemente el segundo tipo de alimentación prevaleció, afectando el progreso de la infección debido a que pudo haber sido mínima la transmisión de partículas virales que se llevó a cabo durante la alimentación del insecto. Esta falta de relación entre transmisión del virus y daños alimenticios por el insecto, ha sido también consignada por otros investigadores; por ejemplo Allen y colaboradores (1993) al evaluar el efecto de aceites hortícolas, observaron una reducción de 46 a 73% en la transmisión del TSWV por trips sin que hubiese una aparente reducción de los daños alimenticios. Otras posibles explicaciones a esta falta de relación entre transmisión y daño alimenticio, es que el extracto haya directamente inactivado al virus o que el extracto haya interferido de alguna manera con el progreso de la infección. Esto último fue también previamente sugerido por Peters y Lebbink (1975), al trabajar con el Virus Mosaico del Tabaco, y por Allen (citado por Allen *et al*, 1993), con el TSWV, quienes encontraron que la aplicación de aceites resultó en una disminución significativa del

número de lesiones locales, independientemente de que los aceites se aplicaran antes o después de realizar la inoculación mecánica del virus.

Con respecto a la detección de Tospovirus por serología se encontró que al analizar la plantas de *D. stramonium* asperjadas con los tratamientos para las pruebas de transmisión, en la mayoría de ellos el porcentaje de incidencia que se registró (considerando la expresión de síntomas típicos de Tospovirus) coincidió con el porcentaje de plantas que dieron reacción serológica positiva a Tospovirus. Sin embargo, en el caso de los macerados de *Lonchocarpus sp.* y *Delphinium sp.*, y la infusión de *N. tabacum* se presentó un número menor de plantas con síntomas que no coincidió con el número de plantas en que se detectó el virus por ELISA; ésto sugiere que las plantas que no manifestaron síntomas eran portadoras de virus y por lo tanto se infiere que hubo transmisión del virus por el trips. Pensamos que el extracto al modificar de algún modo el tipo de alimentación o al interferir con el progreso de la infección, y la variabilidad genética existente en la misma especie hospedante (que se puede manifestar por una respuesta diferente a la infección), impidió que la expresión de síntomas se diera (registrándose por lo tanto una baja incidencia) aún cuando las plantas portaban al virus como lo indicó la prueba serológica y la presencia de lesiones locales en la planta indicadora *N. glutinosa* (Cuadro 4). La reacción positiva dada por estas plantas asintomáticas pudo haber correspondido a las partículas virales que dejó el trips al alimentarse; cabe recordar que la muestra tomada de cada planta de *D. stramonium* tratada incluyó las tres hojas en las que se colocaron las jaulas con los trips; tales partículas por alguna razón (según lo discutido con anterioridad) no se multiplicaron y/o no se trasladaron al resto de la planta, no manifestando síntomas inducidos por Tospovirus. En los demás casos donde se observó un menor número de plantas que dieron reacción positiva al TSWV y que no corresponde al observado en la incidencia, pudo deberse a errores al momento de realizar la técnica serológica, puesto que las pruebas con planta indicadora dieron resultados positivos.

Respecto a la detección de Tospovirus por medio de planta indicadora encontramos que a pesar de que no existió una relación estrecha entre los resultados obtenidos con este método y aquellos obtenidos con ELISA, resultó de manera general

un método complementario para detectar Tospovirus.

El haber detectado con mayor frecuencia al Virus de la Marchitez Manchada del Jitomate en las pruebas serológicas sugiere que este virus fue más fácilmente adquirido y transmitido por los trips. En oposición a nuestros resultados, Hunter y colaboradores (1995) al desarrollar una técnica "in vitro" para la adquisición de Tospovirus por *F. occidentalis*, encontraron que el Virus Mancha Necrótica de los Belenes fue adquirido en una proporción significativamente mayor que el TSWV. Por otro lado se menciona que *F. occidentalis* es un vector eficiente para transmitir ambos virus; sin embargo, se tiene conocimiento que *D. stramonium* no es un hospedero ideal para el INSV (Law y Moyer, 1990) y que este virus se encuentra preferentemente asociado a especies ornamentales (Davis *et al*, 1990). Esto explicaría en parte el porque la presencia del TSWV fue más frecuente en esta solanácea.

## 6. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, se tiene lo siguiente:

- 1) En condiciones de invernadero la colonia del insecto vector *Frankliniella occidentalis* se estableció en un rango de temperatura de 15 a 27°C y en una jaula entomológica amplia conteniendo plantas de frijol, calabaza y toloache.
- 2) Los insectos adquirieron y transmitieron en un mayor porcentaje el Virus Marchitez Manchada del Jitomate (TSWV) en un 74 y 95%, respectivamente, en comparación con el Virus Mancha Necrótico de los Belenes (INSV) con 50% en la adquisición y 70% en la transmisión.
- 3) La aspersión de plantas de *Datura stramonium* con el macerado de *Delphinium sp.* redujo significativamente la incidencia y la severidad de síntomas inducidos por Tospovirus en un 70 y 80%, respectivamente, en comparación con el testigo.

## 7. LITERATURA CITADA

- Acosta L. R. y Delgadillo S. F. 1989. Ecología de insectos vectores de virus en plantas cultivadas. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 111 p.
- Allen W. R. and Broadbent A. T. 1986. Transmission of Tomato Spotted Wilt Virus in Ontario greenhouses by the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). Can. J. Plant. Pathol. 8: 33-38.
- Allen W. R. and Matteoni A. J. 1991. Petunia as an indicator plant for use by growers to monitor for thrips carrying the Tomato Spotted Wilt Virus in greenhouses. Plant Dis. 75: 78-82.
- Allen W. R., Matteoni A. J. and Broadbent B. A. 1991. Factors relating to epidemiology and symptomatology in florist's Chrysanthemum infected with the Tomato Spotted Wilt Virus. pp 28-46. In: Hsu H. T. and Lawson R. H. (Eds). Virus-thrips-plant interaction of Tomato Spotted Wilt Virus. Proc. USDA Workshop, US Dep. Agric. Res. Serv. ARS-87. Beltsville, Maryland.
- Allen W. R., Tehrani B. and Luft R. 1993. Effect of horticultural oil, insecticidal soap, and film forming products on the western flower thrips and the Tomato Spotted Wilt Virus. Plant Dis. 77: 915-918.
- Amin P. W. and Reddy D. V. 1981. Transmision of Tomato Spotted Wilt Virus, causal agent of bud necrosis of peanut, by *Scirtothrips dorsalis* and *Frankliniella schultzei*. Plant Dis. 65: 663-665.
- Arenas L. C. 1984. Extractos acuosos y polvos vegetales con propiedades insecticidas: Una alternativa por explotar. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 161 p.
- Asher K. R. S. and Gsell R. 1981. The effect of neem seed kernel extract on *Epilachna varivestis* Muls., larvae. Zeit chrfit fur Pflanzenkrankheiten un Pflanzenschutz. 88: 764-767.
- Bald J. G. and Samuel G. 1931. Investigation on "spotted wilt" of tomatoes. Aust. Commonw. Council. Sci. Ind. Res. Bull. No 54.
- Bentley M. D., Leonard D.E., Reynolds E. K., Leach S., Beck A. B. and Murakoshi I. 1984a. Lupine alkaloids as larval feeding deterrents for spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 77: 398-400.

- Bentley M. D., Leonard D. E., Stoddard W. F. and Zalkow L. H. 1984b. Pyrrolizidine alkaloids as larval feeding deterrents for spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 7: 393-397.
- Best R. J. 1968. Tomato Spotted Wilt Virus. *Adv. Virus. Res.* 13: 65-146.
- Best R. J. and Gallus H. P. C. 1953. Strains of Tomato Spotted Wilt Virus. *Aust. J. Sci.* 15: 212-214.
- Bond W P., Whitam A. K. and Black L L. 1983. Indigenous weeds as reservoirs of tomato spotted wilt in Louisiana. (Abstr). *Phytopathology* 73: 499.
- Brewer G. J. and Ball H. J. 1981. A feeding deterrent affect of water extract of tansy (*Tanacetum vulgare* L., Compositae) on three lepidopterus larvae. *J. Kansas. Entomol. Soc.* 54: 733-736.
- Brittlebank C. C. 1919. Tomato diseases. *J. Agric. Victoria.* 17:231-235.
- Campbell F. L. and Sullivan W. N. 1933. The relative toxicity of nicotine, anabasine, methyl anabasine and lupine for Culicine mosquito larvae. *J. Econ. Entomol.* 26: 500-509.
- Carter W. 1973. Ecological aspects of plant virus transmission. In: *Insects in relation to plant diseases.* Second edition. John Wiley and Sons. (Eds). Capítulo 14. pp 759.
- Cervantes M. F. 1992. Insectos chupadores que afectan a Hortalizas. pp 1-3. En: *Manejo fitosanitario de las hortalizas en México.* Anaya R. S., Bautista M. N. y Domínguez R. B. (Eds). Centro de Entomología y Acarología. Chapingo. Edo de México.
- Chisholm I. F. and Lewis. T. 1984. A new look at thrips (Thysanoptera) mouthparts, their action and effects of feeding on plant tissue. *Bull. Entomol. Res.* 74: 663-675.
- Cho J. J., Mau R. F. L., German T. L., Hartmann R.W. and Yudin L. S. 1989. A multidisciplinary approach for Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) management in Hawaii. *Plant Dis.* 73: 375-383.
- Cho J. J., Mau R. F. L., Gonsalves D. and Mitchell W. C. 1986. Reservoir weed hosts of Tomato Spotted Wilt Virus. *Plant Dis.* 70: 1014-1017.
- Cho J. J., Mau R.F.L., Hamasaki R. T. and Gonsalves D. 1988. Detection of Tomato Spotted Wilt Virus in individual thrips by Enzyme-linked Immunosorbent-Assay. *Phytopathology* 78: 1348-1352.

- Cho J. J., Mau R.F.L., Ullman E. D. and Custer M. D. 1991. Detection of the Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) within thrips. pp 144-153. In: Hsu H. T. and Lawson R. H. (Eds.). 1991. Virus-thrips-plant interaction of Tomato Spotted Wilt Virus. Proc. USDA Workshop, US Dep. Agric. Res. Serv. ARS-87. Beltsville, Maryland
- Cho J. J. and Mitchell W. C. 1984. Ecology and epidemiology of tomato spotted wilt (TSWV) and its vector, *Frankliniella occidentalis*. (abstr) *Phytopathology* 74: 866.
- Chowdhury A. K. and Saha K. N. 1985. Inhibition of Urd bean leaf crinkle virus by different plant extracts. *Indian Phytopathol.* 38: 566-568.
- Cremlyn R. 1978. Pesticides: Preparation and mode of action. John Wiley and Sons U. K. pp 39-49.
- Cotton R. T. 1979. Silos y graneros, plagas y desinfestación. Oikos-Tau, S.A. Barcelona, España. 328 p.
- Davidson W. M. 1930. The relative value as contact insecticides of some constituents of *Derris sp.* *J. Econ. Entomol.* 23: 877-879.
- Davis R. F., DeHerrera V., González L. and Sutula C. 1990. Use of strain-specific monoclonal and polyclonal antibodies to detect two serotypes of Tomato Spotted Wilt Virus. pp. 153-161. In: Hsu H. T. and Lawson R. H. (Eds.). 1991. Virus-thrips-plant interaction of Tomato Spotted Wilt Virus. Proc. USDA Workshop, US Dep. Agric. Res. Serv. ARS-87. Beltsville, Maryland
- De Avila A. C., de Haan P., Kormelink R., Resende R. de O., Goldbach R. W. and Peters D. 1993. Classification of Tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *J. Gen. Virol.* 74: 153-159.
- De Haan P., Kromelink R. and Resende R. de O., Van Poelwijk K. F., Peters D. and Holdbach R. 1991. Tomato Spotted Wilt Virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 72: 2207-2016.
- De Haan. P., Wagemakers L., Peters D., Golbach R. 1989. Molecular cloning and terminal sequence determination of the S and M RNA of Tomato Spotted Wilt Virus. *J. Gen. Virol.* 70: 3469-3473.
- Delgadillo S. F. 1992. Detección serológica de virus fitopatógenos en áfidos vectores. pp 91-98. En: Peña Matínez M. R. Identificación de áfidos de importancia agrícola. en Urias M. R. y Alejandre A. T. (eds.). *Afidos como vectores de virus en México.* CEFIT-CP. Vol. I.
- Douglas J. R. and German L. T. 1990. Dot blot detection of Tomato Spotted Wilt Virus RNA in plant and thrips tissues by cDNA clones. *Plant Dis.* 74: 274-276.

- Duggar B. M. and Armstrong J. K. 1925. The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juices of various plants. *Ann. Missouri Botan. Garden.* 12: 359.
- Elbadry E. A., AboElghar M. R. and Radwan H. S. 1971. Laboratory cage studies on the effect of the antifeed compound Du-Ter on the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* Bois. (Lep:Noctuidae). *Entomol Abstr.* 3: 5042.
- Finlay K. W. 1953. Inheritance of spotted wilt resistance in the tomato. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. *Aust. J. Biol. Sci.* 6: 153-163.
- Francki R. I. B. and Grivell C. J. 1970. An electron microscope study of the distribution of Tomato Spotted Wilt Virus in systemically infected *Datura stramonium* leaves. *Virology* 42: 969-978.
- Francki R. I. B. and Hatta. T. 1981. Tomato Spotted Wilt Virus. pp 492-511. In: Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis. Kurstak E. (Ed). Elsevier/North Hollan Biomedical Press.
- Gardner M. W. 1935. Spotted wilt of truck crops and ornamental plants. *Phytopathology* 25: 17.
- Grainge. M. and Ahmed S. 1988. Handbook of plants with pest-control propierties. Wiley-Interscience Publication. U.S.A. 470 p.
- Gildow F. E. 1982. Coated-vesicle transport of luteoviruses through salivary glands of *Myzus persicae*. *Phytopathology* 72: 1289-1296.
- German T. L., Ullman D. E. And Moyer J. W. 1992. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationship. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 315-348.
- Greenough D. R., Black L. L. and Bond W. P. 1990. Aluminum-surfaced mulch: An approach to the control of Tomato Spotted Wilt Virus in solanaceous crops. *Plant Dis.* 74: 805-808.
- Greenough D. R., Black L. L. and Storny R. N. 1985. Ocurrance of *Frankliniella occidentalis* in Louisiana: A possible cause for the increased incidence of Tomato Spotted Wilt Virus. *Phytopathology* (abstr.) 75: 1362.
- Golob. P. and Webley D.J. 1980. The use of plants and minerales as traditional protectants of stores products. Tropical Prdo. Institute. London. 120 p.
- Gunther F. A. y Jeppson L. R. 1975. Insecticidas modernos y la producción mundial de alimentos. CECSA. México. pp 201-225.



- Hall T. F., Breeland S. G. and Anderson P. K. 1969. Use of chery-laurel foliage for preparation of effective insect killing of *Prunus carolineata*. Amer. Entomol. Soc. Amm. 62: 241-244.
- Heal E. R. and Starnes O. 1950. A survey of plants for insecticidal activity. Lloydia 13: 89-100.
- Hernández J. E. y Benderly A. 1982. Nuevos conceptos químicos de los plaguicidas. Ciencia y Desarrollo. CONACYT. 47: 52-63.
- Hernández M. B. 1989. Métodos para el muestreo de insectos vectores. pp 11. En: Ecología de insectos vectores de virus en plantas cultivadas. Acosta L. R. y Delgadillos S. F. (Eds). Colegio de Postgraduados, Montecillos, Edo. de México.
- Hoobs A. H. and Black L. L. 1993. Transmission of Tomato Spotted Wilt Virus from pepper and three weed hosts by *Frankliniella fusca*. Plant Dis. 77: 797-799.
- Hunter W. B., Hsu H. T. and Lawson R. H. 1995. A novel method for Tosspovirus acquisition by thrips. Phytopathology 85: 480-483.
- Hunter W. B. and Ullman D. E. 1989. Analysis of mouthpart movements during feeding of *Frankliniella occidentalis* Pergande. and *F. schultzei* Trybom (Thysanoptera:Thripidae). Int. J. Morphol. Embryol. 18: 161-171.
- Hutchinson J. and Dalziel J. M. 1954. Flora of west tropical Africa. Vol. 1. 2ª Ed. Milbank, London. pp 530-531.
- Ie T. S. 1970. Tomato Spotted Wilt Virus. CMI/AAB Plant Virus Descrip. No. 39.
- Iwaki M., Honda Y., Hanada K., Tochiara H. and Yanaha T. 1984. Silver mottle disease of watermelon caused by Tomato Spotted Wilt Virus. Plant Dis. 68: 1006-1008.
- Jacobson M. 1975. Insecticides from plants, a review of the literature, 1954-1971. In: Agricultural Handbook. ARS-USDA. 4: 86-87.
- Judd G. J. R. and Borden J. H. 1980. Oviposition deterrents for *Aedes aegypti* in extracts of *lemna minor*. J. Entomol. Soc. Brit. Columbia. 77: 30-33.
- Jones R. K. and Baker J. R. 1991. TSWV: Syntoms, host range and spread. pp 89-94. In: Hsu H. T. and Lawson R. H. (Eds). Virus-thrips-plant interaction of Tomato Spotted Wilt Virus. Proc. USDA Workshop, US Dep. Agric, Agric. Res. Serv. ARS-87. Beltsville, Maryland.
- kato N., Shibayama M., Takahashi M. and Munakata H. 1972. Antifeeding active substances for insects in *Clerodendron tricotinum* Thumb. (Verbenaceae). Agric. Biol. Chem. 36: 2579-2582.

- Kimberley A. S. and Snelton M. A. 1988. Influence of variety on abundance and within-plant distribution of onion thrips (Thysanoptera: Thripidae) on cabbage. *J. Econ. Entomol.* 81: 1190-1195.
- King S.B.A. and Saunders L. J. 1984. Las plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central. Administración de Desarrollo Extranjero (ODA). Londres. pp 140-145.
- Kormelink R., De Haan P., Meurs C., Peters D. and Goldbach R. 1992. The nucleotide sequence of the M RNA segment of Tomato Spotted Wilt Virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *J. Gen. Virol.* 73: 2795-2804.
- Kormelink R., Kitajama E. W., De Haan P., Zuidema D., Peters D. and Goldbach R. 1991. The non-structural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of Tomato Spotted Wilt Virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. *Virology.* 181: 459-468.
- Kuntz J. E. and Walker J. C. 1947. Virus inhibition by extracts of spinach. *Phytopathology* 37: 561-579.
- Lagunes T. A. 1984. Empleo de sustancias vegetales contra plagas de maíz como una alternativa al uso de insecticidas en áreas de temporal. Informe del proyecto PROAF-CONACYT:PCAFBNA-001299. CONACYT-CP-UACH-INIA-DGSV. México. 162 p.
- Lagunes T. A., Arenas L. y Rodríguez H. 1984. Extractos acuosos y polvos vegetales con propiedades insecticidas. CONACYT-CP-UACH-INIA-DGSV. Ed. Futura. Mexico. 203 p.
- Law M. D., Speck J. and Moyer J. W. 1992. The M RNA of impatiens necrotic spot Tosspovirus (Bunyaviridae) has an ambisense genomic organizations. *Virology.* 188: 732-741.
- Lewis J. S. 1968. The thrips, or Thysanoptera of Illinois. *Illi. Nat. His. Surv. Bull.* 29: 215-225.
- Lewis T. 1973. Thrips: their biology, ecology and economic importance. Academic Press. London and New York. pp 37-57.
- Lim W. L. and Hagerdon D. J. 1977. Bimodal transmission of plant viruses. pp 237-251. In: Aphids as virus vectors. Harris. K. F. and Maramorosch. K. (Eds). Academic Press. New York.

- Linford M. B. 1932. Transmission of the Pineapple Yellow Spot Virus by *Thrips tabaci*. *Phytopathology* 22: 301-324.
- Lowry V. K., Smith J. W. Jr. and Mitchell F. L. 1992. Life-fertility tables for *Frankliniella fusca* (Hinds) and *F. occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera:Thripidae) on peanut. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85: 744-752.
- Mackenzie D. J. and Ellis P. J. 1992. Resistance to Tomato Spotted Wilt Virus infection in transgenic tobacco expressing the viral nucleocapsid gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* 5: 34-40.
- Malik M. M. and Mujtaba N. H. 1984. Screening of some indigenous plants as repellents or antifeedants for stored grain insects. *J. Stored. Prod. Res.* 20: 41-44.
- Martínez P. S. 1983. Búsqueda de plantas medicinales con propiedades insecticidas contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Potsgraduados, Chapingo, Edo. de México. 140 p.
- Matthews R. E. F. 1991. *Plant virology*. Academic Press, Inc. 3<sup>a</sup> ed. New York. 835 p.
- Mau R. F. L., Bautista R., Cho J.J., Ullman D. E., Gusukuma-Minuto L. and Custer D. 1991. Factors affecting the epidemiology of TSWV in field crops: Comparative virus acquisition efficiency of vectors and suitability of alternate host to *Frankliniella occidentalis* (Pergande). pp. 21-28. In: Hsu H. T. and Lawson R. H. (Eds). *Virus-thrips-plant interaction of Tomato Spotted Wilt Virus*. Proc. USDA Workshop. US Dep. Agric, Agric. Res. Serv. ARS-87.
- McGregor E. A. 1944. Toxicity of anabasine to the citrus thrips. *J. Econ. Entomol.* 37: 78-80.
- McLaughlin J. L., Freedman B., Powell R. G. and Smith C. R. 1980. Nerii folin and 2-acetylnerriofolin: insecticidal and cytotoxic agents of *Thevetia thevetioides* seeds. *J. Econ. Entomol.* 73: 398-402.
- Meisner J., Weissenberg M., Palevitch D. and Aharonson N. 1981. Phago deterrency induced by leaves and leaf extracts of *Catharanthus roseus* in the larva of *Spodoptera littoralis*. *J. Econ. Entomol.* 74: 131-135.
- Metcalf R. L. and Wilson C. E. 1945. The residual toxicity of the pyrethrins to *Anopheles quadrimaculatus*: Preliminary Studies. *J. Econ. Entomol.* 38: 499.
- Mohamed N. A., Randles J. W. and Francki R. I. B. 1973. Protein composition of Tomato Spotted Wilt Virus. *Virology.* 56: 12-21.

- Montes B. R., Pérez P. R., García G. J. y Arce G. F. 1993. Avances en la evaluación de extractos vegetales acuosos para el control del "chino del jitomate". Memorias XX Congreso Nacional de Fitopatología. Zacatecas, Zac. México. pp 25.
- Morán P. J. 1985. Evaluaciones del efecto de extractos vegetales de cinco plantas del Noreste de México en larvas del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* Smith. (Lepidoptera: Nuctuidae). Tesis licenciatura. Instituto Tecnológico y de Estudios Avanzados de Monterrey, N.L. México. 86 p.
- Moron M. A. 1988. Entomología práctica. Instituto de Ecología. UNAM. México. pp 117-123.
- Mound L. A. 1971. The feeding apparatus of thrips. Bull. Entomol. Res. 60: 547-548.
- Mound L. A. and Pitkin B. R. 1972. Microscopic whole mounts of thrips (Thysanoptera). Entomologist's Gazette. 23: 121-125.
- Munger F. 1942. A method for rearing citrus thrips in the laboratory. J. Econ. Entomol. 35: 373-375.
- Murty S. N. and Nagarajan K. 1986. Role of plant extracts in the control of TMV infection in nursery and field-grown tobacco. Phytopathology 39: 98-100.
- Nashed M. O. 1981. The effect of crude extracts of *Allium sativum* L. on feeding and metamorphosis of *Epilachna varivestis* Muls. (Coleoptera: Coccinellidae). Z. fur Entomologie. 92: 464-471.
- Ochoa M. D. L., Zavaleta-Mejía, E., Herrera A., Johansen N. R., Cardenas S. E. y Lozoya S. H. 1994. Tospovirus asociados al crisantemo y efecto del empleo de esqueje sano, acolchado y cubiertas flotantes en la producción e incidencia de la enfermedad en Villa Guerrero, Edo. de México. Memorias del IV Congreso Nacional de Horticultura Ornamental. Univ. Autónoma de Chapigo, Edo. de México. pp 50.
- Paliwal Y. C. 1976. Some characteristics of the thrips-vector relationship of Tomato Spotted Wilt Virus in Canada. Can. J. Bot. 54: 402-405.
- Paliwal Y. C. 1979. Some properties and thrips transmission of the Tomato Spotted Wilt Virus in Canada. Can. J. Bot. 52: 1170-1182.
- Pandey B. P. and Mohan J. 1986. Inhibition of turnip mosaic virus by plant extracts. Indian Phytopathol. 39: 489-491.
- Paulus O. A. 1988. Resistencia o tolerancia de las plantas a enfermedades virósas y el control mediante el uso de aspersiones con aceites y acolchados. Segundo taller sobre enfermedades de Hortalizas. México-EEUU. Culiacán, Sin. México.

- Peters D. and Lebbink G. 1975. The inhibitory action of mineral oil on the number of local lesions on *Nicotiana glutinosa* L. leaves inoculated with tobacco mosaic virus. *Virology* 65: 574-578.
- Pirone T. P. and Harris, K. F. 1977. Nonpersistent transmission of plant viruses by aphids. *Ann. Rev. Phytopathology* 15: 55-73.
- Pittman H. A. 1927. Spotted wilt of tomatoes. Preliminary note concerning the transmission of the "spotted wilt" of tomatoes by an insect vector (*Thrips tabaci* Lind.). *J. Counc. Sci. Ind. Res.* 1: 74-77.
- Powel C. C. and Lindquist K. R. 1992. Ball pest and disease manual. Ball Publishing. USA. pp 136-149.
- Quintanilla H. R. 1980. Trips: características morfológicas y biológicas. Especies de mayor importancia biológica. Hemisferio Sur S.A. México. 60 p.
- Rajendran B. and Gopalan M. 1979. Note on the insecticidal properties of certain plant extracts. *Indian J. Agric. Sci.* 49: 295-297.
- Razvyazkina G. M. 1953. The importance of the tobacco thrips in the development of outbreaks of tip chlorosis of Makhorka. *Dokl. Vses. Akad. Skh Nauk.* 18: 27-31.
- Richardson H. H. 1934. Studies of Derris, Nicotine, Paris Green, and other poisons in combination with molasses in the control of the Gladiolus thrips. *J. Agr. Res.* 49: 359-373.
- Riquelme I. J. 1910. La conchuela del frijol, *Epilachna corrupta*. Estación Agrícola Central. México. Folleto s/n. 11 p.
- Robb K. L., Parella M. P. and Newman J. L. 1988. The biology and control of the western flower thrips. *Ohio Florist Assoc. Bull.* 699: 215
- Rocha P. M. y González G. R. 1985. Temas en virología. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Montecillos, Edo de México. 134 p.
- Rocha P. M. 1988. Temas en virología. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Montecillos, Edo de México. pp. 77-95.
- Rodríguez H. C. 1982. Búsqueda de plantas nativas del Edo. de México con propiedades tóxicas contra gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda* Smith) y mosquito casero (*Culex quinquefasciatus* Say). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. México. pp 36-38.

- Ronald K. J. and Baker R. J. 1991. TSWV: symptoms, host range and spread. pp 89-94. In: Hsu H. T., Lawson R. H. (Eds). Virus-thrips-plant interaction of Tomato Spotted Wilt Virus. Proc. USDA, Workshop, US Dep. Agric. Res. Ser., ARS-87. Beltsville, Maryland.
- Safro U. I. 1919. The strenght of nicotine solutions. J. Econ. Entomol. 12: 349-351.
- Sakimura K. 1940a. *Thrips nigropilosus* Uzel, a non vector of the Yellow Spot Virus. J. Econ. Entomol. 32: 833.
- Sakimura K. 1940b. Evidence for the identity of the Yellow Spot Virus with the Spot Wilt Virus: Experiments with vectos, *Thrips tabaci*. Phytopathology 30: 281-299.
- Sakimura K. 1946. Two species of thrips non-vectors of the Spotted Wilt Virus. J. Econ. Entomol. 39: 398.
- Sakimura K. 1956. *Kurtomathrips morrilli*, a non-vector of the spotted wilt virus, with notes on *Liothrips urichi*. J. Econ. Entomol. 49: 562.
- Sakimura K. 1961. Techniques for handling thrips in transmission experiments with the Tomato Spotted Wilt Virus. Plant Dis. Rep. 45: 766-771.
- Sakimura K. 1962. The present status of thrips-borne viruses. pp. 30-40. In: Biological transmission of disease agents. Maramorosch, K. (Ed). New York, Academic.
- Sakimura K. 1963. *Frankliniella fusca*, an additional vector for the Tomato Spotted Wilt Virus, with notes on *Thrips tabaci*, another vector. Phytopathology 53: 412-415.
- Sakimura K. 1969. A comment on the color forms of *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera:Thripidae) in relation to transmission of the Tomato Spotted Wilt Virus. Pac. Insects 11: 761-762.
- Samuel G., Bald J. G. and Pittman H. A. 1930. Investigations on spotted wilt of tomatoes. Aust. Counc. Sci. Ind. Res. Bull. pp. 44-64.
- Smith C. R. 1935. Ocurrance of anabasine in *Nicotiana glauca* Grah. (Solanaceae) Amer. Chem. Soc. Jour. 57: 959-960.
- Smith P. G. 1944. Reaction of *Lycopersicum spp.* to spotted wilt. Phytopathology 34: 504-505.
- Smolensky J. S. 1972. Alkaloid screening. Sec. I., Lloydia 35: 1-33.
- Smolensky J. S. 1975. Alkaloid Screening. Sec. VIII. Lloydia 38: 497-513.

- Stein U. and Parella M. P. 1985. Seed extract shows promise in leafminer control. *Cal. Agric.* 39: 19-20.
- Stell G. D. R. and Torrie H. James. 1988. *Biostatística: principios y procedimientos*. 2ª ed. McGraw-Hill. México, D. F. 622 p.
- Stobbs L. W., Broadbent A. B. and Allen W. R. 1992. Transmission of Tomato Spotted Wilt Virus by the western flower thrips to weeds and native plants in Southern Ontario. *Plant Dis.* 76: 23-29.
- Swenson K. G. 1967. Plant virus transmission by insects. In: *Methods in virology*. Maramorosch, K. and Koprowski, H. (Eds). Vol I. Academic Press. New York. 640 p.
- Tass P. W. L., Boerjan M. L. and Peters D. 1977. The structural proteins of Tomato Spotted Wilt Virus. *J. Gen. Vir.* 36: 267-279.
- Ullman D. E. and Cho J. J. 1992. A midgut barrier to Tomato Spotted Wilt Virus acquisition by adult western flower thrips. *Phytopathology* 82: 1333-1342.
- Ullman D. E., Westcot M. D., Hunter W. B. and Mau R. F. L. 1989. Internal anatomy and morphology of *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera:Thripidae) with special reference to interactions between thrips and Tomato Spotted Wilt Virus. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 18: 289-310.
- Urban A. L., Huang Y. P. and Moyer W. J. 1991. Cytoplasmic inclusions in cells infected with isolates of L an I serogroups of Tomato Spotted Wilt Virus. *Phytopathology* 81:525-529.
- Van den Hurk J., Tass P. W. L. and Peters D. 1977. The ribonucleic acid of Tomato Spotted Wilt Virus. *J. Gen. Virol.* 36: 81-91.
- Vélez L. E. 1974. *Notas del curso de parasiticidas agrícolas*. Depto. de Parasitología Agrícola, Esc. Nac. Agric. Chapingo, Edo. de México. 397 p.
- Verdugo G. F. 1989. Etiología de una nueva enfermedad del tomate en Sinaloa. *Memorias XVI Congr. Nal. de Fitopatología*. Montecillos, Edo. de México. pp. 14.
- Verma H. N. and Prasad V. 1988. Metabolic alterations associated with host mediated systemic antiviral resistance. *Indian Phytopathol.* 41: 332-335.
- Voller A. and Bartlett A. 1976. The detection of viruses by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *J. Gen. Virol.* 33: 165-67.

- Walkey D. G. A. 1985. Virus transmission by biological means in applied plant virology. Heineman, London. 120 p.
- Webb R. E., Hinebaugh M. A., Lindquist R. K. and Jacobson M. 1983. Evaluation of aqueous solution of neem seed extract against *Liriomyza sativae* and *L. trifolii* (Diptera:Agromyzidae). J. Econ. Entomol. 76: 357-362.
- William D.J.K. 1985. Pollen-feeding and the host speceficity and fecundity of flower thrips (Thysanoptera). Ecol. Entomol. 10:281-289.
- Zalkow L. H., Gordon M. M. and Lanir N. 1979. Antifeedants from rayless goldenrod and oil of pennyroyal: toxic effects for the fall armyworm. J. Econ. Entomol. 72: 812-815.



**APENDICE I****1.- Solución amortiguadora salina de fosfatos (SASF).**

8.00 g	Nacl
0.20 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
1.25 g	$\text{Na}_2\text{PO}_4$
aforar a:	1000ml
pH	7.4

**2.- Solución amortiguadora de fosfatos-DIECA (dietilditiocarbaminato de sodio  
0.02 M**

3.00 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
4.34 g	$\text{K}_2\text{HPO}_4$
4.34 g	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
5.62 G	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NNaS}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
aforar a:	1000ml
pH	7.2

## A P E N D I C E II

Cuadro 1. Análisis de varianza de la incidencia de los tratamientos con los extractos vegetales (en macerado e infusión) probados en *Datura stramonium*.

FUENTE DE VARIACION	GL	SC	Fc	Pr
Tratamiento	15	6.74375000	2.98	0.0004
Error	144	21.70000000		
Total	159	28.44375000		

Cuadro 2. Análisis de varianza de la severidad de los tratamientos con los extractos vegetales (en infusión y macerado) probados en *Datura stramonium*.

FUENTE DE VARIACION	GL	SC	Fc	Pr
Tratamiento	15	26800.0000000	3.92	0.0001
Error	144	65640.0000000		
Total	159	92440.0000000		