

## Determinación de Géneros y Especies Virales que se encuentran afectando a las Cucurbitáceas en la Zona de Pedro Carbo, Provincia del Guayas

L. Espinoza\*<sup>(1)</sup>, M. Jama<sup>(1)</sup>, R. Álvarez<sup>(1)</sup>; J. Paredes<sup>(1)</sup>; E.L. Peralta<sup>(1)</sup>

(1)Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Campus “Gustavo Galindo Velasco” La Prosperina Km. 30.5 vía Perimetral

\*ldespino@espol.edu.ec; lis\_737@hotmail.com

### Resumen

*La falta de métodos de diagnóstico de enfermedades, monitoreo y control de poblaciones de insectos, además de la deficiente calidad del material de siembra, han permitido que las enfermedades de tipo viral se diseminen en una gran variedad de cultivos como es el caso de las cucurbitáceas. El objetivo de este trabajo fue identificar los principales géneros y especies virales que actualmente atacan a las plantaciones de melón, sandía y pepino en el cantón Pedro Carbo de la provincia del Guayas y sus posibles vectores. Se recolectó material vegetal con síntomas compatibles a los de enfermedades virales, a partir del cual se inocularon plantas indicadoras, se prepararon suspensiones semipurificadas que fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión mediante tinción negativa y se realizaron pruebas inmunoquímicas con diagnosticadores comerciales (AGDIA). Se recolectaron áfidos presentes en los campos muestreados y se identificaron. Los principales síntomas en campo fueron mosaico, moteado clorótico, amarillamiento y arrugamiento o “blistering” en las hojas; deformación de hojas y frutos y marcada disminución del crecimiento en plantas jóvenes. La obtención de lesiones locales en las plantas de *Chenopodium quinoa* inoculadas y las manchas cloróticas observadas en *Solanum nigrum*, fueron algunos de los síntomas de mayor valor diagnóstico; además, se realizó la reproducción experimental de síntomas en plántulas de melón, observándose luego de 10 días síntomas similares a los apreciados en campo. En las preparaciones semipurificadas se observó la presencia de partículas virales circulares de 28 a 30nm de diámetro y partículas filamentosas flexuosas de 600 a 900 nm de longitud. Los resultados de las pruebas inmunoenzimáticas (ELISA), junto a los resultados anteriores, permitieron la identificación de tres géneros virales: Comovirus, Cucumovirus y Potyvirus. De las especies virales identificadas hasta el momento, el virus del mosaico de la calabaza (SqMV) constituye el primer registro para el Ecuador. Se detectó infecciones mixtas en el 16% y el 11% de las plantas de sandía y melón evaluadas, respectivamente. Las especies de áfidos identificadas hasta el presente son *Myzus persicae* y *Aphis gossypii*. De forma adicional, se evaluó el porcentaje de transmisibilidad del virus por medio de semillas, obteniendo un 57% del total de plantas germinadas con presencia de síntomas virales relacionados con el virus del mosaico de la calabaza (SqMV).*

**Palabras claves:** Diagnóstico viral; Potyvirus, Comovirus, Pedro Carbo.

### Abstract

*The lack of methods for diagnosing diseases, monitoring and control of insect populations, besides the poor quality of planting material, have allowed such viral diseases spread in a wide variety of crops as cucurbits. The aim of this study was to identify major viral genera and species currently attacking plantations melon, watermelon and cucumber at Pedro Carbo in the province of Guayas and its possible vectors. Plants with symptoms related to viral disease was collected, from which were inoculated indicator plants were prepared semipurified suspensions that were observed in transmission electron microscope by negative staining and immunochemical tests performed with commercial diagnosticians (AGDIA ). Aphids present in the sampled fields were collected and identified. The main symptoms on field were mosaic, chlorotic mottling, yellowing and blistering in the leaves, distortion of leaves and fruits, a marked decrease in growth in young plants and reduction of the production. Obtaining local lesions in plants of *Chenopodium quinoa* and chlorotic spots observed in *Solanum nigrum* were some symptoms with greater diagnostic value, besides experimental reproduction of symptoms were performed in small plants of melon, observing after 10 days the same symptoms found on field. In semipurified preparations showed the presence of viral particles round of 28 to 30nm in diameter and flexuous filamentous particles of 600 to 900 nm of length. The test results linked immunoassay (ELISA), together with previous results allowed identification of three viral genera: Comovirus, Cucumovirus and Potyvirus. Viral species identified so far, the Squash mosaic virus (SqMV) which is the first report in Ecuador. Mixed infections were detected in 16% and 11% of watermelon and melon plants, respectively. The aphid species identified at the moment are *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. Additionally we evaluated the percentage of transmissibility of the virus through seed, obtaining a 57% of all plants germinated with the presence of symptoms related with Squash mosaic virus (SqMV)*

**Key words:** Diagnosis; Potyvirus; Comovirus; Pedro Carbo.

## 1. Introducción

A nivel mundial es reconocida la gravedad de los daños ocasionados en los cultivos a causa de enfermedades virales, en especial las emergentes y reemergentes, que han venido incrementándose durante la última década (Peralta, 2008). Latinoamérica no está al margen de estos problemas. En países como en México las pérdidas por virosis en los cultivos de cucurbitáceas pueden llegar a más del 80% (Guerrero et al., 2008).

En Ecuador, la producción de cultivos de ciclo corto en los que se incluye a las cucurbitáceas, es desarrollada en su mayor parte para consumo interno, siendo los pequeños productores quienes están a cargo de esta actividad. La falta de inversión en esta área ha traído como consecuencia una notable baja en la producción de estos vegetales. Un ejemplo es el caso del pepino, que en el año 1994 alcanzó producciones de más de 2400 toneladas, mientras que para el año 2002 esta cifra bajó a tan solo 500Tm (Troya et al., 2005).

En las últimas décadas se han reportado alrededor de 35 especies de virus diferentes que están afectando a los cultivos de cucurbitáceas en todo el mundo (Mnrai-Hattab et al., 2009), mientras que en Ecuador en el año 2007 se reportó la presencia de enfermedades de tipo viral que afectaron varios cultivos de la provincia de Manabí, produciendo pérdidas de 8 millones de dólares aproximadamente (El Diario, 2007). En el 2009, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INAP) identificó para dicha zona la presencia del virus anillado de la papaya (PRSV) y se indicó la posibilidad de la existencia de infecciones mixtas en cucurbitáceas (DiCYT, 2009).

Según estas premisas el objetivo de este trabajo fue identificar las principales familias virales que se encuentran afectando a los cultivos de cucurbitáceas en la zona de Pedro Carbo, provincia de Guayas, y determinar los posibles insectos vectores de los mismos.

Éste es el primer paso para poder determinar la afectación e incidencia de este tipo de enfermedades y obtener resultados relacionados con su transmisión, distribución y posibilidades de control.

## 2. Materiales y métodos

*Recolección de muestras y descripción de síntomas:* Se inspeccionaron fincas de las localidades de Valle de la Virgen, Cascajal, Bachillero y Toquilla ubicadas en el cantón Pedro Carbo, provincia de Guayas, dedicadas a la producción de melón, pepino y sandía. Se recolectaron muestras de diferentes órganos vegetales con síntomas compatibles con enfermedades virales. Todas las muestras fueron refrigeradas para su traslado. Además, se atraparon insectos como moscas blancas y pulgones presentes en los sembríos, los cuales

fueron almacenados en frascos de vidrio para su posterior identificación.

*Pruebas serológicas:* Se realizaron pruebas serológicas haciendo uso de la técnica ELISA-DAS (*Enzyme-linked immunosorbant assay, double antibody sandwich*), siguiendo las indicaciones detalladas por el fabricante (AGDIA). Se utilizaron los juegos de reactivos SRA44700 Reagent set CMV, SRA26400 Reagent set SqMV, ECA61500 Reagent set WSMoV & GBNV y PSA27200 Reagent set Potyvirus. Las lecturas fueron realizadas en un lector de ELISA Sunrise (TECAN), a 405 nm. Se estableció el límite de positividad o “cut-off” como dos veces la media de los controles negativos incluidos en cada placa.

*Inoculación en plantas indicadoras y reproducción de síntomas:* Con parte del material obtenido de campo se procedió a realizar una maceración del tejido vegetal con solución fosfato tamponada en relación 1:3 p/v, a la que se le agregó tierra diatomea; seguidamente se inocularon plantas de las siguientes especies: *campanilla (Datura arborea)*, *hierba mora (Solanum nigrum)*, *tabaco (Nicotiana tabacum var. White Burley)*, *tomate (Solanum lycopersicum)*. Con el mismo material se infectaron plantas de melón (*Cucumis melo*) y pepino (*Cucumis sativa*) para tratar de reproducir los síntomas observados en campo. Las plantas inoculadas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero, realizando las evaluaciones de síntomas cada tres días hasta 15 días luego de la inoculación.

*Evaluación de la transmisibilidad por semilla:* Debido a que en el campo el uso de semillas no certificadas o “recicladas” es una práctica común entre los agricultores, se decidió establecer un ensayo para determinar el porcentaje de infección en semillas de melón. De los frutos recolectados en la zona de muestreo se tomaron 150 semillas que fueron colocadas en bandejas de germinación con substrato BM2, para luego de 15 días realizar un conteo de las plantas con presencia de síntomas virales y estimar un porcentaje de semillas infectadas (Morales, 1987).

*Obtención de semipurificaciones virales:* Las semipurificaciones fueron realizadas a partir de cinco gramos de material vegetal fresco. Una vez macerado el tejido en tampón fosfato 0.1M, pH 7,4 (1:5, p/v), se realizó una clarificación con 50% del volumen total de cloroformo-butanol, que fue centrifugada a 15000 rpm (centrifuga Eppendorf) por 20 min. Luego de coleccionar la fase acuosa, se procedió a la precipitación por adición de polietilenglicol (PEG 6000, 8%) y 0.04% de NaCl. El precipitado obtenido mediante centrifugación a 8000 rpm por 10 min, fue secado y resuspendido en tampón fosfato 0,01M, realizando finalmente una centrifugación a 5000 rpm de 2 a 5 min y la recolección del sobrenadante.

Las suspensiones semipurificadas obtenidas fueron evaluadas mediante ELISA-DAS y microscopía electrónica.

**Microscopía electrónica:** A partir de extractos puros de hojas infectadas y de las suspensiones semipurificadas obtenidas, se realizaron preparaciones por tinción negativa (Roberts, 1986) con el objetivo de detectar las estructuras virales presentes. Adicionalmente, a partir de secciones de tejido foliar fresco, se realizaron preparaciones para corte e inclusión (Bozzola y Russel, 1999). Todas las observaciones fueron realizadas en el microscopio electrónico de transmisión JEOL del INH (Instituto Nacional de Higiene).

**Identificación de insectos:** Los insectos recolectados fueron identificados por sus características morfológicas, haciendo uso de las claves taxonómicas (Bustillo *et al.*, 1977), por lo que se realizó un proceso de aclaramiento de los especímenes mediante una perforación en la parte ventral del abdomen de cada uno de los especímenes, luego se colocó los áfidos en baño maría con alcohol al 95% a punto de ebullición por dos minutos, se decantó el alcohol y se agregó hidróxido de potasio (KOH) al 10%, se realizó otro baño maría por tres minutos, luego se decantó el hidróxido de potasio y se lavó los especímenes de cinco a seis veces con agua destilada. Posteriormente se los colocó con ácido acético glacial por dos minutos más y se procedió a lavar. Una vez limpios del ácido acético se le adicionó unas gotas de aceite de clavo por 20 o 30 minutos, los áfidos fueron transferidos a un portaobjetos con una gota de aceite de Canadá, se mojó con Xileno el cubre objetos y se colocó el insecto, luego se lo dejó secar en un horno a 50°C por una semana.

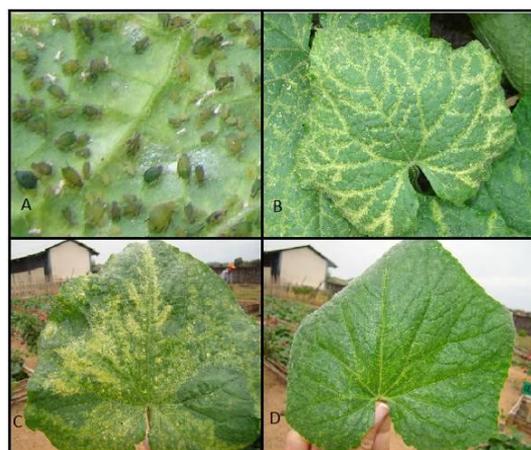
### 3. Resultados

**Sintomatología encontrada en campo:** Los síntomas más frecuentemente observados en el cultivo de melón fueron clorosis, moteado, oscurecimiento de las nerviaciones (“vein banding”), deformación y ampollamiento (“blistering”) de la lámina foliar y maduración irregular del fruto (Figura 1). Esta sintomatología fue observada en un 90% de incidencia en los campos.



**Figura 1.** Sintomatología encontrada en plantas de melón en campo **A.** Bandedo de las venas “Vein banding” en hoja de melón. **B.** Variación de coloración en fruto. **C.** Ampollamiento de hojas “blistering” **D.** Hoja con malformación, clorosis y bandedo.

En el cultivo de pepino se observó una variedad de síntomas, desde leves moteados cloróticos en las hojas hasta deformación de la lámina foliar, clorosis de las nervaduras (“vein clearing”). Además, se pudo apreciar la existencia de colonias de áfidos en el envés de las hojas y moscas blancas (Figura 2). Por otra parte, mediante evaluación visual se determinó el 70% de incidencia con estos síntomas.



**Figura 2.** **A.** Colonias de áfidos. **B.** Clorosis marcada de las nerviaciones (“vein clearing”) en hojas de pepino. **C.** Deformación y mosaico. **D.** Ligera clorosis en las nervaduras.

En el cultivo de sandía se apreció fuerte moteado en las hojas, filiformidad además un abarquillamiento hacia arriba de las hojas; en otras plantas se observó clorosis marginal. Por otra parte en malezas que bordeaban el cultivo se encontró una gran cantidad de trips no identificados, tal como se presenta en la Figura 3.



**Figura 3.** A. Clorosis marginal B. Hoja con moteado C. Acartuchamiento hacia arriba D. Trips presentes en el cultivo.

*Pruebas serológicas:* Mediante la aplicación de ELISA-DAS se pudo determinar la presencia de

especies virales como el virus del mosaico del pepino (CMV) y el virus del mosaico de la calabaza (SqMV); además, se obtuvieron resultados positivos al emplear diagnosticadores para la detección genérica de Potyvirus. En ninguna de las muestras evaluadas se encontró la presencia de los Tospovirus del marchitamiento manchado del tomate (TSWV) y el moteado plateado de la sandía (WSMoV).

En la tabla 1 se observan los resultados obtenidos para cada uno de los especies de cucurbitáceas evaluadas. En el caso del melón, se evaluaron 56 muestras de las cuales seis mostraron valores positivos para CMV, 23 para SqMV y cuatro para Potyvirus; además, del total de las muestras positivas, el 18% presentaron infecciones mixtas. En las muestras de pepino se estudiaron 32 muestras, 11 de las cuales resultaron positivas para CMV y cuatro para SqMV. De las 31 muestras de sandía evaluadas, nueve se encontraron infectadas por CMV y en 16 se detectó la presencia de Potyvirus; el 20% de las muestras identificadas como positivas, mostró infecciones mixtas entre CMV y Potyvirus. En la tabla se muestran los rangos mínimos y máximos de los lecturas ( $UDO_{405\text{ nm}}$ ) obtenidos en las pruebas .

**Tabla 1.** Resultados de las pruebas de ELISA realizadas en material vegetal fresco.

Especie evaluada	Total de plantas analizadas	CMV	SqMV	WSMoV	TSWV	Potyvirus	Negativas	Mixtas
Melón	56	6	23	0	0	4	29	2 CMV + SqMV + Potyvirus 4 SqMV + Poty
Pepino	32	11	4	0	0	N.E	17	0
Sandía	31	9	0	0	0	16	11	5 CMV + Potyvirus

$UDO_{405\text{ nm}}$  controles positivos: 0,9 - 2,5nm

$UDO_{405\text{ nm}}$  controles negativos: 0,12 - 0,25nm

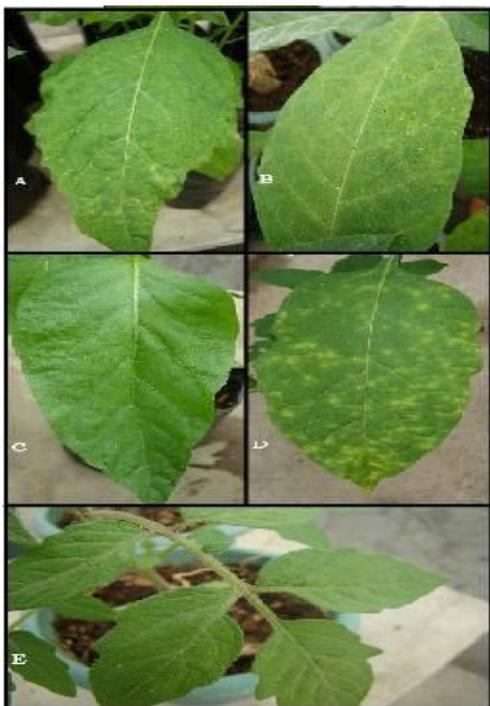
$UDO_{405\text{ nm}}$  plantas positivas: 0,32 - 2,9nm

N.E No evaluado

*Semipurificaciones virales:* La evaluación de las suspensiones semipurificadas mediante ELISA-DAS, corroboró la presencia de CMV, SqMV y potyvirus. Los valores de absorbancia obtenidos estuvieron entre 0,5 a 2,5  $UDO_{405\text{ nm}}$ . El 58.3% de las suspensiones analizadas mostraron la presencia de más de un virus, lo que confirma la existencia de infecciones mixtas en las plantaciones.

*Inoculación de plantas indicadoras y reproducción de síntomas:* Los síntomas que presentaron las plantas indicadoras fueron los siguientes: *Solanum nigrum*, anillos cloróticos bien marcados y moteado clorótico, ambos síntomas distribuidos de manera sistémica. *Datura arborea* presentó un aclaramiento de las nervaduras y un leve mosaico clorótico en toda la planta. En *Capsicum annum* se apreció una deformación en la lámina

foliar, engrosamiento de las nervaduras y un mosaico leve. *Solanum lycopersicum* no fue hospedero sintomático (Figura 4).



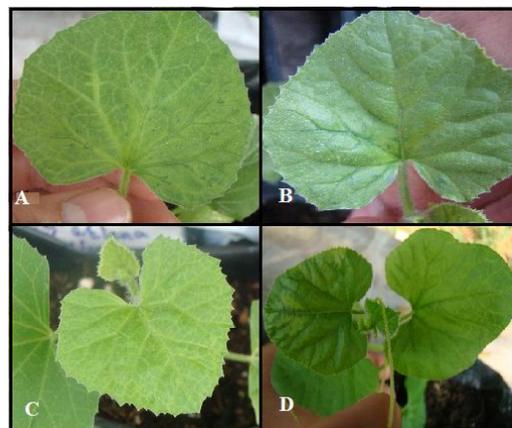
**Figura 4.** **A.** Hoja de *S. nigrum* con síntoma de moteado clorótico. **B.** Hoja de *D. arborea* con aclaramiento de nervaduras y mosaico clorótico. **C.** Hoja de *C. annuum* con deformación de lámina foliar y engrosamiento de nervadura. **D.** *S. Nigrum* con manchas cloróticas. **E.** Hoja de *S. lycopersicum* asintomática.

En el caso de *C. sativa* se realizó la reproducción experimental de diferentes sintomatologías presentes en campo, presentando luego de siete días después de la inoculación mosaicos cloróticos, deformación de la lámina foliar y clorosis de las nervaduras, al igual que lo observado en campo (Figura 5).

En *C. melo* se presentaron síntomas iniciales como el bandeado y aclaramiento de las nervaduras; al décimo día luego de la inoculación pudo observarse deformación de las hojas (Figura 6).



**Figura 5.** Plantas de pepino (*Cucumis sativa*) con inoculaciones procedentes de tres plantas. **A.** Amarillamiento intervenal. **B.** Arrugamiento y deformación de hoja. **C.** Clorosis de las venas y hoja.



**Figura 6.** Síntomas presentes en plantas de melón. **A.** Aclaramiento y bandeado de las venas. **B.** Obscurecimiento de las nervaduras. **C.** Aclaramiento de las venas. **D.** Bandedo de venas y deformación de las hojas.

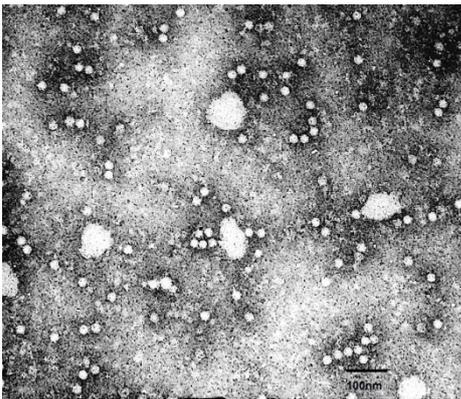
*Evaluación de la transmisibilidad por semilla:* De un total de 150 semillas germinadas 85 plántulas presentaron síntomas tempranos del virus obteniendo una tasa del 57% de plantas infectadas (Figura 7).



**Figura 7.** Síntomas presentes en plantas donde se evaluó la transmisión por semilla.

**Microscopía electrónica:** Las observaciones realizadas al microscopio electrónico de preparaciones teñidas negativamente, evidenciaron la presencia de partículas isométricas de 28 a 30 nm de diámetro, tanto en extractos foliares como suspensiones semipurificadas obtenidas a partir de muestras de melón (Figura 8), pepino y sandía con los síntomas descritos con anterioridad.

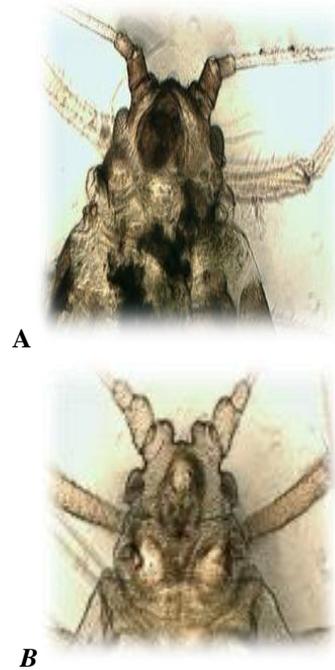
El análisis de cortes ultrafinos de secciones de hojas procesadas mediante inclusión y corte mostraron alteraciones ultraestructurales en la organización interna de cloroplastos y las mitocondrias, así como estructuras membranosas en el citoplasma celular. Tales hallazgos (no mostrados), pudieran asociarse a los efectos inducidos por la infección viral, pero deben ser estudiados con mayor profundidad.



**Figura 8.** Microfotografía electrónica de partículas isométricas de 28-30 nm de diámetro, observadas por tinción negativa en preparaciones semipurificadas obtenidas a partir de hojas de melón con síntomas de bandeado en las nerviaciones ("vein banding") La barra representa 100nm.

**Insectos vectores identificados:** Se logró identificar a *Myzus persicae* Sulz conocido como pulgón verde del melocotonero, el cual presenta un margen frontal cóncavo y tubérculos antenales laterales desarrollados. Por otra parte se identificó la especie *Aphis gossypii* Glover, también conocida como pulgón del melón, en la que se observó el margen frontal no cóncavo, ligeramente sinuoso y con los

tubérculos laterales muy desarrollados (Figura 9).



**Figura 9.** Áfidos identificados en la zona de Pedro Carbo A. *Aphis gossypii* B. *Myzus persicae*

#### 4. Discusión

Los eventos del año 2007 donde se produjeron pérdidas económicas en el sector agrícola por el desconocimiento de las especies virales presentes en el país, fueron el punto de partida para una investigación previa realizada por los autores (Espinoza *et al.*, 2009), en la que se detectaron síntomas compatibles con enfermedades virales en varios cultivos como pimiento, zapallo y pepino y a la vez, para la realización del presente trabajo.

Los resultados obtenidos mediante los diferentes métodos de identificación y diagnóstico empleados en este trabajo han permitido la detección de géneros y especies virales que se encuentran atacando a los cultivos de cucurbitáceas. Además de la presencia de Potyvirus, en la que es necesario profundizar para comprobar las especies presentes de este género, se identificaron infecciones por los virus del mosaico del pepino (CMV, género Cucumovirus), el del mosaico de la calabaza (SqMV, género Comovirus) e infecciones mixtas en diferentes cucurbitáceas cultivadas en el cantón de Pedro Carbo, provincia del Guayas.

La detección de SqMV constituye el primer registro de esta entidad viral en el país. Este virus, transmitido por insectos de la familia de los Coleópteros, es capaz de diseminarse a través de la semilla botánica. Autores como Nolan y Campbell (1984) reportaron índices de transmisión por semilla del 10%, mientras que en este trabajo se han demostrado valores superiores al 50%,

probablemente debido a la baja calidad sanitaria de la semilla, que carece de certificación al ser “reciclada” por los propios agricultores. Tales resultados explican los elevados porcentajes de plantas infectadas en los campos evaluados y justifican los bajos rendimientos obtenidos por los pequeños agricultores de la zona.

La presencia de infecciones virales concomitantes o mixtas en cultivos de ciclo corto en la provincia de Manabí fue motivo de sospechas del Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en su divulgación del 2009. Aunque en áreas diferentes, los resultados de este trabajo confirman la presencia de infecciones virales mixtas en el 18-20% de las muestras infectadas de melón y sandía que fueron analizadas. La presencia de este tipo de infección está relacionada, por lo general, con mayores pérdidas de rendimiento.

Por otra parte, la abundante presencia de áfidos y la identificación de dos de las especies con mayor capacidad vectorial (*Myzus persicae* y *Aphis gossypii*) explican también los elevados porcentajes de plantas infectadas en las áreas evaluadas. Estas especies son polífagas y transmiten una gran cantidad de especies virales, aún en infecciones mixtas, entre las que se encuentran diversos potyvirus y el CMV en cucurbitáceas (Pinto *et al.*, 2008)

## 5. Conclusiones y recomendaciones

Este trabajo registra por primera vez en el Ecuador la presencia del virus del mosaico de la calabaza (SqMV, género Comovirus familia Comoviridae), con altas tasas de transmisión por semilla en el cultivo del melón. Se reporta además la presencia del virus del mosaico del pepino (CMV, género Cucumovirus, familia Bromoviridae) y de potyvirus afectando cultivos de cucurbitáceas, así como infecciones mixtas que involucran diferentes géneros virales en plantaciones de melón y sandía.

Se identificaron las especies de áfidos *Myzus persicae* y *Aphis gossypii* con abundante presencia en las plantaciones evaluadas.

Los resultados obtenidos sugieren la necesidad establecer programas para el mejoramiento y control de la calidad de la semilla utilizada por los agricultores, y de incrementar la capacitación de los productores con respecto al manejo de los cultivos y los riesgos del uso de semilla reciclada. Por otra parte, se pone en evidencia la importancia de dar continuidad a las investigaciones en el área de virología vegetal, no solo en cucurbitáceas.

La capacidad demostrada para la identificación rápida de infecciones virales, plantea además la necesidad de establecer actividades de monitoreo en las zonas de mayor riesgo para evitar brotes de virus emergentes y reemergentes en cultivos destinados al consumo interno y la exportación, con la finalidad de

asegurar la productividad y la mejora en los ingresos de los pequeños agricultores.

## 6. Referencias

- [1] Bozzola, J.J., Russell, L.D., 1999. Specimen preparation for transmission electron microscopy. In Electron microscopy (eds. J.J. Bozzola and L.D. Russell). Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, pp. 16-47.
- [2] Bustillo A.; Sánchez G. 1977. “Los áfidos en Colombia: Plagas que afectan los cultivos agrícolas de importancia económica. Bogotá (Colombia). Instituto colombiano agropecuario. 96pp.
- [3] Dicyt. Divulgación científica y tecnológica, 2009. Iniap ofrece recomendaciones para el control de virosis en cucurbitáceas. Disponible en: <http://www.dicyt.com/noticias/el-iniap-ofrece-recomendaciones-para-el-control-de-virosis-en-cucurbitaceas>
- [4] El Diario, 2007. Plantaciones de Tomate afectadas por virus. Publicado el: 1ro de Julio del 2007. Disponible en: <http://www.eldiario.com.ec/noticias-manabi-ecuador/38617-las-plantaciones-de-tomate-tambien-son-afectadas-por-el-virus/>
- [5] Espinoza, L; Jiménez, M; Peralta, E. 2009. Conservación de agentes patógenos y epifitos presentes en los cultivos de tomate, sandía y banano y sus beneficios para la investigación. Revista tecnológica Espol Vol. 22. N. 1. 51-56 (Septiembre, 2009).
- [6] Guerrero J.; Zamora E. 2008, Amarillamiento de las cucurbitáceas. Revista en línea, Hortalizas.com. Disponible en: <http://www.hortalizas.com/biocontrol/?storyid=1267>
- [7] Matthews, 2004. Plant virology. Fourth edition, 1001 págs. London.
- [8] Morales, F. J. and Castaño M. (1987). Seed transmission characteristics of selected Bean common mosaic virus strain in differential bean cultivars. Plant Disease 71, 51-53.
- [9] Mnari-Hattab, M; Gauthier, N; Zouba, A. 2009. Biological and molecular characterization of the Cucurbit aphid-borne yellows virus affecting cucurbits in Tunisia. Plant Dis. 93: 1065 – 1072.

- [10] Nolan, P.A. and Campbell, R.N. (1984). Squash mosaic virus detection in individual seeds and seed lots of cucurbits by Enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Dis.* **68**: 971.
- [11] Peralta, E. L. (2008). Enfermedades emergentes de interés agrícola. Causas y perspectivas. Conferencia presentada en el XIX Congreso Latinoamericano de Microbiología y VI Congreso Nacional de Microbiología. Resumen de conferencias, Libro Programa, pág 37.
- [12] Roberts, I. M. 1986. Practical aspects on handling, preparing and staining samples containing plant virus particles for electron microscopy. En Jones R. A and Torrance, L. Developments and applications in virus testing. Wellesbourne, AAB. Pp 213 – 243.
- [13] Servicio de Información y Censo Agropecuario, SICA, 2002. Estudio potencial agroindustrial y exportador de la península de Santa Elena y de los recursos necesarios para su implantación. Available in: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/index.html>
- [14] Troya, R.; Guerrero, F. 2005. Estudio Del Potencial Agroindustrial Y De Exportación Para La Producción De Pepino En La Península De Santa Elena Y Los Recursos Necesarios Para Su Implantación. Tesis de grado. ESPOL. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/5058>
- [15] Pinto, Z.v, Rezende, J. A.M, Yuki, V.A., de Piedade, S.M.S, 2008. Ability of *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* to Transmit *Cucumber mosaic virus* in Single and Mixed Infection with Two Potyviruses to Zucchini Squash. *Summa phytopathol.*, 34(2): 183-185