

**Biología, Desarrollo y Reproducción de *Leptomastidea* ca. *antillicola*
Dozier (Hymenoptera: Encyrtidae), en la chinche harinosa del cacto
*Hypogeococcus pungens***

Por:

Emmanuel Vélez Pérez

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En

Protección de Cultivos

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ**

2013

Aprobado por:

Ángel L. González Rodríguez, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Roberto Vargas Ayala, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Alejandro Segarra, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Carlos J. Santos Flores, Ph.D.
Representante de Escuela Graduada

Fecha

Skip Van Bloem, Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

Abstract

Given the lack of biological information on *Leptomastidea* ca. *antillicola*, the encyrtid parasitoid of *Hypogeococcus pungens*, and given its potential importance in biological control, it is necessary to study the biology, reproduction, and behavior of this parasitoid. I designed methods for rearing *L. ca. antillicola* and the mealybug *H. pungens* under laboratory conditions. I studied the population biology and reproductive behavior of *L. ca. antillicola* and determined the ability of *L. ca. antillicola* to attack others pseudococcids species. The developmental period (egg-adult) of the parasitoid was 19 to 30 days, with 90% of adults having emerged by 25 days. The female to male ratio was 1.2:1, similar to that observed in the field. The emergence of males was faster. I described five phases in mating behavior: (1) search, (2) meeting and acceptance, (3) frame, (4) copula and (5) post-mating. The average total time of copulation was 1.61 ± 0.25 minutes. I also described oviposition behavior across five phases of the mealybug life cycle. *L. ca. antillicola* oviposited in the second and third immature stages and pre-reproductive females of *H. pungens*. The parasitoid *L. ca. antillicola* could only complete its life cycle on *H. pungens*. In the field, yellow traps were more effective in field sampling and populations as determined by trapping showed seasonal and geographical variation. Based on my analysis, the parasitoid should not pose a greater environmental risk to native pseudococcid species when used in classical type introductions in places where the mealybug is about to invade because *L. ca. antillicola* showed a high degree of specificity towards *H. pungens*.

Keywords: *Leptomastidea*, Encyrtidae, *Hypogeococcus pungens*, invasive species, Pseudococcidae, biological control, cactus.

Resumen

Dada la ausencia de información biológica sobre el parasitoide *Leptomastidea* ca. *antillicola* parasitoide primario de la chinche harinosa del cacto *Hypogeococcus pungens*, y dada su potencial importancia en su control biológico, fue necesario estudiar la biología, la reproducción y el comportamiento de *L. ca. antillicola*. Se establecieron métodos para la cría del parasitoide encírtido *L. ca. antillicola* y la chinche harinosa del cacto *H. pungens* bajo condiciones de laboratorio. Se estudió la biología y comportamiento reproductivo de *L. ca. antillicola*. Se determinó la capacidad que tiene *L. ca. antillicola* de atacar otras especies de pseudocócidos. Se evaluaron métodos para el muestreo de *H. pungens* y *L. ca. antillicola* en el campo. Se encontró que el periodo de desarrollo (huevo-adulto) del parasitoide fue de 19 a 30 días, con 90% de los adultos emergiendo a los 25 días. La razón sexual obtenida en el laboratorio entre hembras y machos fue de 1.2:1, similar a la observada en el campo. La emergencia de los machos fue más rápida. Se describe el apareamiento y el cual se separó en 5 fases: (1) búsqueda, (2) encuentro y aceptación, (3) montura, (4) copula, y (5) post-copula. El tiempo total promedio de cópula fue de 1.61 ± 0.25 minutos. Igualmente, se describe la ovoposición y se separó en 5 fases. *L. ca. antillicola* ovipositó en segundos, terceros y hembras pre-reproductivas de *H. Pungens*. El parasitoide *L. ca. antillicola* solamente pudo completar su ciclo biológico sobre *H. pungens*. Las trampas de color amarillo fueron la más eficaz para el muestreo de campo. El parasitoide aquí evaluado no debería representar un riesgo ambiental mayor de ser utilizado para introducciones del tipo clásico en lugares donde la plaga esta por invadir. El parasitoide *L. ca. antillicola* mostro un alto grado de especificidad hacia *H. pungens*.

Palabras Claves: *Leptomastidea*, Encyrtidae, *Hypogeococcus pungens*, plagas invasoras, Pseudococcidae, control biológico, cactus.

Agradezco a Dios, por brindarme salud y la oportunidad de alcanzar un eslabón más en mi vida profesional.

A mi amantísima esposa, Heizel D. Rivera Díaz por su apoyo incondicional.

A mi hermosa princesa, Isabella P. Vélez Rivera, por ser mi inspiración.

Agradecimientos

Agradezco grandemente la colaboración de la Agrónoma Hariette Pérez y de Adriana Jiménez en todos los estudios de campo. Agradezco al Dr. Alejandro Segarra-Carmona por creer en mí y brindarme su ayuda incondicional. Al Dr. Ángel L. González Rodríguez y al Dr. Roberto Vargas Ayala por sus recomendaciones y colaboración en esta investigación. Al Dr. Carlos J. Santos Flores por sus aportes y recomendaciones. A mi compañero Alberto Umpierre Juarbe por su ayuda desinteresada.

Tabla de Contenido

Abstract.....	ii
Resumen	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos	vi
Tabla de Contenido.....	vii
Lista de Figuras	ix
1. Introducción.....	1
Objetivos.....	3
2. Revisión de Literatura	4
2.1 Importancia de los Pseudocóccidos.....	4
2.1.1 Importancia Económica.....	4
2.2 <i>Hypogeococcus pungens</i>	8
2.2.1 Taxonomía.....	8
2.2.2 Distribución y hospederos	9
2.2.3 Morfología y Biología	10
2.2.4 Ciclo de Vida.....	12
2.3 Ecología, asociaciones biológicas, y manejo poblacional.....	14
2.3.1 Ecología.....	14
2.3.2 Hábitats	15
2.3.3 Asociación con las hormigas	16
2.4 Manejo de Pseudocóccidos.....	17
2.4.1 Control Biológico de Pseudocóccidos.....	17
2.5 Aspectos regulatorio	20
2.5.1 Reglamentación internacional sobre el uso e introducción de agentes para el control biológico de plagas exóticas.....	20
2.5.2 Especificidad de parasitoides, huéspedes alternos (“non-target”) y el impacto al medio ambiente.....	20
2.6 Parasitoides de <i>H. pungens</i>	22

2.6.1 <i>Leptomastidea</i> Mercet	22
2.6.2 Uso de parasitoides para el control biológico y su rol en las nuevas reglas de NAPPO para la introducción de organismos beneficiosos	23
3. Materiales y Métodos	27
3.1 Crianzas de Laboratorio.....	27
3.1.1 Crianza de <i>Hypogeococcus pungen</i>	27
3.1.2 Crianza de <i>Leptomastidea</i> ca. <i>Antillicola</i>	28
3.2 Estudios de Comportamiento y de Ciclo Biológico	29
3.2.1 Ciclo biológico	29
3.2.2 Comportamiento de apareamiento.....	30
3.2.3 Comportamiento de ovoposición.....	31
3.3 Pruebas de selección de hospederos alternos	31
3.3.1 Crianza de otras especies de chinches harinosas	31
3.3.2 Pruebas de hospedadores alternos (“two-choice test”).....	33
3.3.3 Prueba en la planta huésped (“in-situ”)	33
3.4 Evaluación de trampas pegajosas	34
3.4.1 Uso de trampas pegajosas para el muestreo de <i>L. ca. antillicola</i> y los machos de <i>H. pungen</i>	34
3.4.2 Muestreo por 52 semanas (1 año)	36
4. Resultados.....	38
5. Discusión	54
6. Conclusiones.....	62
7. Referencias	63

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Leptomastidea</i> ca. <i>antillicola</i> (A) Hembra, (B) Macho.....	29
Figura 2. Bandas en las alas de <i>Leptomastidea</i>	35
Figura 3. Trampas pegajosas evaluadas	36
Figura 4. Área considerada (40.34 cm ²) para el conteo de <i>Leptomastidea</i> y los machos de <i>H. pungens</i>	37
Figura 5. Proporción de <i>L. ca antillicola</i> machos y hembras emergidos bajo condiciones de laboratorio.....	39
Figura 6. Comparación de proporción de sexos en adultos coleccionados del campo (1) o en el laboratorio (2)	39
Figura 7. Tiempo promedio por cada fase de comportamiento de apareo de <i>Leptomastidea ca. antillicola</i>	42
Figura 8. Tiempo promedio por cada fase del comportamiento de oviposición de <i>Leptomastidea ca. antillicola</i>	44
Figura 9. Número de individuos colectados en las diferentes trampas pegajosas: (A) Número promedio de <i>Leptomastidea</i> (B) Número promedio de machos de <i>H. pungens</i>	48
Figura 10. Fluctuaciones poblacionales de <i>Leptomastidea ca. antillicola</i> en Cabo Rojo	49
Figura 11. Fluctuaciones poblacionales de <i>Leptomastidea ca. antillicola</i> en Guánica	50
Figura 12. Fluctuaciones poblacionales de <i>H.pungens</i> en Cabo Rojo.....	50
Figura 13. Fluctuaciones poblacionales de <i>H. pungens</i> en Guánica	51
Figura 14. Relación inter-especifica parasitoide-hospedador en Guánica	52
Figura 15. Relación inter-especifica parasitoide-hospedador en dos Cabo Rojo-FWS	52

1. Introducción

La chinche harinosa del cacto, *Hypogeococcus pungens* Granara de Willink (Hemiptera: Pseudococcidae), es una plaga invasora importante de las cactáceas columnares endémicas de Puerto Rico, cuyo desarrollo y supervivencia se encuentran seriamente amenazados por este insecto. Su reciente llegada al Caribe amenaza la biodiversidad de los bosques secos que contienen la mayor población de estos cactos en nuestra isla (Segarra-Carmona *et al.*, 2010). Este insecto chupador cactófago es oriundo de los desiertos del Chaco en el norte de Argentina, Brasil, Paraguay y Perú. Entre 1970 y 1980, *H. pungens* fue usado como agente de control biológico de cactáceas invasoras en Australia y África del Sur (McFayden, 1979). Sin embargo, su habilidad para moverse por las rutas del mercado internacional en hospederos alternos (e. g., *Alternanthera* spp., *Acalypha* spp. y *Portulaca* spp.) le han traído hasta el Caribe, donde ha invadido a Barbados, a Saint Thomas, al sur de la Florida y a Puerto Rico. En Puerto Rico, esta plaga ha invadido grandes áreas de bosque seco sub-tropical que por ser ambientalmente sensitivas, hacen del control biológico la única opción viable para controlarla.

Los esfuerzos de control natural contra esta plaga se inician en el 2006 en la isla de Barbados. Allí se halló una especie del género *Leptomastidea*, una avispa parásita encírtida (M. Ciomperlik USDA-APHIS-CPHST, comunicación personal) atacándola en su hospedero alternativo *Alternanthera* sp. En el 2008, el Dr. David Jenkins, entomólogo del Servicio de Investigaciones Agrícolas del Departamento de Agricultura de los EE.UU. (USDA-ARS) en Mayagüez, también encontró avispas de *Leptomastidea* atacando a *H. pungens* en el bosque de Guánica. Luego de examinar material de *H. pungens*

coleccionado en Puerto Rico, el Dr. J. S. Noyes del Museo de Historia Natural de Londres determinó que la especie era probablemente *L. antillicola*, pero la ausencia de hembras descritas hace la determinación final improbable (M. Ciomperlik, USDA-APHIS-CPHST, comunicación personal). Por ese hecho se mantiene el nombre original de Dozier (1937) con el precaucionario de “cerca” (ca.), en espera de clarificación futura de su taxonomía.

Leptomastidea antillicola fue descrita de Puerto Rico por Dozier en 1937, de un solo macho emergido de la chinche harinosa *Ferrisia virgata* (Cockerell) atacando *Inga vera* (Willd.) en el pueblo de San Sebastián. Los muestreos en cactus demuestran que el encírtido *Leptomastidea* ca. *antillicola* es probablemente un agente de control natural de gran importancia en la regulación de poblaciones de *H. pungen*s y lo convierten en un candidato potencial para programas de control biológico clásico en países donde está por invadir. Desafortunadamente, se conoce muy poco sobre la biología o el muestreo efectivo de este parasitoide. Dada la ausencia de información biológica sobre este parasitoide de *H. pungen*s, y dada su potencial importancia en su control biológico, se hace preciso estudiar la biología, la reproducción y el comportamiento de *L. ca. antillicola*, con el propósito de establecer métodos para su crianza masiva y de muestreo efectivo, y a la vez determinar su impacto potencial sobre el medio ambiente determinando su preferencia por otras especies “non-target” de chinches harinosas.

Por tanto, los objetivos de esta investigación fueron:

- Establecer métodos para la crianza masiva de *L. ca. antillicola* mediante el estudio de su biología reproductiva y comportamiento.
- Determinar la gama de huéspedes alternos (especificidad), y el posible impacto adverso al medio ambiente (“non-target”) de *L. ca. antillicola*
- Determinar la efectividad de las trampas pegajosas para el muestreo de *L. ca. antillicola* bajo condiciones de campo.

2. Revisión de Literatura

2.1 Importancia de los pseudocóccidos y de *Hypogeococcus pungens*

2.1.1 Importancia Económica

Muchos miembros de la superfamilia Coccoidea, que incluyen las queresas armadas y blandas, y las cochinillas, constituyen un grupo importante de insectos que afectan a los cultivos, a las ornamentales y a los ecosistemas naturales, y que pueden ser plagas en cultivos de alto valor (Ben-Dov *et al.*, 2009). Los pseudocóccidos, también conocidos como cochinillas o como chinches harinosas, son un grupo diverso de insectos, y muchos están considerados entre las principales plagas en la agricultura a nivel mundial. Según, Williams y Granara de Willink (1992), cerca de 2,000 especies de pseudocóccidos son plagas en cultivos de importancia económica. Entre éstos, los géneros *Pseudococcus* (Westwood), *Phenacoccus* (Cockerell) y *Planococcus* (Migula) contienen la mayoría de las especies de importancia agrícola (Clausen, 1978). Sin embargo, a pesar de que estos insectos causan grandes pérdidas económicas, existe relativamente poca información acerca de la cuantía de sus pérdidas, así como de los costos asociados a su control.

A nivel mundial, las chinches harinosas son plagas importantes. En California la chinche harinosa de las uvas, *Pseudococcus maritimus* (Ehrhorn), es considerada la principal plaga en los campos de viñedos (Flaherthy *et al.* 1992). Se estima que la chinche harinosa de la vid, *Planococcus ficus* (Signoret), causa pérdidas de \$100/ha por temporada (Walton *et al.*, 2004). Según Bokonon-Ganta *et al.* (2002), la chinche harinosa del mango *Rastrococcus invadens* (Williams), es considerada por el 97% de los productores de mango

(*Mangifera indica*) en Hawaii como la responsable de reducir sus rendimientos significativamente.

En Puerto Rico, se han informado varias especies de chinches harinosas como plagas de importancia económica agrícola. Por ejemplo, Maldonado y Medina (1985) señalan a *Dysmicoccus brevipes* (Cockrell) como la plaga más importante de la piña en Puerto Rico y a *Saccharococcus sacchari* (Cockrell) como una plaga muy común en la caña de azúcar. Otra chinche harinosa exótica y dañina a los cultivos agrícolas en Puerto Rico lo es *Paracoccus marginatus* (Williams y Granara de Willink), conocida como la chinche harinosa de la papaya. Meyerdirk *et al.* (2004), informaron de severas infestaciones de esta chinche en la década de los 1990 en los sembradíos de papaya en las islas del Caribe (Saint Thomas, Santa Cruz, República Dominicana y Puerto Rico). Otras especies de chinches harinosas tales como: *Ferrisia virgata* (Cockerell) en café y cacao, *Nipaecoccus nipae* (Maskell) en aguacate y guayaba, *Phenacoccus solani* (Ferris) en papas, *Maconellicoccus hirsutus* (Green) en algodón y *Phenacoccus maderensis* (Green) en yuca y papa, se han informado como plagas agrícolas (Ben-Dov, 1994; Sáez, 2000).

Las chinches harinosas, como *Hypogeococcus pungens*, son las plagas comúnmente más dañinas a la producción y al mantenimiento de las plantas ornamentales. Similarmente, la chinche harinosa de rabo largo, *Pseudococcus longispinus* (Targioni-Tozzetti), es considerada como muy común causando problemas en las viveros y jardines si no son controladas a tiempo (Martorell, 1945). Éstas producen daño estético y hasta la

muerte de plantas en infestaciones severas. La producción de plantas ornamentales es un sector muy importante dentro de la producción agrícola de Puerto Rico, con un ingreso anual de \$44 millones (Censo, 2007). Aunque no existen cifras del costo y de los daños asociados con chinches harinosas en este sector para Puerto Rico, podemos comparar por ejemplo con el estado de Georgia, donde el costo anual de su control y de las pérdidas asociadas a estos insectos alcanzan cerca de \$99 millones (Hudson *et al.*, 1997; Juang-Horng *et al.*, 2006).

Otro pseudocóccido exótico importante en Puerto Rico es la chinche rosada del hibisco, *Maconellicoccus hisutus* (Green), considerada una de las especies invasoras más dañinas para la industria de ornamentales mundialmente. Se estima que el costo anual por los daños y su control en los Estados Unidos asciende a los \$700 millones de dólares (Ranjan, 2006).

Otros ejemplos de plagas ornamentales importantes son: *Palmicultor browni* Williams y *Palmicultor palmarum* Maskell, que atacan palmas, principalmente *Veitchia* spp., generalmente utilizadas en los jardines en la Florida (Hodges y Hodges, 2004). Estos pseudocóccidos pueden causar la muerte regresiva de las palmeras comenzando con las hojas nueva y eventualmente las hojas maduras, causando así grandes pérdidas a los productores.

Finalmente, las chinches harinosas como *H. pungen*s también son capaces de afectar plantas en áreas naturales o de gran valor ecológico. En la mayoría de estos casos, las agencias gubernamentales se vienen a encargar de su manejo y su control. Estas áreas generalmente contienen flora y fauna única y son visitadas tanto por la comunidad científica, como por la comunidad local y por los turistas. Muchas de las plagas que afectan las áreas naturales son consideradas invasoras (McFayden, 1979). Las principales dificultades del manejo de plagas en las áreas naturales son: la limitada accesibilidad a estas áreas, sus grandes extensiones territoriales, y porque las medidas de control disponibles se limitan, en muchos casos, al control biológico por lo delicado de la ecología y al alto costo de la aplicación de otros métodos de manejo como control químico o físico.

La chinche harinosa del cacto (*H. pungen*s) es una plaga invasora importante de las cactáceas columnares endémicas cuyo desarrollo y supervivencia se encuentran seriamente amenazados por este insecto. Su reciente llegada al Caribe amenaza la biodiversidad de los bosques secos que contienen la mayor población de estos cactus en nuestra isla (Segarra-Carmona *et al.*, 2010). Durante las décadas del 1970 y 1980, este insecto fue usado exitosamente como agente de control biológico de cactus invasores en Australia y África del Sur, y donde erradicó estos cactus en millares de kilómetros cuadrados (McFayden, 1979). Como parte del efecto de la chinche harinosa del cacto, se distorsionan las puntas de los tallos de los cactus y en muchos casos se detiene la florecida y la producción de frutas (Klein, 2002). Además, tiene la capacidad de dispersarse por el viento y atacar otras especies de plantas. Por ejemplo, se ha encontrado atacando especies de *Alternanthera* spp., *Acalypha* spp. y *Portulaca* spp. en Puerto Rico. También se ha encontrado atacando

especies de *Hibiscus* sp. en Hawaii. Todas estas plantas ornamentales son muy comercializadas internacionalmente por lo que la diseminación de la plaga puede ser más fácil. Además, sugiere que *H. pungens* tiene una tendencia hacia la polifagia, lo que complicaría su manejo.

Por las razones antes expuestas, probablemente el manejo de *H. pungens* en Puerto Rico será muy complejo. Lo ambientalmente sensitivo de su actual área de dispersión, que incluye todos los bosques y reservas naturales del sur de Puerto Rico, y del extraordinario costo de tratar la plaga con insecticidas sobre cientos de millas cuadradas, confirman esta aseveración. Es por esto que la única opción económica y ambientalmente viable para controlar a *H. pungens* es mediante el uso del control biológico.

2.2 *Hypogeococcus pungens*

2.2.1 Taxonomía

La chinche harinosa del cacto, *Hypogeococcus pungens* (CHC), fue coleccionada por primera vez en Argentina en 1972, atacando el cactus columnar *Eriocereus martinii* (Labouret), conocido comúnmente como el cactus de Harrisia (McFadyen, 1979). Originalmente la chinche fue descrita incorrectamente como *Pedronia festeriana* Lizer y Trelles, y luego fue incluida dentro de *Hypogeococcus* como la especie *festerianus* (Lizer y Trelles) (McFadyen, 1979). En 1981, Granara de Willink la re-describe como una especie nueva, distinta a *festerianus* y la llama *H. pungens*. La chinche harinosa del cacto ha sido anteriormente confundida con *H. festerianus*, a pesar de su claras diferencias morfológicas que incluyen la presencia de tres “circulus” en el abdomen de la hembra. Aunque ambas

especies pueden ser encontradas en la familia cactácea, su gama de hospederos es diferente para ambas especies (Hodges y Hodges, 2009). *Hypogeococcus pungens* se diferencia de *H. festerianus* por variedad de huéspedes y características morfológicas. *H. festerianus* es específico para especies de la familia Cactaceae (Pérez Sandi y Cuen *et al.* 2006). La chinche harinosa del cacto, que originalmente se pensó de manera incorrecta que era un herbívoro especialista en cactus columnares fue utilizada en Australia y África del Sur como control biológico de varias especies de cactus. (Pérez Sandi y Cuen, *et al.*, 2006). Por lo que se podría considerar como un rango de hospederos mayor *H. festerianus*.

2.2.2 Distribución y hospederos

Este pseudocóccido cactófago se ha informado en países como Australia, América del Sur, Europa, América del Norte y en el Caribe (Moran y Zimmerman, 1991). En Estados Unidos, se ha informado en Hawaii y en Florida (Hodges y Hodges, 2009). En Puerto Rico, se detectó en la Reserva Forestal de Guánica en la costa sur de Puerto Rico en el año 2005 (Zimmerman *et al.* 2010).

Los hospederos por excelencia de *H. pungens* pertenecen a la familia Cactaceae. Fleming y Valiente-Bounet (2002), mencionan que esta familia de plantas se considera como uno de los grupos más importantes en la ecología de las zonas áridas, y semiáridas desde el Norte y Sur América, de igual forma en el Caribe. *Hypogeococcus pungens* tiene además huéspedes alternos de diversos géneros que no son de la familia Cactaceae. Se ha informado en dos especies del género *Portulaca* (*P. oleracea* (L.) y *P. quadrifida* (L.)),

ambas presentes en Puerto Rico (Hodges y Hodges, 2009). *Portulaca oleracea* L., conocida comúnmente como verdolaga, es una planta anual, nativa de la India y del Medio Oriente. *Hypogeococcus pungens* también ha sido reportado en dos especies del género *Alternanthera*: *A. pungens* (Kunth) y *A. bettzickiana* (Regel) (Hodges y Hodges, 2009). Como parte del efecto de la chinche harinosa del cacto, solamente se menciona que se puede observar que ocurre una distorsión en las puntas de los tallos. En muchos casos, se detiene la florecida y la producción de frutas (Klein, 2002)

2.2.3 Morfología y Biología

Morfología externa- Al igual que otros pseudocóccidos, el cuerpo de *H. pungens* es suave. Las hembras y los estados inmaduros son de cuerpo ovalado-alargado y con segmentación visible. Estos insectos producen una cubierta cerosa-harinosa que usualmente cubre todo su cuerpo (Sáez, 2000).

Diferente a la mayoría de las cochinillas, que tienen ocho segmentos antenales, las antenas de *H. pungens* usualmente tienen sólo 7 segmentos (Hamon, 1984). Algunos otros géneros, como *Maconellicoccus*, por lo general tienen nueve segmentos. La función principal de las antenas es sensorial. Al igual que en otras chinches harinosas, el aparato bucal de *H. pungens* tiene estructuras modificadas para perforar tejido vivo y chupar el alimento en forma líquida. Dicho aparato consta de dos pares de estiletes y una cubierta protectora, conformada por el labio, y que se encuentra debajo de la cabeza, dirigida hacia la región posterior del cuerpo (Chandler y Watson, 1999).

Como en otros pseudocóccidos, el tórax se caracteriza por la presencia de estructuras para la movilidad. Las patas frecuentemente son usadas en la determinación taxonómica en la familia. Por ejemplo, *H. pungens* tiene en sus patas traseras poros translucientes bastante definidos y localizados en la mitad externa de cada coxa, y dos grupos de poros pequeños en el borde distal exterior de la tibia (Hamon, 1984). En otros géneros, la presencia de dentículos en la garra, de por ejemplo *Phenacoccus* resulta de valor diagnóstico. Algunas especies, como *Planococcus citri* y *Planococcus minor*, presentes en Puerto Rico, se pueden diferenciar utilizando el tamaño de las patas.

En el abdomen se puede apreciar poros de discos multiloculares en filas tanto simples como dobles, en segmentos anteriores y posteriores. Éstos secretan una cera polvorienta que cubre los huevos jóvenes. Aquellas especies con muchos poros de disco multiloculares cerca de la vulva son con frecuencia ovíparas, mientras que aquellas con pocos o ningún poro son generalmente vivíparas (Ramos y Serna, 2004). Otra característica distintiva de *H. pungens* es que tiene tres “circulus”. Estas estructuras pueden ser localizadas en el medio del vientre abdominal, situado en la línea inter-segmental, entre los segmentos abdominales III y IV. Comúnmente las otras chinches harinosas tienen un solo circulus, pero pueden tener hasta cinco. La forma y tamaño del circulus son a menudo característicos de la especie. La función principal de esta estructura es ayudar al pseudocóccido a sujetarse de la planta.

El anillo anal de *H. pungens* es bastante ancho, con tres filas de poros, y sus lóbulos anales están pobremente desarrollados (Hamon, 1984). Algunas de las setas abdominales son cónicas, al igual que los cerarios que usualmente tienen tres o más setas cónicas. Según, Cox y Pearce (1983), las setas cónicas producen cera filamentosa que da origen a los filamentos laterales de estos insectos. Otra característica morfológica en *H. pungens* es que los adultos carecen de poros triloculares. Estos poros se pueden apreciar en ambas superficies del cuerpo (i.e., ventral y dorsal) en las especies de pseudocóccidos que los tienen.

2.2.4. Ciclo de Vida

En *H. pungens*, al igual que en otras chinches harinosas, el ciclo biológico consta de cinco etapas de desarrollo (huevo, 3 etapas de ninfas y adulto). Además, exhiben dimorfismo sexual, por lo que el macho y la hembra adultos son completamente distintos. Las hembras, por su parte, mantienen básicamente la misma apariencia que en su estado ninfal, mientras que los machos son alados y sus patas son alargadas (SEL, 2003).

La reproducción de *H. pungens*, como en otras chinches harinosas, consta de la cópula y la fecundación, que ocurren prontamente luego de su última muda. La hembra es capaz de ovopositar luego de un periodo de varios días, depositando entre dos a cuatro huevos al día por 35 días. En los pseudocóccidos existen especies ovíparas y ovovivíparas. Las especies ovíparas depositan los huevos en una cavidad debajo de su cuerpo o en una cubierta cerosa, llamada “ovisaco”, que puede estar adherida a su cuerpo (SEL, 2003). En

contraste, las especies ovovivíparas retienen los huevos en su tracto reproductivo hasta que los estados jóvenes están listos para eclosionar (Gullan y Martin, 2003; Soria y Viñuela, 2003). Las hembras pueden vivir por largos periodos de tiempo, que van desde meses a varios años, mientras que los machos solo duran unas pocas horas y carecen de aparato bucal funcional (Gullan y Martin, 2003).

Los machos adultos de *H. pungens* y de otros pseudocóccidos, pasan por cuatro estados inmaduros o preimagos, incluyendo estados similares a una metamorfosis completa “holometábola”, involucrando uno o dos estados semejantes a “pupas” (Gullan y Martin, 2003). Éstos son llamados la prepupa y pupa se desarrollan bajo una cubierta escamosa o dentro de un pupario de cera que en algunas especies puede ser producido por el segundo estado. Los estados de pupa y el macho adulto nunca se alimentan porque carecen de piezas bucales funcionales (SEL, 2003). Los machos adultos tienen una vida corta, unos pocos días, y tienen un tiempo limitado para buscar a las hembras sedentarias para el apareamiento (Gullan y Martin, 2003; Ramos y Serna, 2004). Los machos adultos probablemente localizan a sus hembras usando feromonas sexuales específicas, pero la presencia de estos químicos ha sido demostrada experimentalmente para muy pocas especies (Gullan y Martin, 2003).

Las etapas inmaduras de *H. pungens* son típicas de los pseudocóccidos. El primer estado conocido comúnmente como gateador, caminante o “crawler” se pasa entre 1 a 3 días caminando por la planta hospedera buscando áreas de mayor crecimiento vegetativo o primordios que son las preferidas para su alimentación. Si no encuentran estas áreas se

trasladan a las partes altas de la planta hospedera, y se dispersan por las corrientes de aire hasta aterrizar en lugares más propicios para su alimentación (Ramos y Serna, 2004). Una vez encuentran estos lugares, se detienen e introducen sus partes bucales en el tejido de la planta para comenzar a alimentarse. La gran mayoría pasa el resto de su vida en el sitio en que se “posa”, y secretan su característica cubierta de cera mientras se alimentan (Rebek y Schnelle, 2009). Al finalizar el segundo instar, el macho ya se diferencia de la hembra, y se mueve a áreas de la planta en donde comienza a prepararse para pupar. La hembra usualmente se mantiene en el mismo sitio por toda su vida (McFadyen, 1979).

2.3 Ecología, asociaciones biológicas, y manejo poblacional

2.3.1 Ecología

La ecología de los pseudocóccidos está complejamente influenciada por sus preferencias ambientales, su planta hospedera, y las interacciones que tienen con otros organismos como las hormigas y sus enemigos naturales (Goolsby, 1994). En general, los inmaduros buscan áreas protegidas, (envés de las hojas, axilas y el área del cáliz en la fruta) (McKenzie, 1967). Esto le da mayor protección a los estados inmaduros, que se mantienen agrupados cerca de la madre uno o más días después de la eclosión y donde están bien protegidos de los cambios repentinos en las condiciones climáticas (Browning, 1959).

2.3.2 Hábitats

Los pseudocócidos son una familia de insectos que pueden encontrarse en casi cualquier tipo de ambiente (Mckenzie, 1967). En Puerto Rico, por ser una zona sub-tropical puede observarse infestaciones de chinches harinosas en cualquier parte de la isla. Se pueden encontrar afectando plantas de interés agrícola (cultivos y ornamentales), así como plantas en áreas naturales.

Algunas chinches harinosas prefieren alimentarse de cultivos agrícolas tales como piña, cítricos, plátano, guineos, yuca, tomates, pimientos y otros (McKenzie, 1967). Así también se encuentran afectando otros cultivos como el café, cacao y caña de azúcar. Algunas especies se encuentran atacando plantas ornamentales tales como hibiscos, acalifa (*Acalypha wilkesiana*), cheflera (*Schefflera arboricola*) y pascuas (*Poinsettia pulcherrima*). En los ambientes naturales podemos observar a los pseudocócidos atacando grupos de plantas con flores (perennes y anuales), gramíneas, coníferas, helechos y muchas otras.

Las chinches harinosas suelen infestar las hojas, los tallos, la corteza de arboles, las raíces y los frutos, dependiendo de la especie de chinche y de la planta hospedera de la cual se alimenta. Aunque se ha observado que las especies de la familia Pseudococcidae prefieren alimentarse de plantas suculentas, también se encuentran en varias malezas herbáceas, y en plantas ornamentales (Hodges y Hodges, 2009). Por ejemplo, *H. pungens* prefiere cactáceas que son usualmente plantas suculentas, con un gran contenido de fluidos en su interior.

Los primeros estados buscan sitios para su alimentación en la planta hospedera natal o se dispersan con el viento. Algunos primeros estados “caminantes” de las chinches harinosas exhiben comportamientos que incrementan sus oportunidades de llegar al aire. Los caminantes de la propia chinche harinosa del cactus se pueden observar en las puntas de las espinas más altas de la planta donde están establecidas, lo que pareciera indicar que están en espera de ser dispersadas por acción del viento. Ocasionalmente se pueden encontrar chinches harinosas asociadas a objetos no biológicos (debajo de las rocas y en las galerías de hormigas), esto durante el invierno (Mckenzei, 1967).

2.3.3 Asociación con las hormigas

Las chinches harinosas suelen caracterizarse por establecer asociaciones mutualistas con diversas especies de hormigas (Hymenoptera: Formicidae). La mielecilla o “honeydew” producida por los pseudocóccidos a través de glándulas en su abdomen es una fuente importante de alimentación para muchas especies de hormigas (Nixon, 1951; Way, 1963; Gullan y Kosztarab, 1997; Delabie, 2001). Se sabe que la mielecilla contiene aminoácidos, proteínas, minerales y vitamina-B (Way, 1963).

En esta curiosa asociación, los pseudocóccidos también se benefician ya que las hormigas ayudan en la dispersión de las chinches hacia nuevos hospederos proveyéndoles transporte (Strickland, 1951a-b), y porque muchas especies de hormigas actúan en defensa de las chinches repeliendo y atacando sus enemigos naturales. Además, las hormigas comen y remueven la mielecilla de manera eficiente, eliminando así las probabilidades de que crezcan hongos sobre las cochinillas (DeBach, 1974; Way 1963). Este conocimiento

ha sido aplicado al manejo de poblaciones de chinches harinosas. Por ejemplo, Jahn y Beardsley (1994) reportaron que el número de *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) en piña disminuye en ausencia de las hormigas de cabeza grande, *Pheidole megacephala*. Así, Beardsley (1993) reportó el éxito del control de *Dysmicoccus neobrevipes* (Beardsley) por acción de parasitoides y depredadores en ausencia de las hormigas las cuales impiden la efectividad de los enemigos naturales.

2.4 Manejo de Pseudocóccidos

2.4.1 Control Biológico de Pseudocóccidos

Debido a su importancia económica, el manejo y control efectivo de los pseudocóccidos constituyen áreas básicas de investigación. En general, los métodos convencionales de control, como lo es el control químico, suelen ser poco efectivos debido a que las chinches harinosas producen una capa cerosa-algodonosa que les sirve de protección y que funciona como escudo o barrera (Stibick, 1997). Además, las chinches harinosas suelen vivir en sitios poco accesibles a las aplicaciones de plaguicidas, con la posible excepción de los productos sistémicos.

Históricamente, el uso de métodos de control biológico ha sido la alternativa más eficaz de control de chinches harinosas. El primer registro sobre el uso del control biológico en chinches harinosas se remonta al año 1891, cuando se utilizó el coccinélido depredador *Cryptolaemus montrouzieri* (Mulsant), introducido desde Australia a California para el control de la chinche harinosa *Planococcus citri* (Clausen, 1915). La introducción de *C. montrouzieri* se produjo sólo tres años después de la exitosa

introducción, en 1888, de la mariquita de vedalia, *Rodolia cardinalis* (Mulsant), y la mosca parasitaria, *Cryptochetum iceryae* (Williston) para el control de la cochinilla algodonosa de las cítricas, *Icerya purchasi* (Maskell) (Quezada y DeBach, 1973).

También el coccinélido conocido como “destructor de cochinillas” (mealybug destroyer), fue introducida en 1911 en Puerto Rico para el control de la chinche harinosa de la caña *Saccharococcus sacchari* (Wolcott, 1948). La importación de *C. montrouzieri* marca la era del control biológico con gran énfasis en la utilización de las “mariquitas” (Coleoptera: Coccinellidae) contra plagas exóticas o nativas en Puerto Rico.

Los parasitoides himenópteros constituyen también enemigos naturales importantes de las chinches harinosas. El primer registro de su uso en programas de control biológico se remonta al año 1914, cuando se introdujo el parasitoide *Leptomastidea abnormis* (Girault) (Hymenoptera; Encyrtidae) en California, desde Sicilia, para el control de la chinche harinosa de las cítricas: *Planococcus citri* (Viereck, 1915; Smith, 1917). Posteriormente se introdujeron otras dos especies para reforzar el control biológico de *P.citri*; éstas son: *Anagyrus pseudococchi* (Girault) desde Italia y *Leptomastix dactylopii* (Howard) desde Brasil (Smith, 1917; Bartleit y Lloyd, 1958; Clausen, 1978). Desde entonces los encírtidos han demostrado ser excelente agentes biológicos controlando chinches harinosas (Trjapitzin, 2007).

Un ejemplo reciente en Puerto Rico fue la introducción de dos avispas parásitas encírtidas importadas desde Egipto: *Anagyrus kamali* (Moursi) y *Gyranusoidea indica* (Shafee, Alam y Agarwal), para el control de la chinche harinosa rosada del hibisco (*Maconellicoccus hirsutus*) y obteniéndose excelentes resultados (Sáez, 2000). Otro ejemplo exitoso lo es el control de la chinche harinosa de la papaya (*Paracoccus marginatus*) por la acción de parasitoides (Muniappan *et al.*, 2006). En nuestra isla también se utilizaron los parasitoides *Anagyrus loecki* (Noyes), *Pseudleptomastix mexicana* (Noyes y Schaff) y *Acerophagus papayae* (Noyes y Schaff). A pesar de no existir corroboración científica de su efecto, algunos especialistas han observado reducciones en las poblaciones de chinches harinosas en papaya, por lo que se produjo la subsiguiente introducción de los parasitoides en Palau, y en Guam. El éxito de los programas de control biológico resulta en grandes beneficios, sin embargo también ocurren fracasos frecuentemente. Por ello hace ya varias décadas múltiples naciones han unido esfuerzos con el fin de proteger nuestros ecosistemas. Esto estableciendo regulaciones y estudios previos a cualquier liberación de un organismo extranjero a un nuevo ambiente.

2.5 Aspectos regulatorios

2.5.1 Trasfondo histórico sobre el uso e introducción de agentes para el control biológico de plagas exóticas.

En el pasado, la introducción de agentes de control biológico era un proceso con poca reglamentación y donde la evaluación de impactos ambientales o la cuantificación de su eficacia eran aspectos secundarios. Como consecuencia, en años recientes se han documentado numerosos ejemplos de introducciones dañinas de “enemigos naturales” (Van Lenteren *et al.*, 2006). En efecto, muchos de los fracasos en los programas de control biológico se deben a la falta de suficiente información o requisitos reglamentarios eficientes para exigir estudios previos a la liberación de un biocontrolador (Lockwood, 1993). También podría deberse a la falta de recursos (Van Driesche y Bellows Jr., 1996). Por otro lado, existe la posibilidad en que haya una competencia inter-específica; esto afecta el control biológico porque los parasitoides invierten mucha energía en una relación de competencia y poca en el proceso de reproducción, reduciéndose su eficacia.

2.5.2 Especificidad de los parasitoides, huéspedes alternos (“non-target”) y el impacto al medio ambiente.

Históricamente los programas de control biológico clásico se han visto favorablemente, tanto por la comunidad científica como por la industria agrícola. A finales de la pasada década surge la interrogante en la comunidad científica sobre cuáles son los potenciales impactos negativos al medio ambiente cuando utilizamos el control biológico. De hecho, varios estudios revelan que “todas las especies invasoras (introducidas) tienen el

potencial de crear daños inesperados al medio ambiente, incluyendo parasitoides y depredadores”, especialmente cuando estos últimos organismos atacan a otros organismos no previstos (“non-target species”) (Thomas y Willis, 1998; Follet y Duan, 2000; Howarth, 2000; Lynch y Thomas, 2000; Henneman y Memmott, 2001; Wajnberg *et al.*, 2001). Por ello, las autoridades regulatorias de cuarentena requieren mayor estudio sobre estos efectos antes de permitir introducciones del tipo clásico. Aun así, hay muchos científicos que siguen apoyando el control biológico clásico plenamente, como un método de control efectivo, amigable al ambiente y de altos beneficios económicos (DeBach, 1974; Simmonds y Bennett, 1977; Caltagirone y Huffaker, 1980; Ehler, 1990; Bower, 1991).

Según DeBach (1974) y Ehler (1990), el uso de control biológico no tiene mayores efectos nocivos sobre el ecosistema. Las plagas no desarrollan resistencia a sus enemigos naturales (Bower, 1991). En investigaciones que realizaron Simmonds y Bennett (1977), utilizando control biológico, se encontró efectos económicos positivos y sin ningún tipo de peligro al medio ambiente. Caltagirone y Huffaker (1980), opinan que el uso de depredadores y parasitoides para el control de plagas no debe representar un riesgo al ambiente, cuando es el resultado de un programa de control biológico bien pensado y cuidadosamente ejecutado.

Desde el 2008, la North America Plant Protection Organization (NAPPO) reglamenta las introducciones de enemigos naturales en los EE.UU. y sus territorios. Desde ese año, no se puede introducir ningún enemigo natural exótico sin la preparación de esta evaluación ambiental y, luego, ser aprobada por el comité técnico de NAPPO. Ahora,

por ejemplo, la introducción de un enemigo natural exótico a los EE.UU. requiere de una evaluación de impacto ambiental que incluye el impacto sobre especies que no son su blanco (“non-target”), datos sobre su ciclo de vida, planes para su monitoreo y muestreo, y evaluación de su efectividad una vez liberados al medio ambiente. Estas directrices de NAPPO están contenidas en el “Regional Standards for Phytosanitary Measures” (RSPM) No. 12.

2.6 Parasitoides de *H. pungen*

2.6.1 *Leptomastidea* Mercet

Como se menciona anteriormente, Jenkins (2008) descubre a *Leptomastidea* ca. *antillicola* parasitando a *Hypogeococcus pungen* en Guánica. Según Trjapitzin (2009), el género *Leptomastidea* Mercet es oriundo del Viejo Mundo donde se encuentran 24 de sus 25 especies y todas son endoparasitoides primarios de chinches harinosas (Trjapitzin, 2009; Noyes y Hayat, 1994). El género es bien conocido a través del uso de *L. abnormis* (Girault), utilizado mundialmente como control biológico de la chinche harinosa de las cítricas, *Planococcus citri* (Rosso) (Noyes y Hayat, 1994). Aun así no hay suficiente información específica sobre la cría masiva del parasitoide. Esto se debe en gran medida a que en el pasado no existían regulaciones que exigiesen los estudios previos a una liberación como es en la actualidad.

Según Moore (1988), a nivel mundial la introducción de parasitoides, especialmente de la familia Encyrtidae a la cual pertenece el género *Leptomastidea*, ha sido la estrategia más exitosa para el control de chinches harinosas. Esto es posiblemente debido a que en la familia Encyrtidae se puede observar notables adaptaciones co-evolutivas que conducen a la expectativa de un alto grado de especificidad (Askew y Shaw, 1985). Estas adaptaciones le permiten a los encírtidos desarrollarse dentro del cuerpo de su huésped, mientras que el propio anfitrión sigue creciendo y muda.

La especie encontrada en Guánica, y con la que se lleva a cabo la presente investigación, fue identificada por Noyes (British Museum of Natural History, Londres) como probablemente *antillicola*, pero la ausencia de hembras descritas hace la determinación final improbable. Por eso, se mantiene el nombre original de Dozier (1937) con el precaucionario de “cerca” (ca.), en espera de clarificación futura.

La falta de información biológica sobre este parasitoide, y dada su potencial importancia en el control natural de *H. pungen*, hizo necesario estudiar la biología reproductiva y comportamiento de *L. ca. antillicola* bajo condiciones de laboratorio con el propósito de establecer métodos para su crianza masiva y la determinación de su impacto a otras especies de chinches harinosas en cumplimiento con la NAPPO (RSPM) No. 12.

2.6.2 Uso de parasitoides para el control biológico y su rol en las nuevas reglas de NAPPO para la introducción de organismos beneficiosos

El uso de enemigos naturales, como lo es *Leptomastidea*, tiene aplicaciones en el control biológico clásico y el control biológico por aumento (ver definiciones abajo). Ambos procesos comienzan con la crianza masiva de los enemigos naturales. Para ello es necesario desarrollar investigación que lleve establecer los métodos óptimos que nos permitan criar al enemigo natural a gran escala, y mantener generaciones sucesivas a un bajo costo (Voegelé, 1986; Takada *et al.*, 2001). En la crianza de insectos biocontroladores, la calidad, cosecha, almacenamiento, distribución, así como la liberación para controlar los insectos plaga, son los factores más limitantes para que el control biológico por aumento se haga más extensivo (King, 1998). Según Greathead y Waage (1983), el control biológico por aumento tipo inundativo se define como la estrategia donde un número muy grande de enemigos naturales son criados y liberados en periodos críticos para la supresión a corto plazo de poblaciones de plagas. Esta técnica puede reforzar algunas de las deficiencias del control biológico clásico (Sivinski, 1996). Esta estrategia puede ser considerada como una seria alternativa para la supresión de poblaciones de plagas, ser utilizada en programas de manejo integrado y programas de erradicación (Barclay, 1987; Knipling, 1992; Wong *et al.*, 1992 y Sivinski, 1996).

En el control biológico, al igual que cuando se utilizan métodos de control convencionales para la supresión de plagas y enfermedades, se requiere de la aplicación de distintas técnicas para evaluar el papel real que tienen los agentes de control biológico en la regulación de las poblaciones de plagas (Badii *et al.*, 2004). Cuando se utiliza el control

biológico clásico en el ambiente natural, así como en los agro-ecosistemas, es necesaria una explicación experimental de cómo una plaga es regulada por la efectividad de los enemigos naturales. En el control biológico clásico, el impacto de un enemigo natural puede ser demostrado al comparar el cambio en la densidad de una plaga en los sitios de liberación inicial con un sitio control sin los enemigos naturales (Huffaker *et al.* 1962; Legner y Silveira-Guido, 1983). Por ello, es importante evaluar la actividad de los enemigos naturales nativos, en caso de ser necesaria la introducción de especies exóticas.

Sin embargo, la introducción de enemigos naturales, a diferencia de medidas de control tal como el control químico, es generalmente irreversible, permanente e incontrolable. El ejemplo más aplicable es el de la propia chinche harinosa de los cactus, *H. pungens*, que fue introducida en Sur África y Australia para el control de cactus invasivos, y que hoy amenaza con la merma y extinción de cactus columnares en Norte América y el Caribe. De hecho, casos como éste son en la actualidad el punto clave de la controversia entre los que apoyan o no la utilización del control biológico clásico. Así, muchos científicos prominentes han cuestionado los efectos que tiene la introducción de agentes de control biológico en el medio ambiente, entre ellos: Howarth (1983 y 1991); Samways (1994); y Simberloff y Stiling (1996).

En la actualidad, la especificidad de un enemigo natural se considera entre los criterios más importantes a la hora de evaluar su potencial introducción. Hawkins y Marino (1997) encontraron que el 16% de los agentes de control biológico introducidos en América del Norte han sido encontrados atacando especies nativas. Howarth y Ramsay

(1991) señalan que la poca evidencia existente de los impactos negativos al ambiente por parte de la introducción de controles biológicos es el resultado de la falta de estudios en estos aspectos antes de la liberación de cualquier organismo extraño a un nuevo ecosistema. Según Lockwood (1993), las dificultades más importantes que ha enfrentado el control biológico han sido los efectos no deseados, que posiblemente lleve a la extinción de especies, la alta tasa de fracasos y, sobre todo, la incapacidad para explicar los frecuentes fracasos. Este autor atribuyó en aquel entonces el que algunas de estas consecuencias se debían a la falta de suficientes requisitos legales para estudios de “cuarentena” previos a la liberación de los agentes de control biológico de plagas insectiles.

3. Materiales y Métodos

3.1 Crianzas de laboratorio

3.1.1 Crianza de *Hypogeococcus pungens*

En la cría de laboratorio de *Hypogeococcus pungens* se utilizaron cortes de *Alternanthera bettzickiana* Regel., de 10-12 cm, que se dejaron enraizar por 5-7 días en agua. Luego, se sembraron tres esquejes en cada tiesto de 15cm de diámetro, utilizando como sustrato PRO-MIX DX[®] suplementado con abono foliar 20-20-20 en dos ocasiones (1 x semana). Éstos, a su vez, estaban contenidos en una bandeja plástica (30 cm x 40cm x 3 cm de polipropileno) la cual tenía la suficiente agua para evitar la deshidratación de las plántulas, factor muy importante para evitar perder el material vegetativo y, más importante aún, las colonias de la chinche del cacto contenidas en ellas.

Las plántulas de dos semanas de trasplantadas fueron infestadas con 5-10 hembras grávidas de *H. pungens*, y que fueron colocadas entre los nudos y las ramitas. Ocasionalmente se suplementó la infestación de chinches con etapas inmaduras (“crawlers”), las cuales se obtuvieron de los cactus infestados. Estos “crawlers” se colectaron dando pequeños golpes al material infestado sobre una tela negra para luego ser colocados sobre las plántulas. También se colocaron, en el centro de las plántulas, pedazos de cactus (*Pilosocereus royenii* (L.) infestados con estados inmaduros de la chinche. Estos pedazos se removieron a las 48 horas. Durante 30 días, aproximadamente, las plantas

permanecieron bajo condiciones de umbráculo (25°-30° C) y aisladas en jaulas plegables de plástico y tela fina (BugDorm-2 60cm x 60cm x 60cm). (BioQuip Co., Rancho Domínguez, California), para evitar la contaminación con otras chinches, con parasitoides y con depredadores. A los 30 días, las plántulas estuvieron lo suficientemente infestadas para permitir la crianza de *Leptomastidea*.

3.1.2 Crianza de *Leptomastidea* ca. *antillicola*

La colonia inicial de *Leptomastidea* ca. *antillicola* fue tomada de muestras de cactus infestados en el campo, mayormente del refugio de Vida Silvestre de Cabo Rojo o del Bosque de la Biosfera de Guánica. Se colocaron segmentos de agallas de cactus activas en cajas plásticas con tapa. Estas cajas fueron previamente modificadas, cortando y colocando posteriormente un pedazo de tela fina en el centro de las mismas, esto para proveer aireación y evitar que se perdiera el material en poco tiempo. Cada caja se etiquetó con la fecha y lugar de colección. Para evitar lesiones durante la colección de agallas, se utilizaron guantes de tela gruesa y pinzas grandes para manejar los pedazos de cactus.

Una vez en el laboratorio, se coleccionaron utilizando un aspirador los adultos emergidos cada 24 horas y se tabuló diariamente los emergentes. Se determinó el sexo de los parasitoides utilizando las diferencias en las antenas entre el macho y la hembra y la presencia o ausencia del ovipositor (Figura 1). Luego de determinar su sexo los adultos se colocaron en jaulas colapsables de aluminio, plexiglass®, y tela ultrafina, y éstos se alimentaron con una solución 1:1 miel y agua colocada mediante jeringuilla hipodérmica

en las paredes. La solución fue colocada en el tope de plexiglass de la jaula dispersando la miel en forma de zig-zag; esto facilitó la aplicación de la miel y que la misma quedase uniforme. De esta manera se evitó que los parasitoides se quedaran pegados y murieran. El agua para hidratación de las avispillas se aplicó mediante un envase plástico con agua (25ml) semi-sellado, con un pedazo de esponja absorbente.



Figura 1. *Leptomastidea ca. antillicola* (A) Hembra, (B) Macho.

3.2 ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO Y DE CICLO BIOLÓGICO

3.2.1 Ciclo biológico

Se colocaron grupos de tres plantas de *Alternanthera bettzickiana* infestadas con chinches harinosas (*H. pungen*) en cada jaula (BugDorm-1 30cm x 30cm. BioQuip Co. Rancho Domínguez, California) por 72 horas junto a avispas hembra con “experiencia” (hembras que fueron expuestas previamente a *H. pungen* por aproximadamente 24 horas.) para una edad aproximada de 48 horas. Esta edad aseguraba, por lo general, que las hembras estuvieran en estado de gravidez. Se añadieron no menos de diez parasitoides

hembras por cada prueba. Posterior a las 72 horas, todas las plantas fueron movidas a otra jaula vacía, no sin antes revisar cada planta bajo el estereoscopio (Leica® modelo WILD MZ 8) para verificar que no quedara ningún parasitoide que pudiera alterar el experimento en progreso. Las jaulas se mantuvieron dentro de un cuarto de laboratorio, bajo iluminación artificial utilizando bombillas (GE® Ecolux 32W Daylight 6500K), un fotoperiodo 12:12, a una temperatura promedio de 27° C y 60-80% de humedad relativa.

Se revisó diariamente las jaulas que contenían las colonias de chinches. Las plantas se irrigaron dos veces por semana y se tuvieron en observación, manteniendo registro del surgimiento de progenie, anotando el día de emergencia de las avispillas y el sexo. El sexo se determinó fácilmente por medio de las diferencias que existen entre las antenas de los machos y las hembras y la presencia o ausencia del ovipositor característico de las hembras (Figura 1). Las plántulas se mantuvieron bajo observación hasta que no emergieron más parasitoides, para un total de 35 días.

3.2.2 Comportamiento de apareamiento

Se observó el comportamiento de apareamiento de *L. ca. antillicola* seleccionando 15 parejas de adultos de entre 12-24 horas de edad. Cada pareja se colocó en un frasco de cristal de 15mm diámetro x 45mm de largo con una tapa de algodón, y se observaron por periodos entre 30-60 minutos. En esta etapa se separó el comportamiento en cinco fases: (1) búsqueda, (2) encuentro y aceptación, (3) montura, (4) cópula, y (5) post-cópula. El tiempo de cada fase fue tabulado, además se describieron las fases del comportamiento de apareo en detalle.

3.2.3 Comportamiento de ovoposición

Para el estudio de comportamiento de ovoposición se utilizaron un total de 20 hembras con experiencia (hembras que han establecido contacto con machos y con *H. pungens* por más de 24hrs). Cada hembra se extrajo de la colonia y se colocó en un vial, de 15mm diámetro x 45mm de largo, con 10 chinches harinosas (*H. pungens*) de diferentes tamaños para conocer qué etapa de la plaga prefiere para su desarrollo. Igualmente se separó el proceso de ovoposición en fases y se tabuló de acuerdo al tiempo transcurrido en cada fase.

3.3 Pruebas de selección de hospederos alternos

3.3.1 Crianza de otras especies de chinches harinosas

La crianza de otras especies de chinches harinosas taxonómicamente cercanas fue necesaria para conocer la gama de hospederos alternos que *L. ca. antillicola* pudiera parasitar y así conocer su especificidad. El propósito de estas crianzas fue obtener etapas apropiadas de cada especie de chinche para exponerla a hembras grávidas de *Leptomastidea* y observar su parasitismo (ver abajo). Los pseudocóccidos usados para las pruebas de hospederos alternos de *Leptomastidea* fueron *Maconellicoccus hirsutus* (Green), *Paracoccus marginatus* (Williams and Granara de Willink), *Planococcus citri* (Risso), *Dysmicoccus brevipes* (Beardsley), *Ferrisia virgata* (Cockerell), *Nipaecoccus nipae* (Maskell), *Palmicultor* sp. Y *Puto barbieri* (Cockerell). Estas chinches harinosas se obtuvieron casi en su totalidad de material colectado en el campo, y solo *P. marginatus* fue

provista por el Departamento de Agricultura de Puerto Rico. Se utilizaron varias técnicas y varias plantas hospederas para la cría de las diferentes especies de pseudocóccidos y se usaron tubérculos de papas, plántulas de palma de coco y plantas de *Acalypha* sp.

Las especies *M. hirsutus*, *P. marginatus*, *P. citri*, *D. brevipes* y *F. virgata*, fueron criadas en tubérculos de papa y con técnicas utilizadas exitosamente por Sagarra *et al.* (2001). Las papas se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio 1% (Clorox®) por 15 min. y se dejaron secar por al menos dos horas. Las papas se cubrieron con tela negra y se colocaron en un lugar oscuro para estimular su germinación. Una vez tuvieron brotes se procedió a infestar las papas con no menos de 10 hembras grávidas de chinches harinosas. Las papas se colocaron sobre porta vasos de cartón para evitar que se dañaran; dicha técnica le proveyó una buena aeración a las papas. Luego se colocaron en jaulas plegables de aluminio, plexiglass® y tela ultrafina. Las papas se mantuvieron cubiertas con una tela negra para retrasar el crecimiento vegetativo de los brotes en las papas y de esta manera prolongar su vida útil.

Para la crianza de *N. nipae* y *Palmicultor* sp. se usaron plantas de palma de coco que se infestaron con al menos 10 hembras grávidas. Las plantas de *Acalypha* sp. se infestaron con igual número de hembras de *P. barberi*. Estas hembras permanecieron bajo condiciones de umbráculo y aisladas en jaulas plegables de plástico y tela fina (BugDorm-2), para evitar la contaminación con parasitoides.

3.3.2 Pruebas de hospedadores alternos (“two-choice test”)

En esta prueba se expuso al parasitoide a dos especies de chinches harinosas, de las cuales una de ellas siempre fue *H. pungen*. Durante 30 minutos se observó bajo el estereoscopio el comportamiento de *Leptomastidea* en presencia de dos especies de pseudocóccidos. Se utilizaron un total de 10 hembras *Leptomastidea* con experiencia. Cada hembra se extrajo de la colonia y se colocó en un frasco de vidrio de 15mm diámetro x 45mm de largo con dos especies de chinches harinosas y de diferentes estados (10 especímenes por especie) para un total de 20 chinches harinosas por ensayo.

3.3.3 Prueba en la planta huésped (“in-situ”)

Con esta prueba se le proveyó a las avispias las condiciones más parecidas a las medio ambientales. Esto se logró criando las diferentes especies de chinches harinosas en diferentes plantas hospederas y posteriormente exponiendo estas colonias al posible ataque de parasitoides. En esta prueba se utilizaron las colonias de pseudocóccidos en su huésped (papa, palma de coco y *acalypha* sp.). Estas colonias fueron expuestas a no menos de 10 hembras de *L. ca. antilicola*, por 72 horas y se realizaron tres réplicas con cada especie pseudocóccidos.

Para las colonias en papa con *M. hirsutus*, *P. marginatus*, *P. citri*, *D. brevipes* y *F. virgata* se colocaron 4 papas infestadas por réplica que contenían aproximadamente 100 especímenes. En el caso de las plantas de *Acalypha* sp., éstas se utilizaron para criar a *P. barberi* y *P. longispinus*. Se utilizaron dos plantas infestadas por réplica. Las plántulas de

palma de coco se utilizaron para criar a *N. nipae* y *Palmicultor* sp., y se utilizó una planta por réplica. Todas se mantuvieron aisladas en jaulas plegables de plástico y tela fina para evitar la contaminación con parasitoides.

3.4 Evaluación de trampas pegajosas

3.4.1 Uso de trampas pegajosas para el muestreo de *L. ca. antillicola* y los machos de *H. pungen*

Para este ensayo se seleccionó el uso de trampas pegajosas por considerarlo un método que ha probado ser eficiente en el monitoreo de enemigos naturales, y que además es fácil de implantar y tiene bajo costo. Se utilizaron dos trampas, de diferente color, “Sticky Aphid White Fly Trap” 10cm x 17.5cm y la “Sticky Leafminer Trap” 10cm x 17.5cm (Lab-Seabright) (Figura 3). Este muestreo requería la habilidad de distinguir a *Leptomastidea* dentro de la trampa pegajosa, lo cual no era difícil a pesar de su pequeño tamaño ya que sus alas tienen un distintivo patrón de marcas que es único e inconfundible (Figura 2).

Se escogieron dos áreas de *Pilosocereus royenii* infectados de aproximadamente 50 plantas cada uno, en las Reserva de Pesca y Vida Silvestre de Boquerón (Fish and Wildlife Service Refuge) en Cabo Rojo. En cada área se establecieron cuatro réplicas, cada una conteniendo los dos tipos de trampas. Éstas fueron colocadas en el tallo de un cacto, donde la trampa superior estaba aproximadamente a 2.0 m del suelo y para un total de ocho réplicas. El arreglo de las trampas dentro del área fue; plantas 1 y 3 trampa amarilla arriba

y plantas 2 y 4 trampa azul arriba. Los tallos experimentales estaban a no menos de 3 metros de distancia uno de otros, y las trampas se colocaban a la misma altura y orientación respecto al sol. Durante cuatro semanas se contó el número de *Leptomastidea*, así como los machos de *H. pungens*, para en todos los cuadrantes de las trampas pegajosas (101.6 cm²) (Figura 3). Solamente se tomaron en cuenta los cuadrantes centrales de la trampa pegajosa para efectos de muestreo para un área total muestreada de 40.34 cm² (Figura 4).



Figura 2. Bandas en las alas de *Leptomastidea*.



Figura 3. Trampas pegajosas evaluadas

3.3.2 Muestreo por 52 semanas (1 año)

Determinada la trampa más eficiente, se procedió a seleccionar 6 tallos localizados en dos áreas del bosque seco de Guánica y Cabo Rojo (3 tallos/área). Las trampas pegajosas fueron reemplazadas semanalmente durante un año. Se registro el número de *Leptomastidea*, así como el número de machos de *H.pungens*. Utilizando lupas de mano (Coddington-Magnifier-10X y 20 X). En las trampas, se utilizaron las dos líneas de cuadros centrales (40.34 cm^2) para el conteo de *Leptomastidea* y los machos de *H. pungens* de (Figura 4).

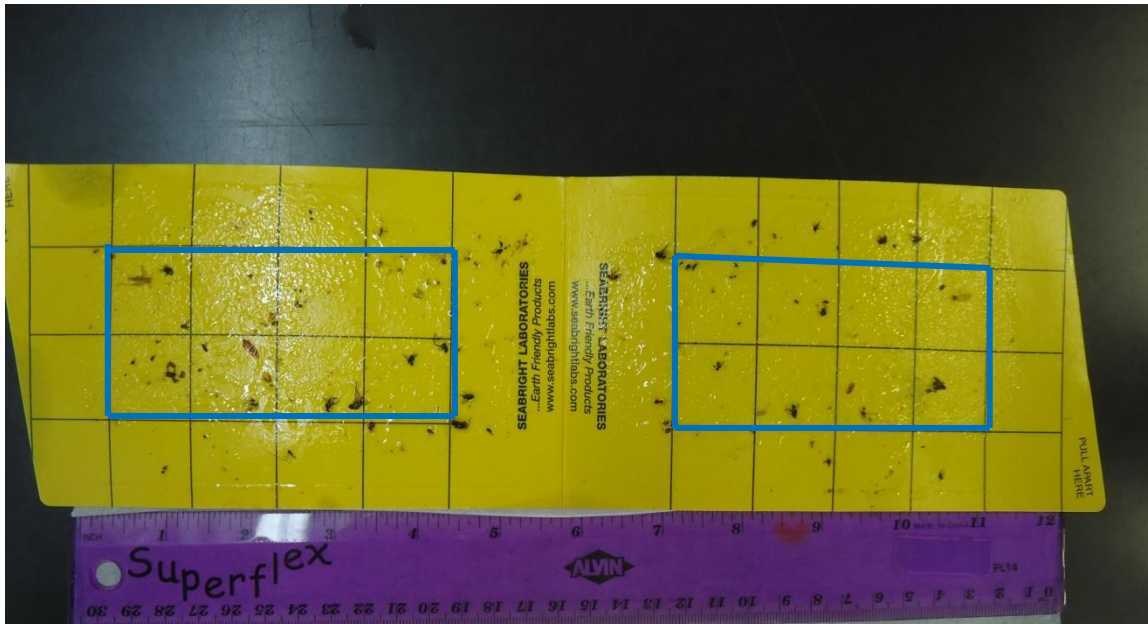


Figura 4. Área considerada (40.34 cm^2) para el conteo de *Leptomastidea* y los machos de *H. pungen*.

4. Resultados

4.1 Pruebas de laboratorio

4.1.1 Crianza hasta adulto de *L. ca. antillicola*

Durante los ensayos realizados para determinar el periodo de desarrollo del parasitoide *L. ca. antillicola*, desde oviposición hasta adulto, se encontró que el desarrollo duró entre 19 y 30 días con un promedio de 23.8 ± 5.59 días (figura 5). El 90% de los adultos, de ambos sexos, emergieron a los 25 días luego de la última ovoposición. El surgimiento de los machos fue más rápido que el de las hembras, con el 50% (mediana) de los machos emergiendo a los 21 días y el 50% de las hembras emergiendo a los 23 días. La proporción sexual estuvo ligeramente inclinada hacia la producción de hembras, con una proporción entre hembras a machos de 6:5 en individuos producidos. Una comparación con las muestras traídas del campo indicaron una proporción sexual de 7:5. No hubo diferencias significativas entre estas dos proporciones en la prueba de chi-cuadrado ($X^2=0.029$ $p>0.05$ $p=0.865$; Figura 6).

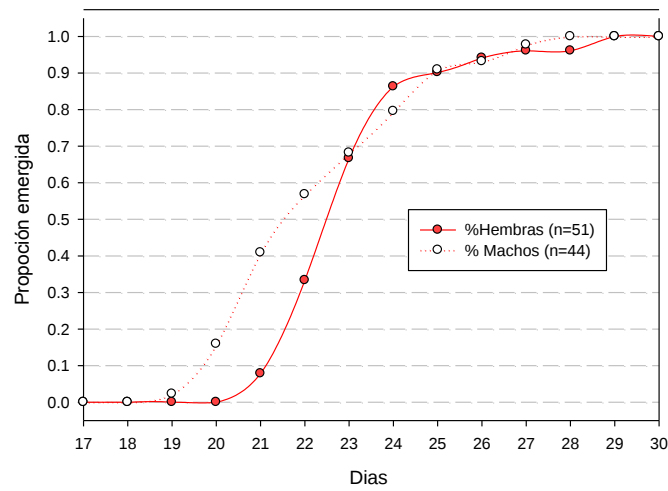


Figura 5. Proporción de machos y hembras de *L. ca antilicola* emergidos bajo condiciones de laboratorio. n=95 adultos

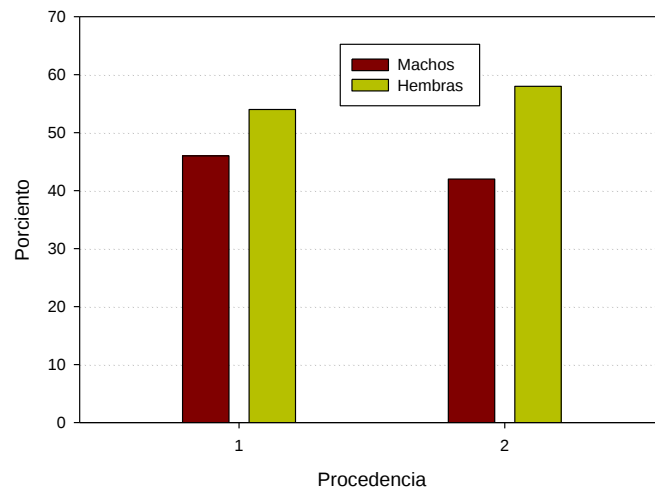


Figura 6. Comparación de proporción de sexos en adultos coleccionados del campo (1) o en el laboratorio (2)

4.1.2 Comportamiento de Apareo

Usando el mismo modelo descrito por Juang-Horng y Oetting (2006), se separó el proceso de apareo en 5 fases principales: (1) búsqueda, (2) encuentro y aceptación, (3) montura, (4) cópula, y (5) post-cópula. Se encontró que el proceso de apareamiento y cópula duran poco más de minuto y medio, con un tiempo total promedio de 1.61 ± 0.25 minutos.

Una vez en el frasco de cristal, el macho comienza a caminar velozmente, con movimientos rápidos de las antenas que al parecer usa para orientarse hacia la hembra. El periodo de la fase búsqueda resultó relativamente corto y duró en promedio solo 0.37 ± 0.16 minutos. Luego de ésta corta fase de búsqueda, se inicia la fase de encuentro, que comienza cuando el macho parece hallar a la hembra con su proximidad física, el macho se acerca lentamente por la parte trasera y comienza a palpar, con las antenas y con las patas pro-torácicas, el abdomen de la hembra. Durante esta fase, la hembra permanece generalmente inmóvil. Este periodo es todavía más corto que en la fase de búsqueda y dura en promedio 0.29 ± 0.11 minutos, y termina con la montura del macho o el rechazo por parte de la hembra.

En la siguiente fase, comenzó el proceso de montura del macho, el cual es uno rápido, pero bastante complejo por la diversidad de movimientos que realizan ambos sexos. La fase inicia cuando el macho, que en la fase anterior ya estaba posicionado en la parte trasera de la hembra, se sube sobre la hembra por la parte posterior, y rápidamente se comienza un proceso de antenación entre la pareja. Al mismo tiempo, la hembra

generalmente comienza a caminar con el macho, de menor tamaño, sobre ella y sin aparente problema. El proceso de la fase montura dura en promedio 0.10 ± 0.02 minutos. En esta fase se puede dar un proceso de rechazo que suele proceder cuando la hembra comienza a caminar rápidamente, con el macho sobre ella, lo que dificulta al macho seguir con su faena reproductiva. Por su parte, el macho rechazado, desiste de sus avances de cortejos, bajándose de la hembra y, en ocasiones, dando un salto, de sobre la hembra. Si la hembra acepta la montura comienza la fase de cópula.

La fase de cópula comienza con un cese del comportamiento de antenación. Esta fase es la de mayor duración en el proceso de apareamiento. Al comienzo, el macho flexiona su abdomen, hace contacto con la hembra por la parte abdominal e introduce su aedeago. Durante este periodo, la hembra permanece inmóvil hasta que el macho se despegando dando por concluido el proceso. El periodo de la fase de cópula dura en promedio 0.87 ± 0.19 minutos.

Una vez terminado el proceso de cópula las hembras parecen frotarse o limpiarse con las patas metatorácicas el área abdominal trasera y las alas, mientras se frota la cabeza y antenas con las patas protórnicas. En el macho no se observó ningún comportamiento de limpieza una vez terminada la cópula.

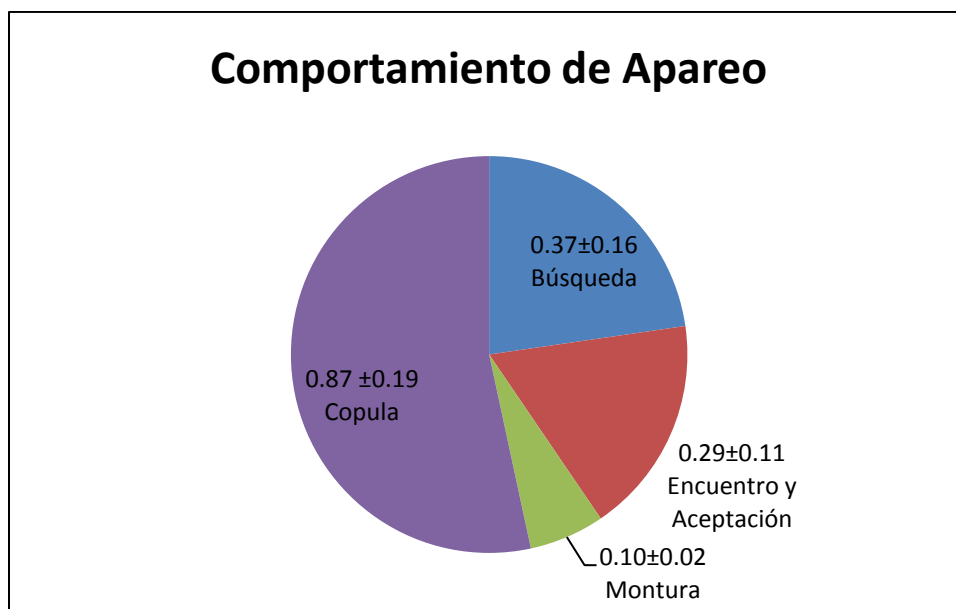


Figura 7. Tiempo promedio por cada fase de comportamiento de apareo de *Leptomastidea ca. antillicola*.

4.1.3 Comportamiento de ovoposición

Los ensayos realizados demuestran que las hembras de *L. ca. antillicola* siempre prefirieron terceros estados (35%), así como adultos pre-reproductivos de *H. pungen* (49%) para ovipositar, seguido por segundos estados (16%). No se observó parasitismo en primeros estadios.

Se describió el comportamiento de búsqueda y de ataque de *Leptomastidea* en *H. pungen*, el cual se asimila a su comportamiento de apareo. El mismo fue separado en 5 fases principales: (1) búsqueda, (2) sondeo del hospedador, (3) oviposición, (4) post-oviposición, y (5) el reposo entre ataques. Una vez en el frasco de cristal y en presencia de los potenciales hospedadores, las hembras encírtidas comienzan a caminar rápidamente por todo el frasco y comienzan a realizar un movimiento de subir y bajar las alas. En ocasiones

permanecen inmóviles, mientras flexionan su abdomen hacia arriba y hacia abajo, quizás soltando y flexionando los músculos que operan su ovipositor. Esta fase de búsqueda por el marco que presenta el frasco de cristal puede durar varios minutos y durante ese periodo la hembra continúa su rápida locomoción por el frasco, moviendo sus antenas hacia arriba y hacia abajo hasta encontrar su hospedador. El proceso de búsqueda del hospedador fue variable en duración y duró en promedio 1.21 ± 0.88 minutos.

Luego de localizar a su potencial hospedador comienza el proceso de la fase de sondeo. Durante esta fase la hembra palpa a su hospedador con las antenas y con las patas protóricas. En ocasiones la hembra se coloca sobre el hospedador para llevar acabo dicho proceso. El proceso de sondeo fue bastante corto y duró en promedio 0.26 ± 0.25 minutos, y termina en el rechazo del hospedador o con el comienzo de la ovoposición.

Una vez la hembra aparentemente determina que su presa es aceptable, comienza la fase de ovoposición. La fase inicia cuando la hembra se sube rápidamente sobre la chinche y pinchándola entre sus patas metatorácicas. Una vez la chinche está inmóvil, la hembra desenvaina y expone su ovipositor, y comienza el proceso de penetrar la cutícula de su hospedador. Una vez penetrada la chinche, el parasitoide hembra permanece relativamente inmóvil, aunque en ocasiones se les observó probando con su aparato bucal la cubierta algodonosa que cubre su huésped y la mielecilla que excretan. En 5 ocasiones se observó que el parasitoide luego de perforar a la chinche harinosa del cacto con su ovopositor *Leptomastidea* parecía alimentarse de los fluidos corporales de *H. pungens*. El proceso de ovoposición fue bastante variable y duró en promedio 0.56 ± 0.45 minutos.

Luego de finalizar la ovoposición, comienza un periodo de limpieza que se conoce como la fase de post-oviposición. Durante este periodo de tiempo la hembra limpia su cuerpo, de manera estereotipada, comenzando con el ovipositor y antes de guardarlo dentro de su abdomen. La limpieza la hace con sus patas metatorácicas. Esta limpieza está seguida por un aseo de su abdomen y las alas usando las mismas patas metatorácicas. Luego, comienza la limpieza de las antenas y la cabeza con sus patas protóraxicas. El proceso de post-ovoposición duró en promedio 0.96 ± 1.21 minutos.

Finalmente, la fase de reposo comienza cuando la hembra termina su limpieza. Durante esta fase la hembra permanece inmóvil por varios minutos, antes de continuar con su comportamiento normal de búsqueda. El proceso de reposo duro en promedio 2.68 ± 3.06 minutos. Luego de este periodo comienza nuevamente el proceso de búsqueda.

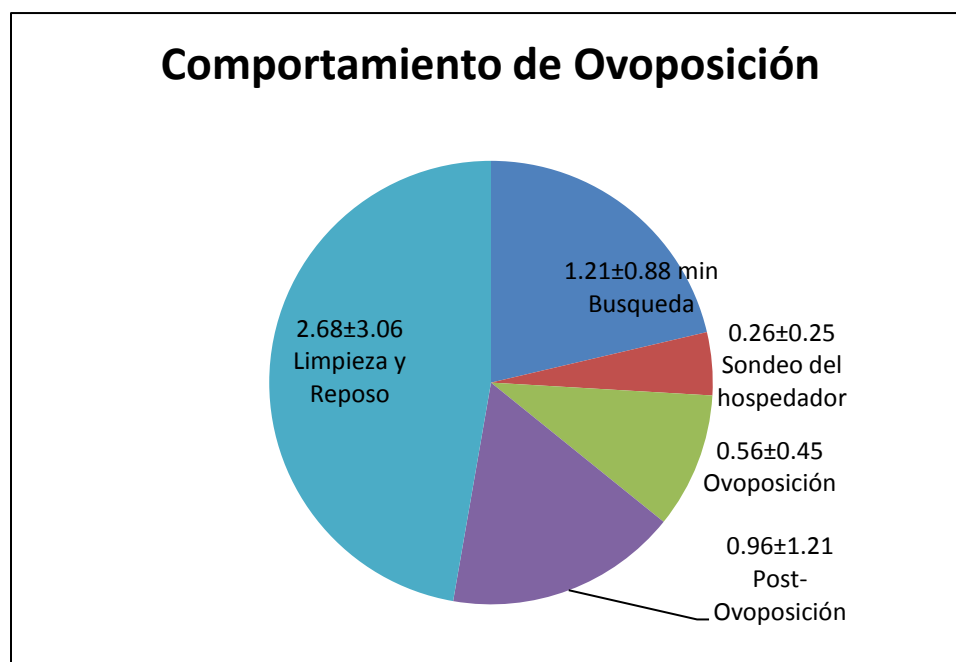


Figura 8. Tiempo promedio por cada fase del comportamiento de oviposición de *Leptomastidea ca. antillicola*.

4.2 Pruebas de especificidad

4.2.1 Prueba de hospederos alternos (“No Selección ”)

Se encontró que ninguna de las nueve especies ensayadas para determinar su susceptibilidad como hospederos alternativos de *Leptomastidea* ca. *antillicola* fue ovopositada por el parasitoide. En la mayoría de las especies, *L. ca. antillicola* solo llegó a la fase de sondeo. Ese fue el caso en los ensayos con *Dysmicoccus brevipes*, *Maconellicoccus hirsutus*, *Nipaecoccus nipae*, *Palmicultor* sp., *Paracoccus marginatus*, *Planococcus citri*, y *Puto barberi*. El parasitoide *L. ca. antillicola* se limitó a la búsqueda y sondeo, resultando en un 100% de rechazo en los 10 ensayos realizados por cada especie. En algunas ocasiones las hembras de *Leptomastidea* parecieron probar la cubierta algodonosa de algunas especies como lo fueron la de: *Nipaecoccus nipae*, *Planococcus citri* y *Puto barberi*. También, se observó que las avispiillas parecían probar la mielecilla producida por *Nipaecoccus nipae*, *Paracoccus marginatus* y *Dysmicoccus brevipes*.

La especie donde los parasitoides llegaron más lejos en su comportamiento de parasitación lo fue sobre la chinche harinosa de rabo largo, *Pseudococcus longispinus*. En esta chinche las hembras completaron las fases de búsqueda y de sondeo, pero fracasaron en sus intentos de ovopositar. Las notas de observación indican que, ante el ataque, *P. longispinus* caminaba rápidamente por el frasco de observación mientras flexionaba y contorsionaba su abdomen, evitando así que la hembra de *L. antillicola* pudiese montarle e inmovilizarle. Este tipo de comportamiento se observó en 2 de los 10 ensayos realizados con esta especie.

En el caso de *Ferrisia virgata*, que fue el hospedero reportado por Dozier (1937) en su descripción original de *L. ca. antillicola* en Puerto Rico, se esperaba que el parasitoide usara fácilmente a este posible hospedador. Sin embargo, en los ensayos se encontró que en múltiples ocasiones durante la fase de sondeo, el parasitoide se alejaba de la chinche dando un pequeño salto, o que súbitamente encogían sus antenas al tocar la chinche.

Más impresionante aún fue el hecho que en 20% de los ensayos se observó que una vez la avispa *Leptomastidea* se posaba sobre el pseudococcido *F. virgata* no podía zafarse. En otras 4 ocasiones, a las avispidas al parecer se le fracturaron las antenas ya que no podían moverlas ni mantenerlas alejadas del frasco de cristal. La repetición de la metodología experimental en una segunda ocasión corroboró estos resultados mediante el uso de otra colonia de *F. virgata*.

4.2.2 Prueba de hospederos alternos (“Two-choice test”)

En ensayos de comparaciones de cada una de la nueve especies de chinches harinosas con *H. pungen*, *L. ca. antillicola* fue siempre capaz de discriminar prefiriendo esta última sobre las demás. Solo en *H. pungen* el parasitoide completó todas las fases de comportamiento reproductivo, en cuanto a búsqueda, sondeo y ovoposición. Se observó que *H. pungen* fue la única especie que *L. ca. antillicola* parasitó y en la única que esta avispa completo su desarrollo.

En contraste, *M. hirsutus*, *Palmicultor sp.*, *P. citri* y *P. marginatus* no indujeron al parasitoide ni a la búsqueda y sondeo en presencia de *H. pungen*. Por otro lado las

especies *D. brevipes*, *F. virgata*, *N. nipae*, *P. longispinus* y *Puto barberi* sí indujeron al parasitoide a la búsqueda y sondeo; sin embargo, luego de la antenación siempre ocurrió el rechazo hacia estas especies de pseudocóccidos.

4.2.3 Prueba en la planta hospedera (“*in-situ*”)

Los resultados de las pruebas en la planta hospedera fueron cruciales, ya que esta prueba fue la que más se asimiló a las condiciones en la que los parasitoides encuentran a sus potenciales hospedadores en los ambientes naturales. Aun cuando los pseudocóccidos alternativos estuvieron anclados a su planta hospedera, no se obtuvo progenie alguna del parasitoide *L. ca. antillicola* de las nueve especies provistas al encártido. Las observaciones se realizaron diariamente durante 30 días.

4.3 Evaluación de trampas pegajosas

4.3.1 Evaluación de trampas pegajosas y muestreo de *L. ca. antillicola* y los machos de *H. pungen*s

Se evaluaron dos tipos de trampas pegajosas de diferente color (amarilla y azul) con el propósito de conocer cuál es más efectiva para el muestreo de *L. ca. antillicola*, así como de los machos de *H. pungen*s.

Se encontró que hubo diferencias significativas entre los colores de trampas evaluadas. La trampa amarilla fue la más eficaz, tanto para el muestreo del parasitoide *L. ca. antillicola*, como de los machos de *H. pungen*s. En promedio, se coleccionaron 3.97 ± 4.83 parasitoides y 2.65 ± 3.12 machos de *H. pungen*s (Figura 9). El número de individuos coleccionados en la trampa pegajosa de color azul fue significativamente menor y en promedio se obtuvieron 0.34 ± 0.83 parasitoides y 0.84 ± 1.63 de machos de *H. pungen*s.

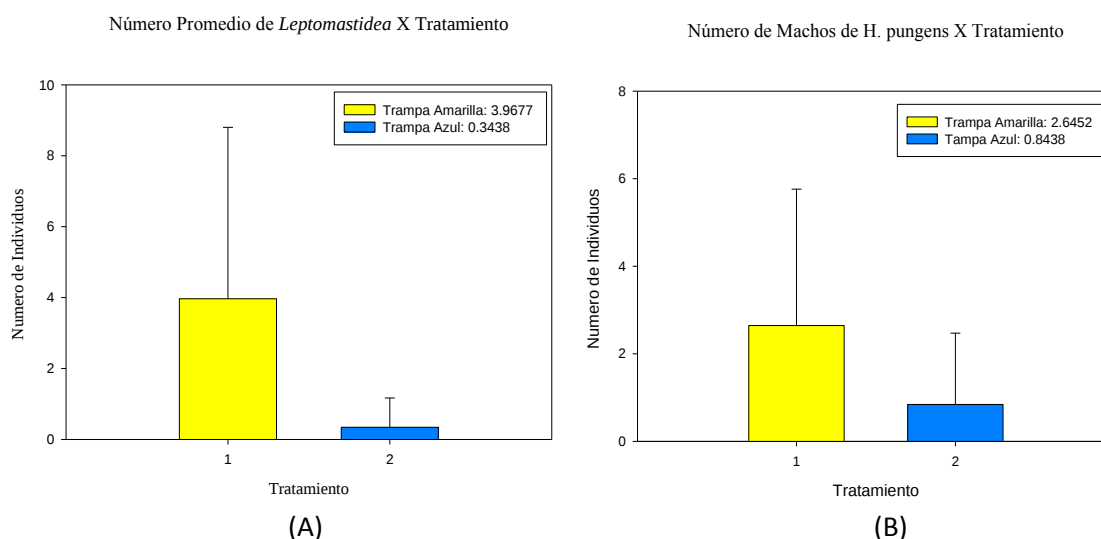


Figura 9. Número de individuos colectados en las diferentes trampas pegajosas: (A) número promedio de *Leptomastidea* (B) número promedio de machos de *H. pungen*s.

4.3.2 Números promedio de parasitoides (*L. ca. antillicola*) y machos de *H. pungens* durante 52 semanas

Este estudio de campo, que se llevó a cabo desde el 6 de noviembre de 2009 hasta el 29 de octubre de 2010, revela que entre las dos localidades evaluadas (Cabo Rojo y Guánica) los resultados fueron muy diferentes.

Durante las 52 semanas de muestreo en Cabo Rojo se obtuvo un promedio total acumulado de parasitoides de 92.44 mientras que en Guánica se obtuvo un promedio total acumulado de 2.77. Se observó (Figura 10-13) que el número de parasitoides y machos de *H. Pungens* en Cabo Rojo fue mucho mayor que en Guánica. Se encontraron (Figuras 10-13) más avispiillas en lugares donde hay mayor número de machos de la plaga hospedadora.

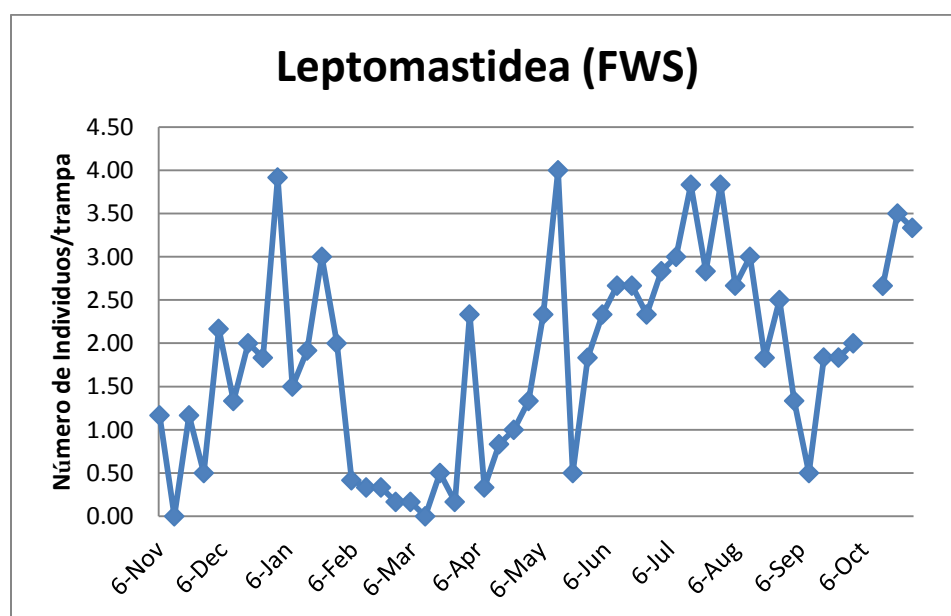


Figura 10. Fluctuaciones poblacionales de *Leptomastidea ca. antillicola* en Cabo Rojo.

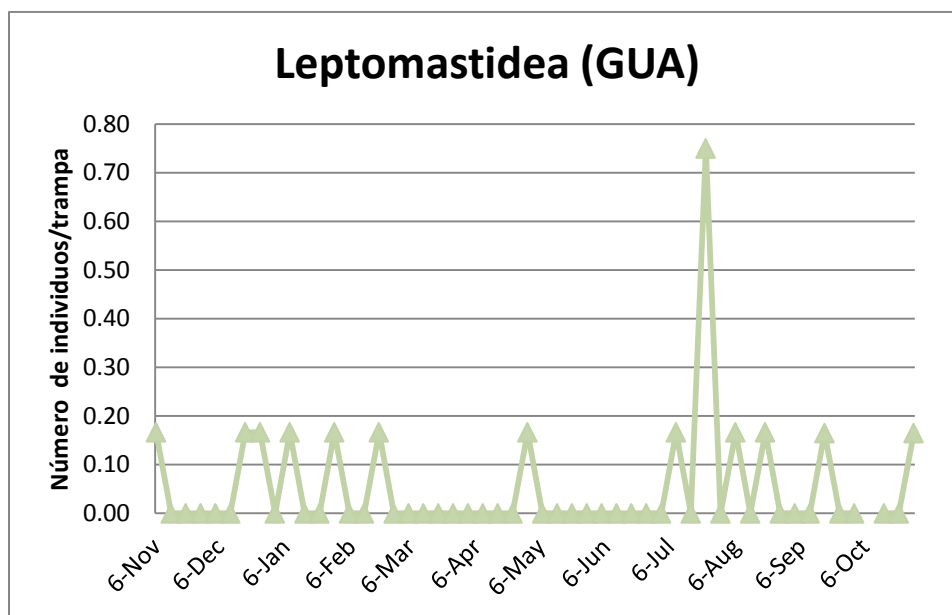


Figura 11. Fluctuaciones poblacionales de *Leptomastidea* ca. *antillicola* en Guánica.

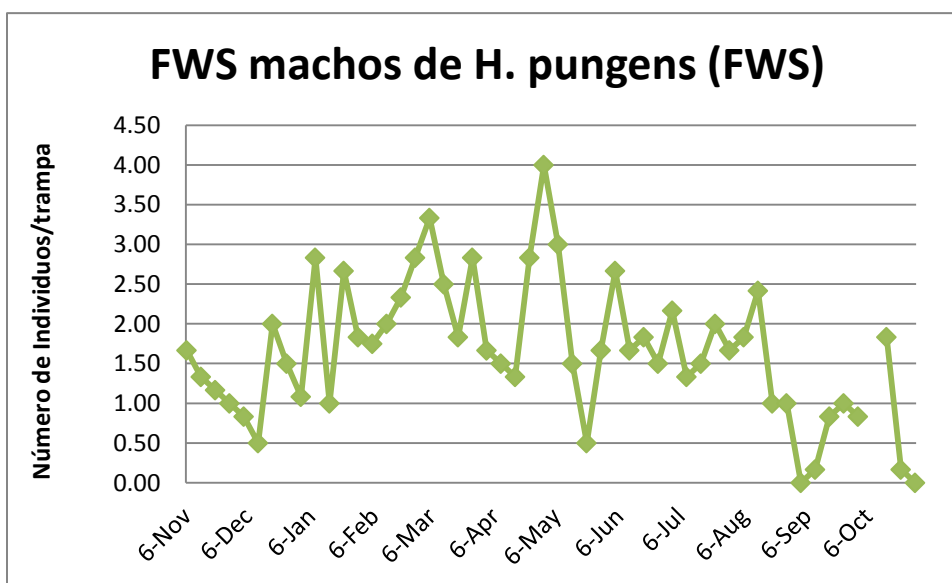


Figura 12. Fluctuaciones poblacionales de *H. pungens* en Cabo Rojo.

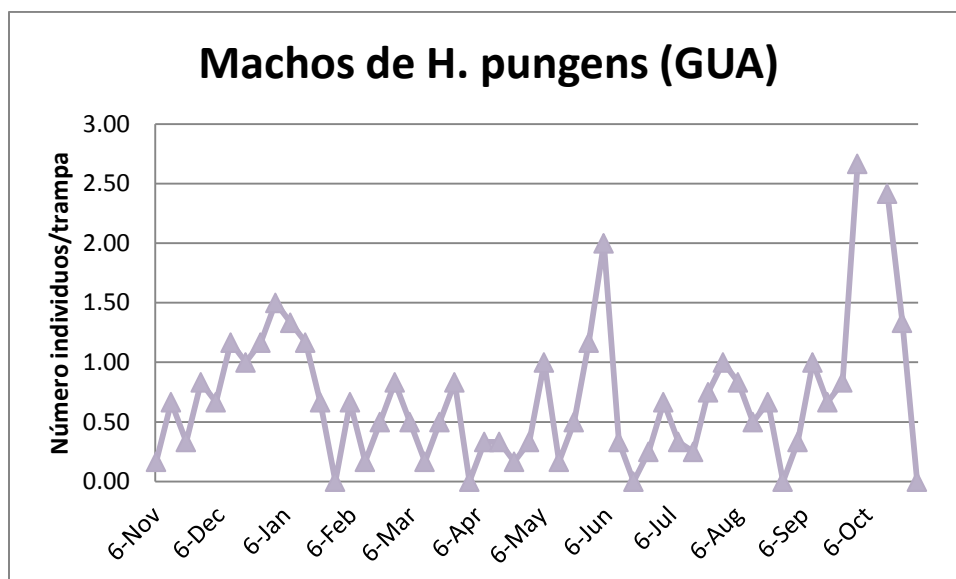


Figura 13. Fluctuaciones poblacionales de *H. pungen* en Guánica.

Se observó que las infestaciones activas del pseudocóccido son mayores en Cabo Rojo, aunque el daño más severo se puede apreciar en Guánica. Luego de inspeccionar varias agallas por cada localidad, se encontró que muchas de las agallas en Guánica están muertas, sin ningún tipo de actividad tanto de la chinche harinosa como el parasitoide. Esto puede deberse a que en Guánica las infestaciones de este chinche harinoso son más viejas en comparación con Cabo Rojo. Esto explicaría además, el por qué el daño que apreciamos hoy es mayor y que las poblaciones de la plaga se han reducido significativamente.

4.3.3 Relación Parasitoide-Hospedador

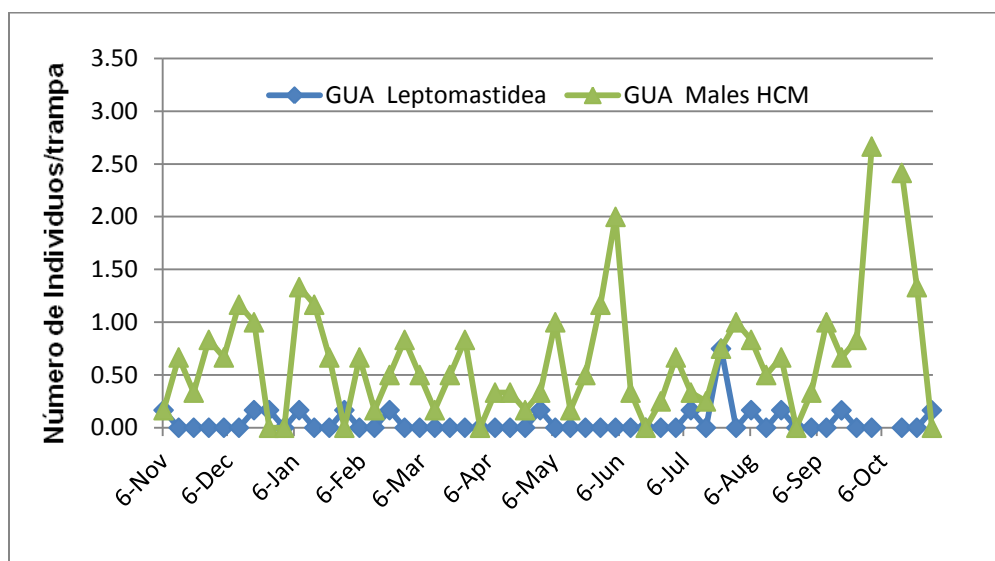


Figura 14. Relación inter-específica parasitoide-hospedador en Guánica.

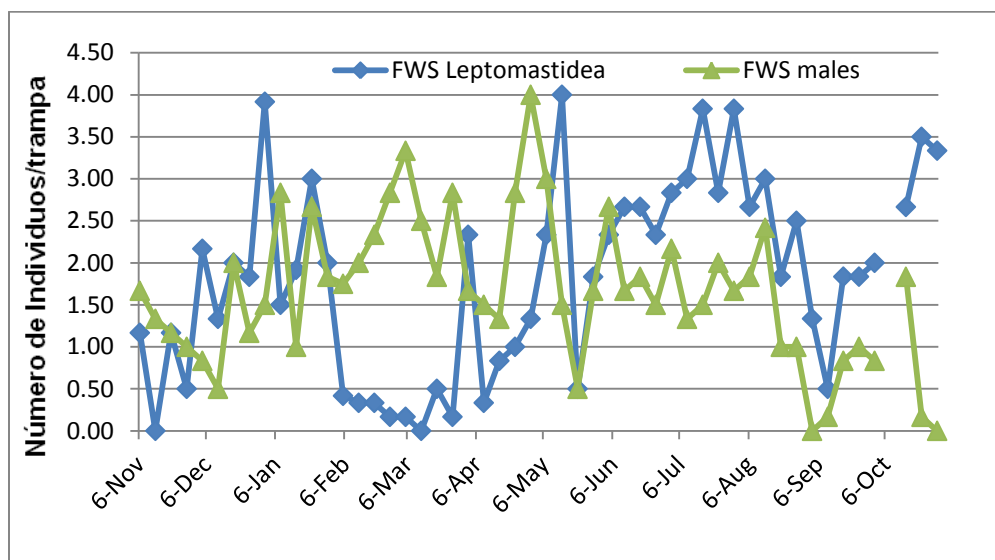


Figura 15. Relación inter-específica parasitoide-hospedador en Cabo Rojo-FWS.

El estudio de la relación inter-específica parasitoide-hospedador que existe ayudó a conocer y entender mejor si hay o no una sincronía entre los ciclos de vida de ambas especies. Se observó que en Guánica la relación parasitoide-hospedador no puede definirse claramente ya que el número de parasitoides se mantuvo casi constante. Se observó (Figura

14) algunas fechas picos de vuelos de machos, lo que sugiere que el número de parasitoides presentes en Guánica es limitado. En Cabo Rojo, se observó que hay una posible sincronía entre ambos ciclos biológicos. Podemos ver (figura 15) que a medida que aumentaba el número de machos hubo un incremento en la cantidad de parasitoides en el campo. Sin embargo, en la curva hubo una reducción significativa en la cantidad de parasitoides en Cabo Rojo y Guánica desde principios del mes de febrero de 2010 hasta finales de marzo de 2010.

5. Discusión

5.1 Estudio de desarrollo de *Leptomastidea ca. antillicola*

El estudio del desarrollo de *L. ca. antillicola* se llevo a cabo exitosamente. Esto se logro mediante la utilización de las colonias de *H. pungen* criadas en la planta hospedera del género *Alternanthera* spp. Este método de cría en la planta alternativa se diseño y perfeccionó durante esta investigación.

Se obtuvo progenie de los cuatro ensayos realizados en condiciones de laboratorio. El tiempo de desarrollo del parasitoide *L. ca. antillicola* fue muy similar al de otros encírtidos, típicamente poco menos de un mes. Por ejemplo, Sagarra *et al.* (2001) obtuvieron resultados muy similares cuando criaron al encírtido *Anagyrus kamali* Moursi bajo condiciones medioambientales similares. En este caso la progenie fue de 20-25 días después de haber expuesto las chinches harinosas a estos parasitoides.

La eclosión de parasitoides machos fue más rápido en términos de días en comparación con las hembras. Aunque es difícil determinar las causas de esta diferencia, el fenómeno parece ser común en encírtidos. Según Güleç *et al.* (2007) y Godfray (1994) puede explicarse por el tamaño de los machos, y por la ovoposición diferencial de parte de la madre que favorezca la postura de machos durante las primeras horas o días de postura de huevos. El hecho de que los machos eclosionen primero proveen una mayor posibilidad de mantener su especie. Una vez los parasitoides hembras emergen ya hay machos listos para el apareamiento lo que podría redundar en un mayor éxito reproductivo.

5.2 Estudio de Comportamiento de Apareo

El estudio del comportamiento de apareo proveyó el entendimiento de los procesos envueltos en la reproducción de este parasitoide. Este estudio fue clave para determinar cuál era el tiempo necesario para que las hembras pudieran estar grávidas y de ese modo llevar a cabo su faena de ovoposición.

5.3 Comportamiento de Ovoposición

Los resultados obtenidos en los estudios de ovoposición corresponden en gran medida al patrón de los himenópteros parasíticos. Los parasitoides himenópteros tienen que buscar y aceptar un huésped para completar su ciclo reproductivo. Una vez que el parasitoide tiene contacto físico con un potencial hospedador, éste lo evalúa para determinar si es la especie y la etapa que a de utilizar para el desarrollo de su descendencia (Van Baaren y Nenon, 1996).

Los diferentes estímulos que la hembra percibe de su hospedador suelen ser necesarios para obtener exitosamente esta cadena de comportamiento. Así, los parasitoides parecen haber evolucionado su forma de comportamiento, así como sus adaptaciones fisiológicas para discriminar entre que especies y tamaños de hospedador utilizar para dejar su descendencia y por ende poder completar su ciclo biológico (Nechols y Kikuchi, 1985). Algunos aspectos del comportamiento de ovoposición pueden estar asociados con un nivel extremo de “instinto” y tienden a ser expresados incluso en la ausencia de experiencia (Mowry *et al.*, 1989; Papaj, 1993).

El comportamiento reproductivo del parasitoide *L. ca. antillicola* fue detalladamente descrito y separado en cinco fases: (1) búsqueda, (2) sondeo del hospedador, (3) oviposición, (4) post-oviposición, y (5) el reposo entre ataques. Hay que señalar que, según Schmdith (1974), el proceso de limpieza, post-oviposición y reposo pueden ser considerados solo fases auxiliares, ya que no tienen que ver directamente con el proceso de acogida y aceptación. En este estudio se tomó en cuenta como algo importante, ya que de esto depende el éxito reproductivo por parte de los parasitoides hembras y la producción de una mayor descendencia en menor tiempo.

Se utilizó como referencia el estudio realizado por Hcidari y Jahan (2000), quienes separaron el comportamiento reproductivo del encírtido *Anagyrus pseudococci* (Girault), en fases muy similares a las que se describieron en esta investigación. El estudio de ovoposición reflejó una preferencia por parte del parasitoide a los estados más grandes de la plaga. Según Chong y Oetting (2006), el parasitoide *Anagyrus spec. nov ca. sinope*, parasitoide del chinche harinoso de Madereira, *Phenacoccus medeirensis* (Hemiptera: Pseudococcidae), exhibe un comportamiento de preferencia similar, prefiriendo terceros estadios y adultos pre-reproductivos para su desarrollo.

5.4 Estudio de hospederos alternativos

El parasitoide *L. ca antillicola* mostró un alto grado de preferencia para *H. pungen*s. Ese grado de especificidad por parte del parasitoide podría garantizar que en la utilización y liberación masiva en el campo el parasitoide irá dirigido hacia nuestra plaga objetivo *H. pungen*s. A su vez, no debería representar un riesgo potencial al medio ambiente en especial sobre las especies de chinches harinosas no objetivo (“non-target”).

De las nueve especies de pseudocóccidos ensayadas solo una mostró un comportamiento defensivo ante el posible ataque del parasitoide. Ese fue el caso *P. longispinus*. Se encontró poca literatura acerca del comportamiento defensivo en chinches harinosas en respuesta al ataque de parasitoides. Es curioso que, dada la importancia del control biológico en el combate de las chinches harinosas, se haya escrito muy poco sobre las defensas de los pseudocóccidos frente a sus enemigos naturales. La gran mayoría de los trabajos se limitan a describir la encapsulación de los huevos o etapas larvales del parasitoide por parte de la chinche harinosa (Blumberg, 1997).

Pocos trabajos informan observaciones de defensas físicas o químicas de los pseudocóccidos. Uno de los pocos ejemplos es el del pseudocóccido *Pseudococcus affinis* (Mask.) que se defiende del encírtido *Anagyrus pseudococci* (Girault) mediante movimientos violentos de su cuerpo (Hcidari y Jahan, 2000). Otro ejemplo es el de *Planococcus citri* en su interacción con el parasitoide *A. pseudococci*, en la que su capacidad de defensa aumenta en instares más maduros (Islam y Copland, 1997).

Algunas interrogantes asoman de los resultados de las observaciones realizadas a *Ferrisia virgata* durante esta investigación. Los largos filamentos característicos de *F. virgata*, al parecer, sirvieron de escudo protector ante el posible ataque por parte del parasitoide. Otro aspecto relevante es sobre la identidad taxonómica de *F. virgata*. Recientemente, Gullan *et al.* (2010) determinaron que *Ferrisia* es un género muy complejo y que específicamente en Puerto Rico pueden existir varias especies, incluyendo especies sin describir.

Asumiendo que Dozier estaba correcto en su identificación, es imposible al día de hoy saber cuál especie estudió ese autor entonces. Igualmente, dada la complejidad del género tampoco es posible saber cuál especie usamos en nuestras pruebas. Es probable entonces que en efecto hay un miembro de *Ferrisia* susceptible a *L. ca. antillicola* pero nuestros ensayos no así lo reflejan. Otra posible explicación válida es que *H. pungen*s, nuestra plaga invasora de interés, se haya introducido a nuestra isla junto con otra especie muy parecida a la descrita por Dozier, y que en realidad no estemos trabajando con *L. ca. antillicola* sino con una especie similar.

En los estudios de preferencia proveyéndole al parasitoide dos especies de chinches harinosas, siendo siempre una de ellas *H. pungen*s, no se observó que el parasitoide fuera más allá de la fase de sondeo sobre las nueve especies de chinches harinosas alternativas. Esto prueba el alto grado de especificidad por parte del encírtido *L. ca. antillicola*.

En los ensayos de comparaciones con cada una de la nueve especies de chinches harinosas junto a *H. pungen*s, *L. ca. antillicola* fue siempre capaz de discriminar

prefiriendo esta última de las demás. Solo en *H. pungen*s, el parasitoide completó todas las fases de comportamiento reproductivo, en cuanto a búsqueda, sondeo y ovoposición. Es decir que *L. ca. antillicola* fue capaz de escoger los estados preferidos de *H. pungen*s para su desarrollo, en presencia absoluta a otras especies de chinches harinosas. Se observó que *H. pungen*s fue la única especie que *L. ca. antillicola* parasitó y en la única que esta avispa completa su desarrollo.

5.5 Evaluación de trampas pegajosas

Las trampas de color amarillo fueron más efectivas para el monitoreo tanto de la plaga como de los enemigos naturales. Estos resultados confirman los obtenidos por Charles et al. (2010), quienes encontraron que las trampas pegajosas de color amarillo son efectivas para el muestreo tanto de parasitoides como de machos de pseudocócidos. Las trampas de color amarillo son un método efectivo y económico de muestreo, tanto para el parasitoide *L. ca. antillicola* como de los machos de *H. pungen*s. Mediante su uso se pudiera predecir cuándo realizar la liberación inicial de parasitoides en lugares donde éste no esté presente.

En adición, una vez liberados los parasitoides en el nuevo ambiente, se puede monitorear el establecimiento de las poblaciones y determinar si hay que reforzar el control biológico liberando más individuos en periodos específicos para mantener las poblaciones en niveles donde puedan mantener la plaga bajo el umbral de daño. De este modo se puede reducir significativamente la dispersión de la plaga en lugares de reciente introducción.

5.6 Relación parasitoide/hospedador

Concluidos los muestreos realizados por 52 semanas para conocer las fluctuaciones poblacionales del pseudocóccido *H. pungens* y el parasitoide *L. ca. antillicola*. Se pudo apreciar una relación directamente proporcional entre la densidad parasitoide-hospedador. Según Begon *et al.* (1986), existe una respuesta de agregación de parte de los parasitoides hacia sus presas en donde los parasitoides pasan mayor tiempo en lugares donde hay más hospedadores, lo que a su vez aumenta sus probabilidades de completar su ciclo biológico. Éstos pueden ser considerados factores intrínsecos de la especie, ya que son factores determinantes para la supervivencia.

En el caso de parasitoides, hay una relación directamente proporcional presas/parasitoide en donde, según aumente o disminuya el número de hospedadores, va a aumentar o disminuir las probabilidades de supervivencia. Sin embargo, en la curva hubo una baja significativa en la cantidad de parasitoides en Cabo Rojo y Guánica, desde principios del mes de febrero de 2010 hasta finales de marzo de 2010. Esto puede atribuirse a factores externos. En una investigación realizada por Tingle (1985), concluye que *L. dactylopii* es más eficiente que *L. abnormis* a temperaturas más altas, mientras que *L. abnormis* es un agente de control biológico efectivo a temperaturas más bajas. Estas diferencias pueden explicar la observación realizadas por Hennekam *et al.* (1987) en un *Stephanotis* invernadero, que *L. abnormis* desplazado *L. dactylopii* en otoño, después del control biológico exitoso por esta última especie durante el verano.

El muestreo de plagas es parte integral de cualquier programa de manejo integrado. Un programa de muestreo efectivo determina cuál es la abundancia de la plaga y de sus enemigos naturales. Además, el uso de métodos efectivos de muestreo nos ayuda a predecir daños y tomar decisiones correctas sobre el manejo de plagas y sobre la efectividad de sus enemigos naturales (Geiger y Daane, 2001). En esta investigación, la trampa de color amarillo mostró ser más efectiva para el monitoreo tanto de la plaga (*H. pungs*) como los parasitoides. Recientemente, Charles *et al.* (2010) utilizaron trampas pegajosas amarillas para el monitoreo de parasitoides de pseudocóccidos en campos de viñedo obteniendo datos representativos y fidedignos por un periodo de 17 años.

6. Conclusiones

1. Se establecieron métodos y observaciones de comportamiento necesarias para la cría de laboratorio de *Hypogeococcus pungens* y *Leptomastidea* ca. *antillicola* por primera vez.
2. El parasitoide *Leptomastidea* ca. *antillicola* se pudo reproducir bajo condiciones de laboratorio obteniendo una progenie fértil.
3. *Leptomastidea* ca. *antillicola* mostró un comportamiento reproductivo de alta especificidad para *Hypogeococcus pungens*, por lo que no debería representar un riesgo potencial el utilizarlos en programas de control biológico clásico.
4. Las trampas de color amarillo mostraron ser un método de muestreo eficaz para *H. pungens* y *L. ca. antillicola*.
5. Todas las observaciones de los ensayos de especificidad demuestran que ésta especie de *Leptomastidea* tiene un comportamiento de alta especificidad sobre *H. pungens*.

7. Referencias

Askew R. R., y M. R. Shaw. 1985 Parasitoid communities: their size structure and development. pp 225-259. En, Waage J and Greathead D (Eds) *Insects Parasitoids*. Academic Press, London.

Badii, M.H., A.E. Flores, G. Ponce, H. Quiróz, J. A. García Salas y R. Foroughbakhch. 2004. Formas de evaluar los enemigos naturales en control biológico. *Cultura Científica y Tecnológica*. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez 1(2) 3-11.

Barclay, H. J. 1987. Models for pest control: Complementary effects of periodic releases of sterile pest and parasitoids. *Theoretical Population Biology* 32:76-89.

Bartlett, B. R. y D. C. Lloyd. 1958. Mealybugs attacking citrus in California- a survey of their natural enemies and the release of new parasites and predators. *Journal of Economical Entomology*. 51: 90-93.

Beardsley, J.W. 1993. The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host relation-ships. *Acta-hortic*. Wageningen: International Society for Horticultural Science. 383–386.

Begon, M., J. L. Harper y C. R. Townsend. 1986. *Ecology: Individuals, Populations and Communities* (3 ed.). Blackwell Publishing. 1068pp.

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

Ben-Dov, Y., D. Miller y G. A. P., Gibson. 2009. ScaleNet: A database of the scale insects of the world. <http://www.sel.barc.usda.gov/SCALETNET/SCALETNET.HTM>. 2013

Bokonon-Ganta, A., H. De Groote, y P. Neuenschwander. 2002. Socioeconomic impact of biological control of mango mealybug in Bénin. *Agriculture, Ecosystem and Environment*. 93: 367–378.

Bower, J. H. 1991. Biological: Insects diseases, in insect parasite, predators. En Krischik, V. Cuperus, G. and Galliard, D. (eds.), *Management of grain, bulk commodities, and bagged products*. U.S.D.A. Coop. Extension Service. E-912, pp. 195-200.

Browning, T. O. 1959. The long-tailed mealybug, *Pseudococcus adonidurn* (L.), in South Australia. Australian Journal of Agricultural Research.10: 322-329.

Bruck, D. J. y L. C., Lewis. 1998. Influence of adjacent cornfield habitat, trap location, and trap height on capture numbers of predators and a parasitoid of the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) in central Iowa. Environmental Entomology. 27: 1557-1562.

Caltagirone, L.E. y C.B., Huffaker. 1980. Benefits and risks of using predators and parasites for controlling pests. Ecological Bulletin 31: 103-109.

Watson, G.W. and Chandler, L.R. 1999. Manual on the identification of mealybugs important in the Caribbean region. Commonwealth Science Council and CABI International.

Charles, J. G., V. A. Bell, P. L. Lo, L. M. Cole y A. Chhagan. 2010. Mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and their natural enemies in New Zealand vineyards from 1993-2009. New Zealand Entomologist. 33: 84-91

Chong, J.-H., and R. D. Oetting. 2006. Host stage selection of the mealybug parasitoid, *Anagyrus* sp. nov. nr. *sinope*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 121: 39-50.

Clausen, C. P. 1915. Mealybugs of citrus trees. California Agricultural Experimental Station Bulletin. 258, p. 19-48.

Clausen, C. P. 1978. Introduced parasites and predators of arthropod pests and weeds: a world review. USDA Agriculture Handbook, Washington, DC. 480pp.

Cox, J. M. y M. J. Pearce. 1983. Wax produced by dermal pores in three species of mealybug (Homoptera: Pseudococcidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol., 12: 235-248.

DeBach, P. 1974. Biological control by natural enemies. Cambridge University Press, London. 323 pp.

Delabie, J. H. C. 2001. Trophobiosis between Formicidae and Hemiptera Sternorrhyncha and Auchenorrhyncha): an overview. Neotropical Entomol. 30: 501-516.

Dozier, H. L. 1937. Descriptions of Chalcidoid parasites from Puerto Rico. J. Agr. Univ. Puerto Rico 21:121–135.

Ehler, L. E. 1990. Environmental impact of introduced biological control agents: implications for agricultural biotechnology. Pp. 85-96 En: Risk assessment in agricultural biotechnology, J.J. Marois and G. Breuning (Ed.) California Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland.

Flaherty, D. L., L. P. Christensen, and W. T. Lanini. 1992. Mealybugs, D. L. Flaherty, L. P. Christensen, W. T. Lanini, J. J. Marois, P. A. Phillips, y L. T. Wilson (eds.). University of California Division of Agricultural y Natural Resources Publication 3343, Berkeley, CA. pp. 159-165.

Fleming, T. y A. Valiente-Banuet. 2002. (Eds). Columnar Cacti and their Mutualists: Evolution, Ecology and Conservation. University of Arizona Press. 371 p.

Follett, P. A. y J. J. Duan. 2000. Nontarget Effects of Biological Control. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, U.S.A.

Geiger, C. A. y K. M. Daane. 2001. Seasonal movement and sampling of the grape mealybug, *Pseudococcus maritimus* (Ehrhorn) (Homoptera: Pseudococcidae), in San Joaquin Valley vineyards. Journal of Economical Entomology. 94: 291-301.

Godfray, H. C. J. 1994. Parasitoid: Behavioral and Evolutionary Biology. Princeton University Press, Princeton, NJ. 473 pp.

Goolsby, J. A. 1994. Biological Control of Longtailed Mealybug, *Pseudococcus longispinus* (Targioni-Tozzetti) (Homoptera: Pseudococcidae) in the Interior Plantscape. Texas A&M University.

Greathead, D. J. y J. K. Waage, 1983. Opportunities for biological control agricultural pest in developing countries. World Bank Technical Paper Number 11, Washington D. C. USA.

Güleç, G., A. N. Kiliçer, M. B. Kaydan y S. Ülgentürk. 2007. Some biological interactions between the parasitoid *Anagyrus pseudococci* (Girault) (Hymenoptera: Encyrtidae) and its host *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae). Journal of Pest Science. 80: 43-49.

Gullan, P. J., M. Borakaydan y N. B. Hardy. 2010. Molecular phylogeny and species recognition in the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae). *Systematic Entomology*. 35: 329–339.

Gullan, P. y J. Martin. 2003. Sternorrhyncha (jumping plant lice, whiteflies, aphids, and scale insects). *En: Encyclopedia of Insects*. s.l.: Academic Press. pp. 1079-1089.

Gullan, P.J. y M. Kosztarab. 1997. Adaptations in scale insects. *Annual Review of Entomology* 42:23–50.

Hamon, A. B. 1984. A cactus mealybug, *Hypogeococcus festerianus* (Lizer y Trelles), in Florida. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. Entomology Circular No. 263

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

Hawkins, B. A., y P. C., Marino. 1997. The colonization of native phytophagous insects in North America by exotic parasitoids. *Oecologia* 112: 566–571.

Hcidari, M. y M. Jahan. 2000. A Study of ovipositional behaviour of *Anagyrus pseudococci* a parasitoid of mealybugs. *Journal of Agricultural Science and Technology*. Vol. 2: 49-53

Heng-Moss, T. M., F. P. Baxendale, y T. P. Riordan. 1998. Beneficial arthropods associated with buffalograss. *Journal of Economical Entomology*. 91: 1167-1172.

Hennekam, M. M. B., M. Kole, K. van Opzeeland y J. J. M. van Alphen, 1987. Biological control of Citrus mealybug in a commercial crop of ornamental plants in the Netherlands. *Mededelingen van de Faculteit voor Landbouwwetenschappen der Rijksuniversiteit Gent* 52: 329–338.

Henneman, M. L. y J. Memmott. 2001. Infiltration of a Hawaiian community by introduced biological control agents. *Science* 293: 1314-1316.

Hodges, G. y A. Hodges. 2009. A mealybug, *Hypogeococcus pungens* Granara de Wilink (Insecta:Hemiptera:Pseudococcidae). Florida Department of Agriculture & Consumer Services, Division of Plant Industry.

http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures/orn/mealybug/hypogeococcus_pungens.htm.2013

Hodges, G. y A. Hodges. 2004. New invasive species of mealybugs, *Palmicultor lumpurensis* and *Chaetococcus bambusae* (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) on bamboo in Florida. Florida Entomologist. 87: 396–397.

Hoelmer, K. A., W. J., Roltsch, C. C., Chu y T. J., Henneberry. 1998. Selectivity of whitefly traps in cotton for *Eretmocerus remicus* (Hymenoptera: Aphelinidae), a native parasitoid of *Bemisia Argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). Environmental Entomology. 27:1039–1044.

Howarth, F. G. 2000. Non-target effects of biological control agents, pp. 369-403. En Gurr, G. and S. Wratten (eds.). Biological Control: Measures of Success. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Howarth, F. G. 1983. Classical biological control: panacea or Pandora's box. Proceedings of the Hawaiian Entomological Society. 24: 239-244.

Howarth, F. G. 1991. Environmental impacts of classical biological control. Annual Review of Entomology. 36: 489-509.

Howarth, F. G. y G. W. Ramsay. 1991. The conservation of island insects and their habitats. Pp. 71-107 En: The Conservation of Insects and their Habitat, N.M. Collins and J.A. Thomas (Ed.) Academic Press, London. 450 pp.

Hudson, W. G., S. K. Braman, R. D. Oetting, y B. L. Sparks. 1997. XIII. Ornamental, lawn and turf insects, pp. 21-23. En D. G. Riley, G. K. Douce, and R. M. McPherson (eds.), Summary of losses from insect damage and costs of control in Georgia 1996. The Georgia Agricultural Experiment Stations Special Publication No. 91. University of Georgia, Athens, GA.

Huffaker, C. B., C. E. Kennett y G. L. Finney. 1962. Biological control of olive scale, *Parlatoria oleae* (Colvée) in California by imported *Aphytis maculicornis* (Masi) (Hymenoptera: Aphelinidae). Hilgardia. 32: 541-636.

Islam, K. S. y M. J. W. Copland. 1997. Host preference and progeny sex ratio in a solitary koinobiont mealybug endoparasitoid, *Anagyrus pseudococci* (Girault), in response to its host stage. *Biocontrol Science & Technology*. 7: 449-456.

Jahn, G. C. y J. W. Beardsley. 1994. Big-headed ants, *Pheidole megacephala*: Interference with the biological control of gray pineapple mealybugs, p. 199–205. En David Williams ed., *Exotic ants: biology, impact, and control of introduced species*. Westview Press Inc., Boulder, CO.

Juang-Horng, C. y R. D. Oetting, 2006. Host stage selection of the mealybug parasitoid *Anagyrus* spec. nov near *sinope*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 121: 39–50

King, E. G. 1998. Perspectivas del control biológico por incremento. *Vedalia* 5: 91-95.

Klein, H. 2002. *Harrisia* cactus mealybug (*Hypogeococcus pungens*): Biological control of invasive cactus species PPRI Leaflet Series: Weeds Biocontrol, No. 2.5-3 pp.

Knipling, E. F. 1992. Principles of insect parasitism analyzed from new perspectives. Agriculture handbook No. 693. ARS-USDA. Washington D. C. USA.

Kuhlmann, U., U. Schaffner y P. G. Mason. 2005. Selection of non-target species for host specificity testing of entomophagous biological control agents. Second International Symposium on Biological Control of Arthropods. CABI International. p.566-619.

Kuhlmann, U., U. Schaffner y P. Mason. 2005. Selection of Non-target Species for Host Specificity Testing in Arthropod Biological Control Programmes. En: Bigler, F., Kuhlmann, U., Babendreier, D. (eds) *Environmental impacts of invertebrate biological control agents: methods and risk assessment*. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Legner, E. F. y A. Silveira-Guido. 1983. Establishment of *Goniozus emigratus* and *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethyridae) on navel orangeworm, *Amyelois transitella* (Lepidoptera: Phycitidae) in California and biological control potential. *Entomophaga* 28(2): 97-106.

Lockwood, J. A. 1993. Environmental issues involved in biological control of rangeland grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) with exotic agents. *Environmental Entomology* 22: 504-518.

Lynch, L. D. y M. B. Thomas. 2000. Nontarget effects in the biocontrol of insects with insects, nematodes and microbial agents: the evidence. *Biocontrol News and Information* 21: 117-130.

Maldonado, J. y S. Medina-Gaud. 1985. Insectos dañinos y benéficos de Puerto Rico (Manual de Laboratorio). Librería Universal, Ediciones Riqueñas, Puerto Rico. 20pp.

Martorell, L. F. 1945. A survey of the forest insects of Puerto Rico. Part II. *Journal of the Puerto Rico Department of Agriculture* 29: 355-608.

McFayden, R. E. 1979. The cactus mealybug *Hypogeococcus festinarius* (Hemiptera: Pseudococcidae) an agent for the biological control of *Eriocereus martini* (Cactaceae) in Australia. *Entomophaga*. 24: 281-287.

McKenzie, H. 1967. Mealybugs of California with Taxonomy, Biology, and Control of North American Species (Homoptera: Coccidae: Pseudococcidae). University of California Press, Berkeley, CA.

Meyerdirk, D. E., R. Muniappan, R. Warkentin, J. Bamba y G. V. P. Reddy. 2004. Biological control of the papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Guam. *Plant Protection. Qrtly.* 19: 110–114.

Moore, D. 1988. Agents used for biological control of mealybugs (Pseudococcidae). *Biocontrol News Info.* 9: 209-225.

Moran, V. C y H. G. Zimmermann. 1991. Biological control of cactus weeds of minor importance in South Africa. *Agricultural Ecosystem and Environment*. 37: 37-55.

Moreno, D. S., W. A. Gregory y L. K. Tanigoshi. 1984. Flight response of *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Scirtothrips citri* (Thysanoptera: Thripidae) to trap color, size, and shape. *Environmental Entomology*. 13: 935- 940.

Mowry, T. M., J. L. Spencer, J. E. Keller y J. R. Miller. 1989. Onion fly (*Delia antiqua*) egg depositional behaviour: pinpointing host acceptance by an insect herbivore. *Journal of Insect Physiology*. 35: 331-339.

Muniappan, R., D. E. Meyerdirk, F. M. Sengebau, D. D. Berringer y G. V. P. Reddy. 2006. Classical biological control of the papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in the Republic of Palau. *Florida Entomologist*. 89: 212–217.

Nechols, J. R. y R. S. Kikuchi. 1985. Host selection of the spherical mealybug (Homoptera: Pseudococcidae) by *Anagyrus indicus* (Hymenoptera: Encyrtidae): Influence of host stage on parasitoid oviposition, development, sex ratio, and survival. *Environmental Entomology*. 14: 32–37.

Neuenschwander, P. 1982. Beneficial insects caught by yellow traps used in mass-trapping of the olive fly, *Daclys oleae*. *Entomol. Exp. Appl.* 32: 286-296.

Nixon, G. E. J. 1951. The association of ants with aphids and coccids. Commonwealth Institute of Entomology. London, pp. 1–36.

North American Plant Protection Organization NAPPO. 2008. Guidelines for petition for first release of non-indigenous entomophagous biological control agents. Regional standards for phytosanitary measures, RSPM 12. <http://www.nappon.org/Standards/Authors/RSPMNo.12-authors-e.html>. 2010

Noyes, J. S. y M. Hayat. 1994. Oriental Mealybug Parasitoids of the Anagyrini (Hymenoptera: Encyrtidae). C.A.B. International on behalf of The Natural History Museum, London, 560 pp.

Papaj, D. R. 1993. Automatic behavior and the evolution of instinct: Lessons from learning in parasitoids. pp. 243- 271. *In*: D. R. Papaj, and A. C. Lewis, eds. *Insect Learning: Ecological and Evolutionary Perspectives*. Chapman and Hall, New York.

Pérez Sandi y Cuen, M., H. G. Zimmermann, J. Gulovob y S. Arias. 2006. El piojo harinoso. CONABIO. *Biodiversitas* 66: 10-11

Quezada, J. R., y P. DeBach. 1973. Bioecological and population studies of the cottoncushion scale, *Icerya purchasi* Mask., and its natural enemies, *Rodolia cardinalis* Mull. and *Cryptochaetum iceryae* Will., in southern California. *Hilgardia* 41, 631–688.

Ramos, A. A. y F. J. Serna. 2004. Coccoidea de Colombia con énfasis en las cochinillas harinosas (Hemiptera:Pseudococcidae). *Revista Facultad de Agronomía Medellín, Colombia*. 57 (2): 2383-2412.

Ranjan, R. 2006. Economic impacts of the pink hibiscus mealybug in Florida and the United States. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*. 20: 353-362.

Rebek, E. y M. Schnelle. 2009. *Arthropod Pest Management in Greenhouses and Interiorscapes*, E-1011, Oklahoma Cooperative Extension Service 15 pp.

Ricci, C. 1986. Seasonal food preferences and behavior of *Rhyzobius litura*. In Hodek 1 (ed.). *Ecology of Aphidophaga*. Academia, Prague and W. Junk, Dordrecht, pp 119-123.

Sáez, L. 2000. Parasitoides naturales de la chinche harinosa de la papaya *Paracoccus marginatus* (Williams y Granara de Willink) y parasitoides naturales e importados de la chinche harinosa rosada del hibisco *Maconellicoccus hirsutus* (Green) en dos regiones de Puerto Rico. Tesis de maestría. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez Campus. 80 pp.

Sagarra, L. A., C. Vicent y R. K. Stewart. 2001. Suitability of nine mealybug species (Homoptera: Pseudococcidae) as hosts for the parasitoid *Anagyrus kamali* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Florida Entomol.* 84: 112-116.

Samways, M. J. 1986. Spatial and temporal population patterns of *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae) parasitoids (Hymenoptera: Aphelinidae and Encyrtidae) caught on yellow sticky traps in citrus. *Bull. Entomol. Res.* 76: 265-274.

Samways, M. J. 1994. *Insect Conservation Biology*. Chapman & Hall, London. 358 pp.

Schmidt, G. T. 1974. Host acceptance behaviour of *Campoletis sonorensis* towards *Heliothis zea*. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 67: 835-844.

Segarra-Carmona A. E., A. Ramírez-Lluch, I. Cabrera Asencio y A. N. Jiménez-López. 2010. First report of a new invasive mealybug, the Harrisia cactus mealybug *Hypogeococcus pungens* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*.

SEL, 2003. Systematic Entomology Laboratory. ScaleNet
<http://www.sel.barc.usda.gov/ScaleKeys/Mealybugs/Key/Mealybugs/Media/html/GeneralInfoFSet.html>. 2013

Simberloff, D. y P. Stiling. 1996. How risky is biological control? *Ecology* 77: 1965-1974.

Simmonds, F. J. y F. D. Bennett. 1977. Biological control of agricultural pests. pp. 464-472 En: Proc. 15th International Congress of Entomology.

Sivinski, J. M. 1996. The past and potential biological control of fruit flies, pp. 369-375. En B. A. McPherson and Steck G. J. eds., *Fruit fly pests: A world assessment of their biology and management*. St. Lucie Press, Delray Beach, Florida

Smith, H. S. 1917. On the life-history and successful introduction in the United States of the Sicilian mealybug-parasite. *Journal of Economical Entomology* 10: 262-269.

Soria, P. y E. Viñuela. 2003. Las cochinillas de los pinos. *En: Terrata*. No. 27:7 p.

Stibick, J. N. L. 1997. New pest response guidelines. Pink hibiscus mealybug, *Maconellicoccus hirsutus*. USDA-APHIS.PPQ.

Strickland, A. H. 1951 (a) . The entomology of swollen shoot of cacao. II. The bionomics and ecology of the species involved. *Bulletin of Entomological Research*. 42:65-103.

Strickland, A. H. 1951(b). The entomology of swollen shoot of cacao. I. The insect species involved, with notes on their biology. *Bulletin of Entomological Research*. 41:725-748.

Takada, Y., S. Kawamura y T. Tanaka. 2001. Host preference of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) on its native host *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) after 12 continuous generations on a factitious host. *Applied Entomology and Zoology*. 36(2): 213-218.

Thomas, M. B. y A. J. Williams. 1998. Biocontrol-risky but necessary? *Trends in Ecology and Evolution* 13: 325-329.

Tingle, C. C. D. 1985. Biological control of the glasshouse mealybug using parasitic Hymenoptera. Ph.D. Thesis, Department of Biological Sciences, Wye College, University of London, 375 pp.

Trimble, R. M. y E. J. Brach. 1985. Effect of color on sticky-trap catches of *Pholetesor ornigis* (Hymenoptera: Braconidae), a parasite of the spotted tentiform leafminer *Phyllonorycter blancardella* (Lepidoptera: Gracillariidae). The Canadian Entomologist. 117(12): 1559-1564.

Trjapitzin, V. A. 2007. Brief review of species of the genus *Pseudencyrtus* with description of a new species from Moscow Province, Russia (Hymenoptera: Encyrtidae). Zoosystematica Rossica 16(2):277-279.

Trjapitzin, V. A. 2009. Review of the species of the genus *Leptomastidea* Mercet, 1916 (Hymenoptera, Encyrtidae) of the World, with description of a new species from Montenegro and with separation of a new genus from Turkmenia. Entomol. Obozrenie. 88: 164–176.

Van Baaren, J. y Nénon, J. P. 1996. Host location and discrimination mediated through olfactive stimuli in two species of Encyrtidae. Entomologia Experimentalis et Applicata, 81, 61-69.

Van Driesche, R. G. y T. S. Bellows, Jr. 1996. Biological Control. Chapman and Hall, New York. 539 pp.

Van Lenteren, J.C., J. Bale, F., Bigler, H.M.T. Hokkanen, y A.J.M. Loomans. 2006. Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. Annual Review of Entomology. 51:609–634

Viereck, H. L. 1915. Notes on the life history of a species of wasp-like parasite of the genus *Leptomastix*, parasitic on the mealybug. California State Commission on Horticulture. Monthly Bulletin 4: 208-211.

Vinson, S .B. 1976. Host selection by insect parasitoids. Annual Review of Entomology 21:109-133.

Voegelé, J. 1986. Lutte biologique en grandes cultures:les trichogrammes. *Les Colloques de l'INRA*. 34: 113-129

Wajnberg, E., J. K. Scott, y P. C. Quimby (eds). 2001. Evaluating Indirect Effects of Biological Control. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

Walton, V. M., K. M. Daane, y K. L. Pringle. 2004. Monitoring *Planococcus ficus* in South African vineyards with sex pheromone- baited traps. Crop Prot. 23: 1089-1096.

Way, M. J. 1963. Mutualism between ants and honeydew producing Homoptera. Annual Review of Entomology. 8: 307–344.

Williams, D. J. y M. Cristina Granara de Willink. 1992. Mealybugs of Central and South America. CABI International. Wallingford. 635 pp.

Wolcott, G. N. 1948. The insects of Puerto Rico. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico. 32: 1-223.

Wong, T. T. Y., M. M. Ramadan, J. C. Herr y D. O. McInnis. 1992. Suppression of mediterranean fruit fly (Diptera:Tephritidae) population with concurrent parasitoids and sterile fly release in Kula, Maui, Hawaii. J. Econ entomol. 85(5): 1671-1681.

Zimmermann, H.G., M.P.S. Cuen, M.C. Mandujano, y J. Golubov. 2010. The South American mealybug that threatens North American cacti. Cactus and Succulent Journal. 2010. 82:3.