

## Prospección de la Flavescencia dorada y de sus vectores (Hemiptera, Cicadellidae) en la zona de viñedo de Requena (Valencia)

J. ESPACIO, P. MARTÍNEZ-CULEBRAS, C. JORDÀ, A. HERMOSO DE MENDOZA

La Flavescencia dorada es una grave enfermedad de la vid causada por un fitoplasma y transmitida en campo por el cicadélido *Scaphoideus titanus* Ball, aunque también hay referencias de su transmisión en condiciones experimentales por otros cicadélidos. En España irrumpió hace pocos años por la comarca catalana de l'Empordà, desde donde se teme que pueda extenderse a otras zonas vitícolas.

Es por ello que en este trabajo se ha realizado una prospección durante el año 2000 de la enfermedad y de su vector en campo, así como de los cicadélidos presentes en varios viñedos de Requena (Valencia) utilizando trampas amarillas adhesivas. La detección de fitoplasmas (Flavescencia dorada) se realizó mediante Nested-PCR utilizando cebadores universales.

Los resultados muestran la ausencia tanto de la Flavescencia dorada como de *Scaphoideus titanus* en las parcelas prospectadas. Se han capturado 14 especies de cicadélidos, la más abundante de las cuales con gran diferencia ha sido el tiflocibino *Empoasca vitis* (Göthe), cuya gráfica de evolución poblacional se ha obtenido, presentando un máximo en la primera semana de julio.

J. ESPACIO, P. MARTÍNEZ-CULEBRAS, C. JORDÀ: Departamento Ecosistemas Agroforestales. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, 14. 46022 Valencia.

A. HERMOSO DE MENDOZA: Institut Valencià d'Investigacions Agràries. Apartat oficial. 46113 Montcada (València).

**Palabras clave:** Fitoplasmas, Flavescencia dorada, *Cicadellidae*, vid.

### INTRODUCCIÓN

La Flavescencia dorada es una grave enfermedad de la vid, causada por un fitoplasma (CAUDWELL, 1983), que desde su aparición en 1955 en Armanhac (CAUDWELL, 1957) se ha ido extendiendo por los viñedos del sur y centro de Francia y del norte de Italia (RAHOLA *et al.*, 1997), ocasionando en ellos fuertes pérdidas de cosecha e incluso la muerte (CAUDWELL, 1965). En España se introdujo en 1996 por la comarca catalana de l'Alt Empordà, desde donde se teme que pueda extenderse a otras zonas vitícolas, aunque de momento no parece haberlo hecho.

El vector natural de la Flavescencia dorada en campo es un insecto hemíptero de la familia Cicadellidae, *Scaphoideus titanus*

Ball, 1932 (SCHVESTER *et al.*, 1969), que en España se ha encontrado en varios puntos de Cataluña (RAHOLA *et al.*, 1997). Sin embargo, también se ha citado como vector de la enfermedad en condiciones experimentales (CAUDWELL *et al.*, 1972) a otro cicadélido, *Euscelidius variegatus* (Kirschbaum, 1858), que está bastante más difundido que el primero: HERMOSO DE MENDOZA y MEDINA (1979) lo encontraron en varias comarcas citrícolas valencianas.

Una de las principales zonas vitícolas valencianas es la Plana de Utiel, pero se desconocía si la Flavescencia dorada o sus vectores estaban presentes en ella. Los objetivos de este trabajo son despejar estas incógnitas por medio de una prospección, que a la vez permitirá averiguar la fauna de cicadélidos

de los viñedos de esta comarca y la evolución poblacional de sus principales especies.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La prospección se realizó en tres parcelas de viña situadas en diferentes partidas del término de Requena (La Plana de Utiel, Valencia): I, La Caseta (variedad tempranilla); II, La Pajarilla (variedad bobal); III, El Rebollar (filas alternas de tempranilla y bobal). El marco de plantación en todas ellas era de 2'50 x 2'50 m.

### 1. Prospección de Flavescencia dorada en campo:

Se realizó en mayo de 2001, buscando en las tres parcelas citadas los síntomas de la enfermedad, que son los siguientes (RAHOLA *et al.*, 1997): Las hojas se enrollan hacia el envés, se disponen en forma de tejas o escamas de pez y adquieren una coloración rojiza o amarillenta según se trate de variedades tintas o blancas. En los sarmientos no se produce la lignificación; adoptan un porte desmayado, como si fuesen de goma, dando a la cepa un aspecto llorón.

### 2. Ensayos de detección de fitoplasmas en laboratorio:

En las mismas fechas y parcelas de la prospección de Flavescencia dorada en campo se muestrearon brotes enteros, a razón de 15-20 brotes por parcela: la mitad de ellos en la fila de cepas contigua al margen de la parcela y la otra mitad en la fila situada 37'5 m hacia dentro de ella (las mismas filas en que se colocaron las trampas amarillas adhesivas utilizadas, como se verá, en la prospección de cicadélidos). En la parcela III se tomaron muestras de las dos variedades que contenía (tempranilla y bobal). Se buscaban, para muestrear, brotes que presentaran la sintomatología de la enfermedad, pero al no en-

contrarse ninguno (como se dirá en Resultados y discusión) se tomaron de aquellos que presentarían al menos amarilleos.

**Extracción del ADN:** Con el material traído del campo, conservado en frío para su traslado, se procedió a la extracción de los ácidos nucleicos de las plantas de vid a partir de 2 gr de material vegetal, recortando los nervios de las hojas. La extracción se realizó según el protocolo de PRINCE *et al.* (1993).

**Nested-PCR:** Inicialmente se amplificó el r-ADN de los fitoplasmas con la pareja de nucleótidos universales R16F2n/R2 (LEE *et al.*, 1993). De los productos de reacción se prepararon diluciones en una proporción 1:50 y se utilizaron 5 µl de esta dilución como muestra de ADN para llevar a cabo la segunda ronda de amplificación con la pareja de oligonucleótidos universales FU5/RU3 (LORENZ *et al.*, 1995).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler personal, consistiendo en 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 2 minutos a 55°C y 3 minutos a 72°C. En cada reacción se utilizó 1 unidad de enzima (Netzyme, N.E.E.D.S.L.), dNTPs a una concentración de 100 µM y los oligonucleótidos a una concentración de 0.2 µM, todo ello en el tampón de reacción suministrado por el proveedor.

En las reacciones de nested-PCR se incluyeron los controles positivos con ADN de los fitoplasmas Stolbur y Aster Yellows y los controles negativos (muestras sin ADN) resultantes de la primera y segunda ronda de amplificación.

### 3. Prospección de cicadélidos:

Se realizó a lo largo de todo el período vegetativo de la vid del año 2000, por medio de trampas amarillas adhesivas (TORRES *et al.*, 1998) formadas por una lámina de plástico amarillo de 14 x 14 cm., de la que se utilizaba una superficie de 10 x 10 cm que se cubría con una capa de un adhesivo transparente (Tangletrap, de la casa Tanglefoot). El tono amarillo de las trampas se determinó

mediante un colorímetro portátil (marca HunterLab, modelo MiniScan XE de geometría difusa, con una abertura circular para la lectura de 8,0 mm de diámetro, calibrado previamente a la medición con una teja de color blanco de sulfato de bario), obteniéndose las siguientes coordenadas Lab: L = 82,62; a = 2,79; b = 46,86.

Las trampas se colgaban verticalmente de sendas cepas. En cada una de las parcelas I y II se colocaron desde el 9 de abril hasta el 13 de mayo ocho trampas (cuatro en la fila de cepas contigua al margen de hierbas, separadas 25 m entre sí, y cuatro con la misma separación pero en una fila situada 37,5 m hacia el centro de la parcela), y desde el 13 de mayo hasta el 5 de octubre se añadieron a las trampas anteriores otras cuatro más por parcela (dos en cada fila, a las mismas distancias). En la parcela III sólo se dispusieron cuatro trampas (todas en la fila contigua al margen, a 25 m de distancia entre sí), y sólo se mantuvieron desde el 16 de abril hasta el 24 de junio en que se retiraron por no haber casi capturas al ensuciarse las trampas de tierra por el viento.

Aproximadamente cada siete días se cambiaban las trampas por otras nuevas y se llevaban al laboratorio, donde se procedía a separar los cicadélidos capturados, a identificarlos y a contarlos. Dado que la clasificación de cicadélidos se hace por el aparato genital masculino, la identificación de los machos era a nivel de especie pero la de las hembras era a nivel de subfamilia o de tribu, así como la de los individuos de sexo indeterminado (por haber perdido el abdomen, por ejemplo).

Para comparar los porcentajes de cicadélidos obtenidos según se hubieran capturado en el margen o en el centro de las parcelas, se realizó un análisis estadístico mediante una aproximación de los porcentajes a una distribución normal. En este caso, la prueba de igualdad entre las proporciones (1) y (2) es:

$$Z = \frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\sqrt{p(1-p) \left[ \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]}}$$

donde  $\hat{p}_1$  y  $\hat{p}_2$  son los porcentajes (en tanto por uno) a comparar,  $n_1$  y  $n_2$  son los valores correspondientes al total de individuos capturados en el margen y en el centro, y  $p$  es el porcentaje (en tanto por uno) obtenido como media ponderada por los efectivos  $n_1$  y  $n_2$ , es decir:

$$p = \frac{x_1 + x_2}{n_1 + n_2} \text{ donde } x_i = \hat{p}_i \cdot n_i$$

Se considera  $\hat{p}_1 \neq p_2$  si  $Z > 1,96$  (nivel de significación del 5%).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observó ninguna planta de vid con los síntomas de la Flavescencia dorada en ninguna de las parcelas muestreadas.

El análisis electroforético de la nested-PCR dio resultados negativos y solamente se observó la banda de 870 pb., indicativa de la presencia de fitoplasmas, en los controles positivos. Los resultados aportan que la zona muestreada no sólo está libre de Flavescencia dorada, según los análisis realizados, sino que, dado que los cebadores eran universales, tampoco se han detectado otros posibles fitoplasmas.

En cuanto a la prospección de cicadélidos, en la tabla 1 figuran las 14 especies que se han encontrado, agrupadas por subfamilias y tribus. No se hallan entre ellas ni el vector natural de la Flavescencia dorada en campo (*Scaphoideus titanus*) ni el vector en condiciones experimentales (*Euscelidius variegatus*). Entre las especies capturadas cabe resaltar que las dos pertenecientes a la tribu Empoascini de la subfamilia Typhlocybinæ (*Empoasca vitis* y *Jacobiasca lybica*), aunque polífagas, están citadas como plagas de la vid, sobre la que pueden causar graves daños, mientras que las especies *Circulifer tenellus* y *Circulifer haematocaps* son conocidos vectores de *Spiroplasma citri*, agente del "stubborn" de los agrios (DELLA GIUSTINA, 1989).

La importancia numérica de estas espe-

Tabla 1.—Especies de *Cicadellidae* capturadas en viñedos de Requena durante el 2000 en trampas adhesivas amarillas.

## TYPHLOCYBINAE:

## EMPOASCINI:

- *Empoasca vitis* (Göthe, 1875) [= *Empoasca flavescens* Flor, 1861]
- *Jacobiasca lybica* (Bergevin & Zanon, 1922)

## ERYTHRONEURINI:

- *Zygina flammigera* (Fourcroy, 1785)
- *Zygina hyperici* (Herrich-Schäffer, 1836)
- *Zyginidia scutellaris* (Herrich-Schäffer, 1838)
- *Frutoidia bisignata* (Mulsant & Rey, 1855)

## DELTOCEPHALINAE:

- *Circulifer haematoceps* (Mulsant & Rey, 1855)
- *Circulifer tenellus* (Baker, 1896)
- *Neotalitrus fenestratus* (Herrich-Schäffer, 1834)
- *Araldus propinquus* (Fieber, 1869)
- *Grypotes staurus* Ivanoff, 1885
- *Platymetopius rostratus* (Herrich-Schäffer, 1834)

## AGALLINAE:

- *Austroagallia sinuata* (Mulsant & Rey, 1855)

## MACROPSINAE:

- *Hephathus nanus* (Herrich-Schäffer, 1835)

cies se expresa en la tabla 2. Por un lado se indican los porcentajes de machos de cada especie capturados, de un total de 151. Por otro, figuran los porcentajes por tribus del conjunto de individuos atrapados (machos, hembras e indeterminados), que sube a 446. Tanto de machos sólo, como del conjunto de individuos, los Empoascini son los más abundantes con gran diferencia y, dentro de ellos, *Empoasca vitis* es la más numerosa (95'5% de los 111 machos de Empoascini capturados, frente a un 4'5% de *Jacobiasca lybica*).

En la tabla 3 se exponen las capturas de cicadélidos de las parcelas I y II (las que permanecieron durante todo el período vegetativo de la vid), según fueran del margen o del centro de los viñedos, agrupando por un lado a los Empoascini (que, como se ha dicho, están citados como plagas de la vid) y por otro lado a los demás Cicadellidae. Al realizar el análisis estadístico de sus porcentajes resultó que no había diferencias significativas entre la proporción de Empoascini y la de no Empoascini (ni en el centro ni en el margen). Aunque parece razo-

nable que se hubiera dado un mayor porcentaje de Empoascini en el centro de las parcelas, de los resultados obtenidos se deduce que la polifagia de los Empoascini domina sobre su capacidad de vivir sobre la vid, y por tanto se dan en la misma proporción que los demás Cicadellidae tanto junto a las hierbas del margen como en medio del viñedo.

La evolución en el tiempo de los Empoascini capturados se representa en la figura 1. Como se ha indicado anteriormente casi todos estos Empoascini pertenecen a la especie *Empoasca vitis*, y los pocos individuos observados de otra especie (*Jacobiasca lybica*) se capturaron únicamente entre el 28 de agosto y el 14 de septiembre. Se ha representado en las gráficas el número de individuos capturados por m<sup>2</sup> (de superficie de trampa) y por día, uniformizando así el número de trampas y la duración de los intervalos de recogida, para las dos parcelas (I y II) que se muestrearon durante todo el período vegetativo, distinguiendo las capturas de las trampas colocadas junto al margen (m) de las colocadas en el centro (c) de cada parcela.

Tabla 2.—Abundancia relativa de los *Cicadellidae* capturados en tres viñedos de Requena durante el 2000 en trampas adhesivas amarillas.

Especies	Machos		Individuos totales	
	Nº	%	Nº	%
EMPOASCINI: .....	111	73'5	389	87'2
<i>Empoasca vitis</i> .....	106	70'2		
<i>Jacobiasca lybica</i> .....	5	3'3		
ERYTHRONEURINI: .....	13	8'6	24	5'4
<i>Zygina flamigera</i> .....	1	0'7		
<i>Zygina hyperici</i> .....	1	0'7		
<i>Zyginidia scutellaris</i> .....	7	4'6		
<i>Frutioidia bisignata</i> .....	4	2'6		
No TYPHLOCYBINAЕ: .....	27	17'9	33	7'4
<i>Circulifer haematoceps</i> .....	3	2		
<i>Circulifer tenellus</i> .....	1	0'7		
<i>Neotalitrus fenestratus</i> .....	6	4		
<i>Araldus propinquus</i> .....	2	1'3		
<i>Grypotes staurus</i> .....	1	0'7		
<i>Platymetopius rostratus</i> .....	6	4		
<i>Austroagallia sinuata</i> .....	6	4		
<i>Hephathus nanus</i> .....	2	1'3		
TOTAL .....	151	100	446	100

Tabla 3.—Comparación entre los Empoascini y el resto de los *Cicadellidae* capturados en el margen y en el centro de dos viñedos de Requena durante el 2000 en trampas amarillas adhesivas.

Cicadellidae	Margen		Centro	
	Nº	%	Nº	%
Empoascini .....	273	71,1 a	111	28,9 a
No Empoascini .....	39	76,5 a	12	23,5 a

Los valores seguidos de la misma letra (en sentido vertical) no son significativamente diferentes.

El máximo de *Empoasca vitis* tiene lugar durante la primera semana de julio (en las dos parcelas, tanto en el margen como en el centro), lo que coincide con los resultados obtenidos por HERMOSO DE MENDOZA y MEDINA (1979) y ALVARADO *et al.* (1994) con otros dos Empoascini: *Empoasca alsiosa* Ribaut, 1933 en cítricos valencianos y *Asymmetrasca decedens* Paoli, 1932 en melocotoneros andaluces, respectivamente. TORRES *et al.* (2000), también con *Asymmetrasca decedens*, obtuvieron resultados algo diferentes, sobre todo en almendros valencianos, donde la población no bajaba como aquí tras el máximo de julio, sino que se mantenía alta con varios picos hasta octubre.

La proporción entre machos y hembras en los Empoascini capturados (básicamente *Empoasca vitis*, como ya se ha dicho) varió a lo largo del año (figura 2): al principio casi todo eran hembras, pero el porcentaje de machos fue subiendo hasta predominar por completo a principios de julio, tras lo cual volvió a bajar, estando muy igualados ambos sexos al final del período vegetativo de la vid. Este tipo de evolución es muy semejante, aunque en fechas algo distintas, al que obtuvieron ALVARADO *et al.* (1994) y TORRES *et al.* (1998) con el también empoascino *Asymmetrasca decedens*.

Fig. 1.—Evolución en el tiempo de los Emposacini (básicamente, *Emposasca vitis*) capturados durante el 2000 en trampas amarillas adhesivas situadas junto al margen (m) y en el centro (c) de dos viñedos (I y II) de Requena.

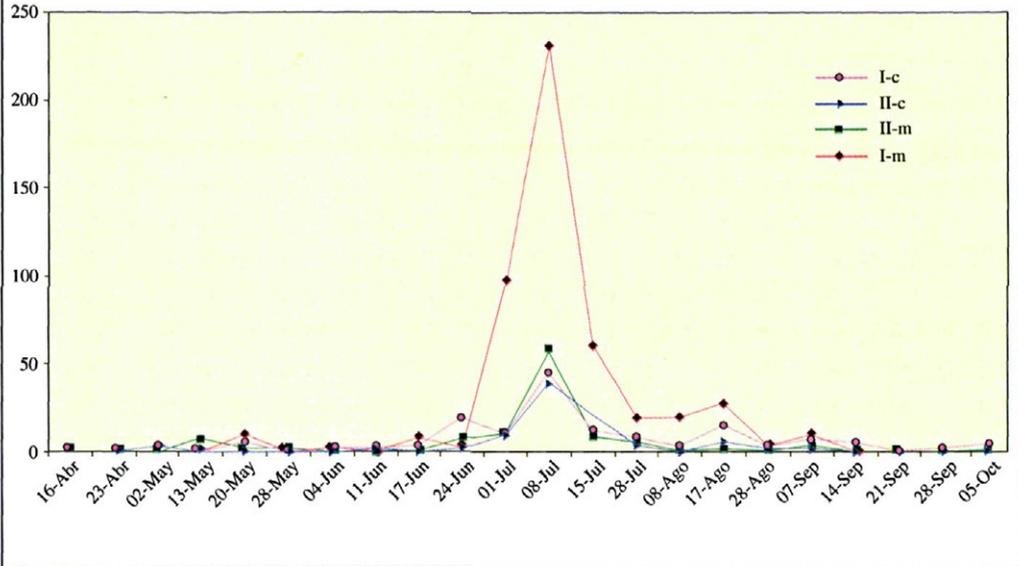
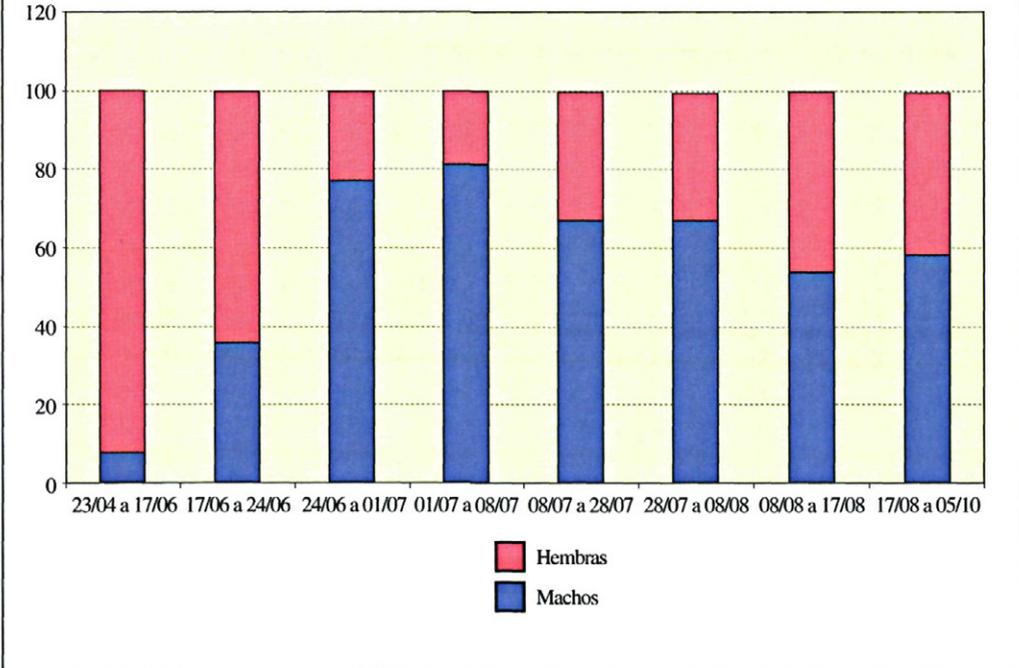


Fig. 2.—Evolución en el tiempo de la proporción entre machos y hembras de Emposacini (*Emposasca vitis*, mayoritariamente) capturados en trampas amarillas adhesivas en viñedos de Requena en el 2000.



## CONCLUSIONES

La Flavescencia dorada y sus vectores cicadélidos están ausentes de los viñedos prospectados, pero se han encontrado en ellos otras 14 especies de cicadélidos, la más abundante de las cuales es *Empoasca vitis*, que alcanza su máximo en la primera semana de julio y presenta grandes diferencias estacionales en la proporción entre sexos.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro reconocimiento a D. MANUEL HABA por su ayuda en la localización de los viñedos, al DR. EMILIO CARBONELL por su asesoramiento en el apartado estadístico, a D. VÍCTOR REAL por su ayuda en la parte informática, a D<sup>a</sup> ANA BORRÁS por la traducción al inglés y a D<sup>a</sup> MARÍA MAGDALENA VÍLCHEZ y D<sup>a</sup> MARÍA JOSÉ BLASCO por la mecanografía.

### ABSTRACT

#### PROSPECTION OF THE FLAVESCENCE DORÉE AND THEIR VECTORS (HEMIPTERA, CICADELLIDAE) IN THE AREA OF VINEYARD IN REQUENA (VALENCIA)

J. ESPACIO, P. MARTÍNEZ-CULEBRAS, C. JORDÁ AND A. HERMOSO DE MENDOZA.

The Flavescence Dorée is a severe disease of the vineyard caused by a phytoplasma and transmitted in the field by the leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball, although there are also references about their transmission in experimental conditions by other Cicadellidae. In Spain rushed into, a few years ago by the catalan area of l'Empordà from where it is thought that could expand to other viticultural areas.

It is for this that in this work was performed a prospection during the 2000 year of the disease and of its vectors in the field, as well as the leafhoppers present in several vineyards of Requena (Valencia) using sticky yellow traps. The detection of phytoplasmas (Flavescence Dorée) was performed by means of Nested-PCR using universal primers.

The results show the absence both of the Flavescence Dorée as of *Scaphoideus titanus* in the plots prospected. There were caught 14 species of Cicadellidae, the most abundant of them with great differences was *Empoasca vitis* (Göthe) whose graphic of populational evolution has been obtained, presenting a maximum in the first week of July.

**Key words:** Phytoplasmas, Flavescence Dorée, Cicadellidae, vineyard.

### REFERENCIAS

- ALVARADO, M.; VILLALGORDO, E.; BERLANGA, M.; GONZÁLEZ, E.; SERRANO, A. y DE LA ROSA, A., 1994: Contribución al conocimiento del mosquito verde (*Empoasca decedens* Paoli) en melocotonero en el Valle del Guadalquivir. *Bol. San. Veg. Plagas*, 20: 771-783.
- CAUDWELL, A., 1957: Deux années d'études sur la flavescence dorée, nouvelle maladie grave de la vigne. *Ann. Amélior. Plant.*, 4: 359-393.
- CAUDWELL, A., 1965: La Flavescence dorée, la biologie de la Flavescence dorée et les fondements des mesures préventives. *Bull. tech. inf.*, 198: 377-388.
- CAUDWELL, A., 1983: L'origine des jaunisses à mycoplasmes (MLO) des plantes et l'exemple des jaunisses de la vigne. *Agronomie*, 3 (2): 103-111.
- CAUDWELL, A.; KUSZALA, C.; LARRUE, J. y BACHELIER, J.C., 1972: Transmission de la Flavescence dorée de la fève à la fève par des cicadelles des genres *Euscelis* et *Euscelidius*. Intervention possible de ces insectes dans l'épidémiologie du Bois noir en Bourgogne. *Ann. Phytopathol.*, n° hors série: 181-189.
- DELLA GIUSTINA, W., 1989: *Homoptères Cicadellidae. Volume 3*. INRA, Paris, 350 p.
- HERMOSO DE MENDOZA, A. y MEDINA, V., 1979: Estudio inicial sobre cicadélidos (Homoptera, Cicadellidae) en los huertos de agrios del País Valenciano. *An. INIA. Ser. Prot. veg.*, 10: 43-68.
- LEE, I.M.; HAMMOND, R.W. y GUNDERSEN, D.E., 1993: Universal amplification and analysis of pathogen 16S r-DNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834-842.
- LORENZ, K.H.; SCHNEIDER, B.R.; AHRENS, U. y SEEMÜLLER, E., 1995: Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, 85: 771-776.

- PRINCE, J.P.; DAVIS, R.E.; WOLF, T.K.; LEE, I.M.; MONGEN, B.D.; DALLY, E.L.; BERTACHINI, A.; CREDI, R. y BARBA, M., 1993: Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, 83: 1130-1137.
- RAHOLA, J.; REYES, J.; GIRALT, L.; TORRES, E. y BARRIOS, G., 1997: La flavescencia dorada en los viñedos del Alt Empordà (Girona). *Bol. San. Veg. Plagas*, 23: 404-416.
- SCHVESTER, D.; CARLE, P. y MOUTOUS, G., 1969: Nouvelles données sur la transmission de la Flavescence dorée par *Scaphoideus littoralis* Ball. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 1: 445-465.
- TORRES, J.; HERMOSO DE MENDOZA, A.; GARRIDO, A. y JACAS, J., 1998: Dinámica de las poblaciones de cicadélidos (Homoptera: Cicadellidae) en almendros en el Alto Palancia (Prov. Castellón). *Bol. San. Veg. Plagas*, 24: 279-292.
- TORRES, J.; HERMOSO DE MENDOZA, A.; GARRIDO, A. y JACAS, J., 2000: Estudio de los cicadélidos (Homoptera: Cicadellidae) que afectan a diferentes especies de árboles del género *Prunus*. *Bol. San. Veg. Plagas*, 26: 645-656.

(Recepción: 14/11/01)

(Aceptado: 28/11/01)