

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



**Gestión integrada de plagas de los artrópodos implicados en el secado
de la copa en *Pinus halepensis* Miller**

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

Autor: Daniel Perea Carot

Tutor: M^a Eugènia Rodrigo Santamalia

Cotutor: M^a Isabel Font San Ambrosio

Director Experimental: Pilar Xamaní Monserrat

Septiembre 2016, Valencia



RESUMEN

Los pinos de la provincia de Valencia han ido mostrando durante los últimos meses una sintomatología peculiar, presentando zonas de la copa con acículas totalmente secas y formando manchas distinguibles a simple vista. Dados los precedentes que se tenían de otros estudios sobre fitoplasmas en pinos, se decidió analizar las acículas y los cicadélidos de los *Pinus halepensis* Miller de varias zonas de la provincia de Valencia en busca del posible fitoplasma causante del secado. Además, también se hicieron estudios de población sobre los artrópodos basándose en la presencia de los mismos en las muestras de ramillos de pino y estudios con trampas amarillas pegajosas.

Se obtuvieron muestras de veinte pies con síntomas, los cuales fueron fotografiados y georreferenciados, diez de la Devesa del Saler y otros diez de los jardines de la ciudad de Valencia. La detección del fitoplasma se realizó mediante extracción del DNA tanto de las acículas de los pinos como de los cicadélidos encontrados en las mismas, para posteriormente, mediante PCR, teñido y revelado en gel de agarosa, comprobar si en las muestras se encontraba el DNA del fitoplasma.

Los análisis de DNA resultaron negativos a la presencia de fitoplasmas tanto en acículas como en cicadélidos. Se analizaron los artrópodos presentes en los ramillos de los pinos y los insectos chupadores presentes en las trampas amarillas. Los principales insectos encontrados en los ramillos han sido cicadélidos, pulgones, trips y cochinillas diaspíridas. A partir de las trampas amarillas se realizaron curvas de vuelo las cuales han mostrado máximos de vuelo para todas las especies entre abril y mayo. Entre los artrópodos de los ramillos responsables de secado de acículas destaca la presencia de ácaros del género *Oligonychus*.

Se propone realizar podas de saneamiento en las zonas secas de la copa para estimular la brotación del árbol y, además, mejorar el aspecto estético de los árboles especialmente en jardines. Además el próximo otoño se propone la continuación del seguimiento de los daños y de las poblaciones de artrópodos presentes en las ramas, para hacer alguna actuación (química o silvícola) en cuanto aparezcan los primeros artrópodos, ya que la parte dañada del árbol no se recupera.

Palabras clave

Pinus halepensis, ácaros, pulgones, cicádulas, acículas, fitoplasma, gestión integrada de plagas.

RESUM

Els pins de la província de València han anat mostrant durant els últims mesos una simptomatologia peculiar, presentant zones de la copa amb acícules totalment seques i formant taques distingibles a simple vista. Donats els precedents que es tenien d'altres estudis sobre fitoplasmas en pins, es va decidir analitzar les acícules i els cicadèlids dels *Pinus halepensis* Miller de distintes zones de la província de València a la cerca del possible fitoplasma causant de l'assecat. A més, també es van fer estudis de població sobre els artròpodes basant-se en la presència dels mateixos en les mostres de ramets de pi i estudis amb trampes grogues apegaloses.

Es van obtindre mostres de vint peus amb símptomes, els quals van ser fotografiats i georreferenciats, deu de la Devesa del Saler i altres deu dels jardins de la ciutat de València. La detecció del fitoplasma es va realitzar per mitjà d'extracció del ADN tant de les acícules dels pins com dels cicadèlids trobats en les mateixes, per a posteriorment, per mitjà de PCR, tenyit i revelat en gel d'agarosa, comprovar si en les mostres es trobava el ADN del fitoplasma.

Les anàlisis de ADN van resultar negatius a la presència de fitoplasmas tant en acícules com en cicadèlids. Es van analitzar els artròpodes presents en els ramets dels pins i els insectes xupladors presents en les trapes grogues. Els principals insectes trobats en els branquetes han sigut cicadèlids, pugons, trips i cotxinilles diaspídides. A partir de les trampes grogues es van realitzar corbes de vol les quals han mostrat màxims de vol per a totes les espècies entre abril i maig. Entre els artròpodes dels ramets responsables d'assecat d'acícules destaca la presència d'àcars del gènere *Oligonychus*.

Es proposa realitzar podes de sanejament en les zones seques de la copa per a estimular la brotació de l'arbre i, a més, millorar l'aspecte estètic dels arbres especialment en jardins. A més, a la pròxima tardor es proposa la continuació del seguiment dels danys i de les poblacions d'artròpodes presents en les branques, per a fer alguna actuació (química o silvícola) quan apareguen els primers artròpodes, ja que la part danyada de l'arbre no es recupera.

Paraules clau

Pinus halepensis, àcars, pugons, cicadèlids, acícules, fitoplasma, gestió integrada de plagues.

ABSTRACT

Pines of province of Valencia have been showing in recent months peculiar symptoms, showing areas of the canopy with dry needles and forming spots distinguishable to the naked eye. Given the precedents that other studies it were had about phytoplasma in pines it was decided to analyze the needles and leafhoppers of *Pinus halepensis* Miller pine in various areas of the province of Valencia in search of possible phytoplasma causing drying. In addition, population studies on arthropods based on the presence of the same in the samples of pine twigs and yellow sticky traps studies were also made.

Samples of twenty trees with symptoms were taken, photographed and georeferenced, ten of the Devesa del Saler and ten of the gardens of the city of Valencia. Phytoplasma detection was performed using DNA extraction of both pine needles as leafhoppers found therein, later, by PCR, dyeing and revealed agarose gel, to check if the DNA's phytoplasma was in the samples.

DNA tests were negative for the presence of phytoplasma both needles and leafhoppers. Arthropods present on the needles and branches of pines and sucking insects on the yellow traps were analyzed. The main insects found in pines were leafhoppers, aphids, thrips and mealybugs of *Diaspididae* family. From yellow traps, flight curves which have showed maximum flight for all species between April and May they were made. Among the arthropods responsible for the drying of needles highlights the presence of mites of the genus *Oligonychus*.

It is proposed to make sanitation pruning in dry areas of the treetop to stimulate sprouting at the trees and also improve their aesthetic appearance especially in gardens. In addition, next fall it is proposed to continue monitoring the damage and populations of arthropods present in the branches, to do some action (chemical or forestry) as the first arthropods appear, as the damaged part of the tree is not recovered.

Keywords

Pinus halepensis, mites, aphids, leafhoppers, needles, phytoplasma, integrated pest management.

Agradecimientos

A Adrián del Laboratorio de Protección de Cultivos por ayudarme, enseñarme y acompañarme durante gran parte del trabajo.

A Ana y Amparo e Isabel del laboratorio de Patología Vegetal por sus enseñanzas y disposición para ayudarme en todo momento.

A Pilar, Amparo, y en general, a todo el Departamento de Ecosistemas Agroforestales por sus contribuciones en este trabajo.

A Eugènia por guiarme a lo largo de todo el trabajo y haberme ayudado y enseñado tanto.

Índice

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	El género <i>Pinus</i> y el <i>Pinus halepensis</i> Miller	1
1.2	Artrópodos que provocan secado de acículas	2
1.2.1	Ácaros (<i>Acari</i>)	2
1.2.2	Trips (Thysanoptera)	3
1.2.3	Pulgones (<i>Aphididae</i>)	3
1.2.4	Diaspídeos (<i>Diaspididae</i>)	5
1.2.5	Cicadélidos (<i>Cicadelidae</i>)	6
1.3	Fenómeno del secado de las acículas de las copas de pinos	7
1.4	Fitoplasmas	8
1.4.1	Morfología y taxonomía	8
1.4.2	Transmisión y ciclo biológico	9
1.4.3	Sintomatología producida por enfermedades causadas por fitoplasmas	9
1.4.4	Clasificación de los fitoplasmas	10
1.4.5	' <i>Candidatus Phytoplasma pini</i> '	10
2	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	12
3	MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1	Prospección de pies de <i>Pinus halepensis</i> y toma de muestras	13
3.2	Conteo e identificación de artrópodos y preparación del material vegetal para su análisis	13
3.3	Conteo de insectos chupadores en trampas amarillas pegajosas	15
3.4	Detección de fitoplasmas	16
3.4.1	Extracción del DNA total	16
3.4.2	Amplificación del DNA del fitoplasma mediante PCR	17
3.4.3	Electroforesis en gel de agarosa y revelado	18
4	RESULTADOS	20

4.1	Identificación de áfidos	20
4.1.1	Género <i>Eulachnus</i>	20
4.1.2	Género <i>Cinara</i>	20
4.1.3	Género <i>Aphis</i>	22
4.2	Estudio de artrópodos diferentes a áfidos presentes en las muestras.....	23
4.2.1	Descripción de artrópodos encontrados.....	23
4.2.2	Abundancia de artrópodos en los ramillos de los árboles de las dos zonas muestreadas.....	28
4.3	Análisis de la abundancia de insectos chupadores en 2016 mediante trampas amarillas pegajosas	29
4.4	Resultados de los análisis moleculares	31
4.5	Análisis de la sintomatología observada en los árboles en primavera y verano	34
5	DISCUSIÓN	38
6	CONCLUSIONES	41
7	BIBLIOGRAFÍA.....	42
8	ANEXOS.....	45
	ANEXO.1. Protocolo de extracción de DNA: Método KIT EZNA™	45
	ANEXO.2. Protocolo de PCR	46
	ANEXO.3. Protocolo de Electroforesis en gel de agarosa	47
	ANEXO.4. Mapas de pies con afecciones y tablas de coordenadas	48
	ANEXO.5. Tabla de muestras de acículas	50
	ANEXO.6. Tabla de muestras de cicadélidos.....	51

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Distribución de *Pinus halepensis* en la Península ibérica y en las Islas Baleares (Serrada, 2008).

Figura 2. Esquema de la alimentación de un pulgón (1). Abajo (2), corte en una planta que muestra el trayecto de los estiletes picadores marcado por las fundas residuales, y (3) aspecto del pulgón *Schizolachnus tomentosus*, huésped de los pinos (Modificado de Dajoz, 2001).

Figura 3. Desarrollo de un *Diaspididae* (*Chionaspis* sp.): (L1) primer estado larvario, (L2) segundo estado larvario, (pp) prepupa, (pu) pupa. (Modificado de Koteja, 1990).

Figura 4. Toma de muestras utilizando pértiga en la Devesa del Saler.

Figura 5. Centrifugadora utilizada en la extracción (izquierda) y muestras de DNA ya aislado en tubos *ependorf* (derecha).

Figura 6. Maza para trituración y muestras vegetales en bolsas.

Figura 7. Kit comercial EZNA™.

Figura 8. Termociclador empleado en la técnica de PCR.

Figura 9. Migración de DNA empleando la técnica de electroforesis en gel de agarosa.

Figura 10. *Eulachnus brevipilosus*, vista dorsal.

Figura 11. *Eulachnus rileyi*, vista ventral.

Figura 12. Individuo adulto de *Cinara maghrebica* sobre ramillo de *Pinus halepensis*.

Figura 13. Colonia de *Cinara maghrebica* junto con un individuo de *Eulachnus brevipilosus* (cuerpo verde) sobre ramillo de *Pinus halepensis*.

Figura 14. *Aphis* sp., vista dorsal.

Figura 15. Araña (*Araneae*), vista dorsal.

Figura 16. Pseudoescorpión (*Pseudoescorpionida*), vista dorsal.

Figura 17. Oribátidos (*Oribatida*) sobre ramillos de pino, vista dorsal.

Figura 18. *Cheyletogenes ornatus*, preparación al microscopio.

Figura 19. Trombídido (*Trombidiidae*), vista dorsal.

Figura 20. Trombídido (*Trombidiidae*), vista ventral.

Figura 21. Cicadélido (Cicadelidae), vista dorsal.

Figura 22. Diaspídido (Diaspididae), sobre una acícula de pino.

Figura 23. Diaspídido (Diaspididae), vista dorsal.

Figura 24. *Palaeococcus fuscipennis*, vista dorsal.

Figura 25. *Palaeococcus fuscipennis*, vista ventral.

- Figura 26. Psocóptero (Psocoptera), vista dorsal.
- Figura 27. Crisopa (Chrysopidae) adulta, vista lateral.
- Figura 28. Crisopa (Chrysopidae) ninfa, vista lateral.
- Figura 29. *Myrrha octodecimguttata*, vista dorsal.
- Figura 30. *Myrrha octodecimguttata*, vista ventral.
- Figura 31. *Rhyzobius chrysomeloides*, vista dorsal.
- Figura 32. *Rhyzobius chrysomeloides*, vista ventral.
- Figura 33. Trip (*Thysanoptera tubulifera*), vista dorsal.
- Figura 34. Hormiga (*Formicidae*), vista dorsal.
- Figura 35. *Oligonychus* sp. hembra, vista dorsal.
- Figura 36. *Oligonychus* sp. (hembra), vista ventral.
- Figura 37. Huevos de *Oligonychus* sp.
- Figura 38. *Oligonychus* sp. macho, vista dorsal.
- Figura 39. Curva de vuelo de cicadélidos, machos de diaspididos, moscas blancas y psilas.
- Figura 40. Curva de vuelo de áfidos.
- Figura 41. Curva de vuelo de trips.
- Figura 42. Geles de agarosa revelados con rayos ultravioletas. En la parte superior se observan los pozillos contenedores de DNA, además de los positivos y el marcador molecular.
- Figura 43. Secado de acículas en *Pinus halepensis* de la Devesa del Saler. Secado de zonas de la copa (izquierda y superior-derecha) y muestra de rama afectada por el secado (inferior-derecha). Febrero de 2016.
- Figura 44. Síntomas de secado de acículas en València. Abril 2016 (arriba) Julio 2016 (abajo).
- Figura 45. Síntomas de secado de acículas en la Devesa del Saler. Abril 2016 (arriba) Julio 2016 (abajo).
- Figura 46. Síntomas de secado de acículas en Paseo de la Alameda, Valencia. Abril 2016 (izquierda) y Julio 2016 (derecha).
- Figura 47. Síntomas muy marcados de secado de acículas en València, Julio 2016. Vista general (arriba) y vista de detalle (abajo).
- Figura 48. Mapa de los pies de *Pinus halepensis* Miller muestreados y analizados de los jardines de la ciudad de Valencia.
- Figura 49. Mapa de los pies de *Pinus halepensis* Miller muestreados y analizados de la Devesa del Saler.

Tabla 1. Especies del género *Cinara* sp. junto con la bibliografía en la que aparecen citadas sobre *Pinus halepensis*.

Tabla 2. Listado de categorías taxonómicas de las cuales se han encontrado individuos.

Tabla 3. Porcentaje de ramillos con presencia de artrópodos (resaltados aquellos porcentajes superiores al 20%).

Tabla 4. Número de insectos capturados en trampas amarillas pegajosas durante el primer semestre de 2016 en la Devesa del Saler.

Tabla 5. Muestras de acículas y resultados.

Tabla 6. Muestras de cicadélidos y resultados.

Tabla 7. Coordenadas de árboles de jardines de la ciudad de Valencia.

Tabla 8. Coordenadas de árboles de la Devesa del Saler.

Tabla 9. Muestras de acículas, códigos de identificación y resultados de presencia de fitoplasma.

Tabla 10. Muestras de cicadélidos, códigos de identificación, número de capturas por árbol y resultados de presencia del fitoplasma.

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El género *Pinus* y el *Pinus halepensis* Miller

El género *Pinus* L. está presente en toda la cuenca mediterránea, siendo el grupo con mayor distribución geográfica dentro de la familia *Pinaceae*. En la Península Ibérica y Baleares se pueden encontrar las siguientes especies de pinos: *Pinus halepensis* Mill., *P. nigra* Arnold, *P. pinaster* Ait, *P. pinea* L., *P. sylvestris* L. y *P. uncinata* Mill.

El *Pinus halepensis* Mill. es el árbol que recubre más territorio en la Comunidad Valenciana (Villanueva, 2005) de ahí la importancia de su conservación y conocimiento de patógenos que puedan provocarle daños. Los límites latitudinales de la especie van de los 31° a los 45° N, por toda la región de la costa mediterránea. En España abunda en las Islas Baleares, todas las provincias costeras del mediterráneo, además de Lérida, Aragón, Guadalajara, Cuenca, albacete y Jaén. Ocupa una superficie de 1.500.000 ha. El 23% está en la Comunidad Valenciana, el 19% en Cataluña y el 14% en Castilla-La Mancha (Figura 1).

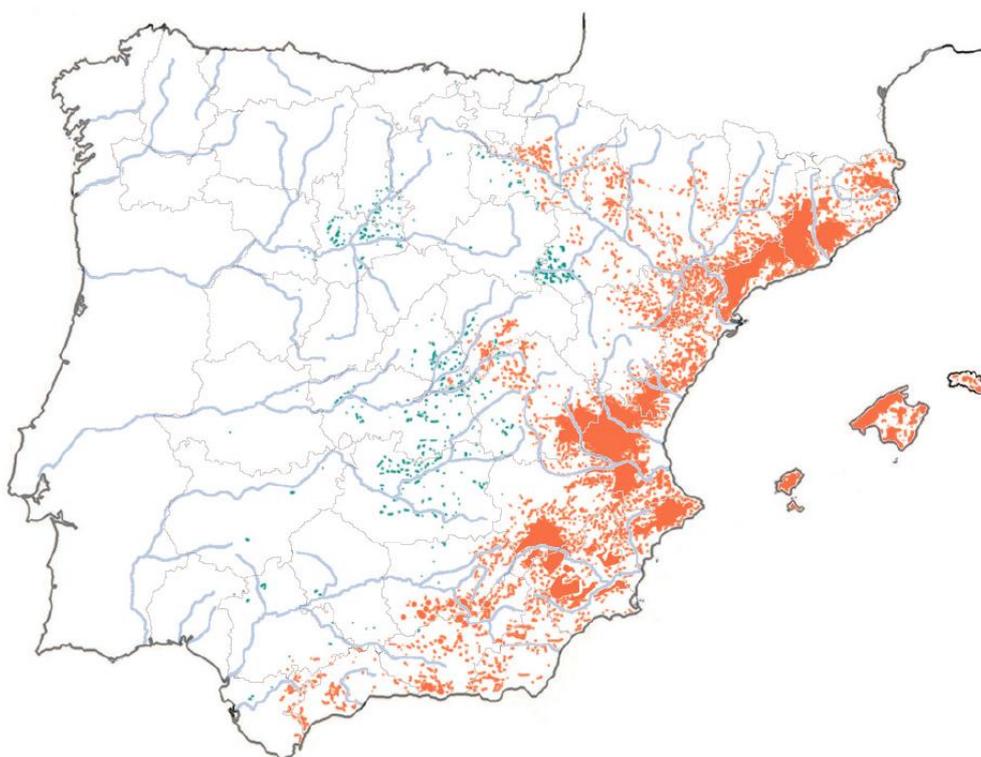


Figura 1. Distribución de *Pinus halepensis* en la Península ibérica y en las Islas Baleares (Serrada, 2008).

Se trata de una especie con requisitos hídricos y edáficos poco exigentes por lo que se adapta de forma excepcional al clima mediterráneo. Prefiere los suelos calizos, sin ser la profundidad del mismo un limitante.

Sus usos como materia prima no son demasiados debido a su rápido crecimiento y mala calidad de la madera, al tener poca densidad y dureza. Sin embargo, se puede utilizar para objetos que necesiten una menor resistencia y firmeza como cajas, embalajes y leña. No

obstante esto, su principal importancia reside en su actuación medioambiental en el entorno mediterráneo, debido a que resiste de manera muy efectiva las sequías y es una especie pionera capaz de colonizar y regenerar suelos desnudos y áridos. Además, es un pino adaptado al fuego, ya que libera sus semillas en contacto con el calor para ayudar a la dispersión y posterior regeneración en caso de incendio (Serrada, 2008).

1.2 Artrópodos que provocan secado de acículas

Son numerosos los artrópodos que habitan sobre los pinos carrascos de la Comunidad Valenciana pero solo una parte de ellos se alimenta directamente de su savia provocando daños en las acículas que van de pequeñas manchas amarillentas a la muerte completa de la acícula. A continuación se detallan los principales artrópodos que se caracterizan por esta forma de alimentación y por provocar este tipo de daños.

1.2.1 Ácaros (*Acari*)

Los ácaros son una infraclase de animales que se encuentran dentro de la clase *Arachnida*, compartiendo el filo de los artrópodos con los insectos (de Jong *et al.*, 2014). A diferencia de estos últimos, los arácnidos tienen tres pares de patas y no tienen el cuerpo dividido en cabeza, tórax y abdomen. Los ácaros son plagas comunes de bosques y jardines y se alimentan de gran variedad de árboles. Dentro de los ácaros, la familia más abundante que forma plagas son los ácaros araña o tetraníquidos (familia *Tetranychidae*) (Godfrey, 2011), la cual se detalla a continuación.

Los tetraníquidos se ven a simple vista tras un fondo que cree contraste como puntos que se mueven. Con una lupa de diez aumentos es posible verlos, pudiéndose ver las hembras más grandes con mayor facilidad dado su mayor tamaño. El nombre de ácaros araña proviene de la seda que éstos producen sobre las hojas que infectan. Además se les puede diferenciar del resto de ácaros por las dos rayas longitudinales que tienen sobre el cuerpo (Godfrey, 2011).

Las hembras tienen un mayor tamaño que los machos, manchas oscuras a ambos lados del cuerpo y pelos sobre el cuerpo y patas. Las larvas recién nacidas tienen solo seis patas y el resto de estadios inmaduros son similares a los machos pero de mayor tamaño. Los huevos son esféricos con forma de gota achatada, translúcidos llegando a adquirir tonalidades rojizas antes de la eclosión (Godfrey, 2011).

Los tetraníquidos se alimentan de las coníferas tan fácilmente como lo hacen de árboles de hoja ancha. Pueden causar graves daños en primavera y a principios de verano y de nuevo en el otoño. El clima demasiado cálido y seco puede provocar un marcado cese de su actividad. Conforme se van alimentando van destruyendo las células superficiales de las hojas, lo cual provoca su amarilleamiento y posterior secado y caída prematura. En ocasiones, las plagas de este tipo de ácaros se producen por el uso incorrecto de plaguicidas que matan los enemigos naturales de los ácaros, haciendo que sus niveles de población aumenten de manera descontrolada. En Canadá y Estados Unidos las especies del género *Oligonychus* sp. son las que causan más daños estando presentes sobre numerosos hospedantes: picea, sabinas, enebros, pinos, alerce siberiano, abeto de Douglas, thuja y, en ocasiones, otros tipos de coníferas (Puchalska, 2006).

1.2.2 Trips (Thysanoptera)

Para la descripción de los trips, biología y daños se ha utilizado la bibliografía de Bethke *et al.* (2014).

Los trips, pertenecientes al orden *Thysanoptera*, son insectos muy pequeños (0,1 mm), alargados, delgados y con los dos pares de alas con flecos en los extremos. Los inmaduros carecen de alas. Pueden presentar desde colores claros y amarillentos hasta muy oscuros llegando a ser prácticamente negros.

Por lo que respecta al ciclo biológico, estos insectos nacen a partir de huevo y pasan por dos estados larvarios, pupa y prepupa, antes de convertirse en adultos. Las hembras de la mayoría de las especies ponen sus huevos en brotes u hojas donde las larvas puedan alimentarse. Las pupas pueden caer en la hojarasca o en el suelo para seguir alimentándose o pueden quedarse en la planta alojándose en grietas y formando agallas. Tienen un ciclo de vida bastante corto, pudiendo haber hasta ocho generaciones en el mismo año, y si las condiciones de temperatura son lo suficientemente cálidas puede completarse el desarrollo del insecto en dos semanas.

Son insectos con aparato bucal picador-chupador, por lo que se alimentan de las células del floema atravesando la epidermis de la planta. Estas picaduras pueden provocar la aparición de puntos, moteado amarillento, cicatrices en la planta y deformaciones en el crecimiento. Pueden dañar la fruta, hojas y brotes de las plantas y afectar de manera sensible a la apariencia estética de las mismas. Sin embargo, rara vez matan o amenazan la supervivencia de los árboles y arbustos. Las herbáceas ornamentales y ciertos tipos de cultivos sí son más susceptibles de sufrir mayores daños por parte de los trips y por los virus de los que estos son vectores, como el que afecta a las plantaciones de tomate. Además, también pueden ser vectores de esporas de hongos, al alimentarse sobre ellos. Sin embargo, los trips también pueden ser beneficiosos en el control de plagas debido a que se alimentan de ciertos insectos y ácaros. Su forma de propagación puede ser mediante la acción del viento o transportados en plantas infestadas.

El control sobre los trips que se convierten en plaga está estrechamente relacionado con su identificación, puesto que ciertas especies solo aparecen sobre determinados hospedantes. Del mismo modo, una misma especie que habita varios hospedantes puede que no se alimente de todos ellos, pudiendo considerarse plaga sobre unos hospedantes y sobre otros no.

1.2.3 Pulgones (*Aphididae*)

Los áfidos o pulgones son un grupo muy grande de insectos pequeños, de cuerpo blando y por lo general gregarios, que chupan la savia de hojas, tallos o raíces de plantas y árboles. El cuerpo de los áfidos generalmente tiene forma de pera; tienen antenas relativamente largas y un par de estructuras con forma tubular denominados sifones que se originan en la parte superior del quinto o sexto segmento abdominal. Existen formas aladas y no aladas. Las alas de los áfidos son frágiles, membranosas, prácticamente sin venas y se mantienen verticalmente sobre el cuerpo durante el reposo (Coulson & Witter, 1990).

Los ciclos de vida de los áfidos son muy variables, varían de simples a complejos con hospedantes alternos, generaciones aladas y no aladas, así como generaciones asexuales y sexuales. Se caracterizan por tener, en ocasiones, generaciones partenogénicas dependiendo del estado de salud de la planta hospedante. La partenogénesis es un tipo de reproducción sexual mediante la cual una célula reproductora forma un nuevo individuo sin la necesidad de que se produzca fecundación. De esta forma, los pulgones pueden formar generaciones con miles de individuos que son copias genéticas unos de otros. Una vez que el nivel de afectación del hospedante aumenta y éste deja de ser habitable para las nuevas generaciones, éstas empiezan a ser aladas para que los nuevos insectos puedan migrar de hospedante. Muchas especies invernan en el estado de huevo hasta que se dan las condiciones idóneas para abandonarlo.

En la comunicación entre los individuos de una colonia de pulgones intervienen los sifones. A pesar de que no se conoce con demasiada exactitud su función, se sabe que algunas especies generan productos químicos que actúan como sustancias de alarma que contienen triglicéridos que sirven para defenderse de sus enemigos. Además, también contienen otras sustancias que utilizan para alertar al resto de individuos y que abandonen el hospedante (Dajoz, 2001).

Los pulgones se alimentan a través de su estilete absorbiendo la savia que circula por el floema de la planta (Figura 2). Toda la savia que consumen no es digerida, puesto que es una mezcla de nutrientes, vitaminas y minerales, y no todos ellos son absorbidos por el individuo. La sustancia de desecho que segregan por el ano se denomina melaza. Esta puede quedar sobre hojas, tallos y ramas. La melaza puede servir de alimento para ciertos insectos como abejas e incluso hormigas, viviendo estas últimas en muchas ocasiones en simbiosis con los pulgones. Esta simbiosis se basa en que las hormigas se alimentan de la melaza excretada por los pulgones y éstos gozan de su protección frente a depredadores como pueden ser los coccinélidos. Sin embargo, algunas relaciones de simbiosis entre estos dos tipos de insectos pueden ser tan estrechas y efectivas que pueden causar graves daños en algunas especies vegetales, dado que aumenta la supervivencia de los pulgones. Además, si la cantidad de melaza es abundante se crea una capa brillante característica que deseca las hojas debido a la presión osmótica producida por la cantidad de sales acumulada en el exterior de las células (Dajoz, 2001).

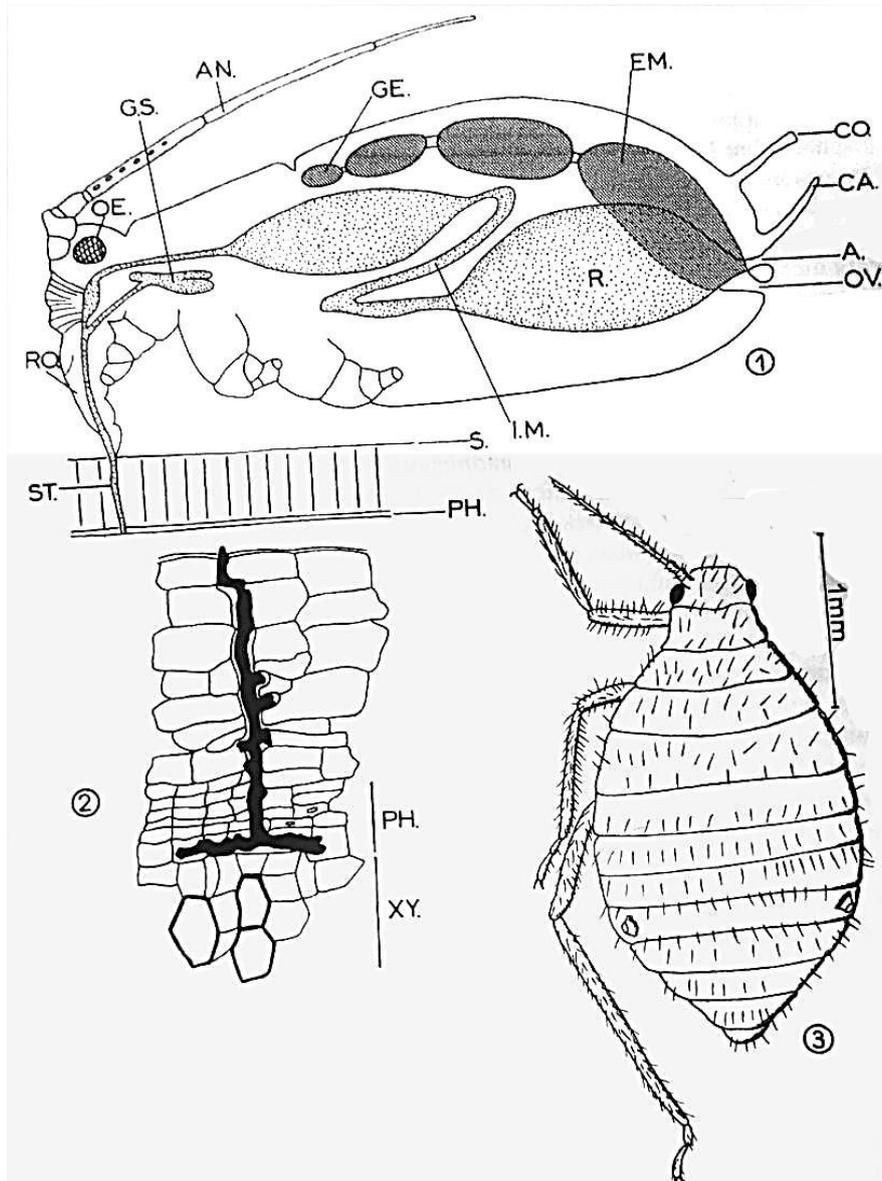


Figura 2. Esquema de la alimentación de un pulgón (1). Abajo (2), corte en una planta que muestra el trayecto de los estiletes picadores marcado por las fundas residuales, y (3) aspecto del pulgón *Schizolachnus tomentosus*, huésped de los pinos (Modificado de Dajoz, 2001).

Más adelante se tratarán las especies de áfidos encontradas en las muestras vegetales analizadas y su proceso de identificación.

1.2.4 Diaspídidos (*Diaspididae*)

Los diaspídidos son una familia de insectos perteneciente al orden de los hemípteros. Su biología tiene un marcado dimorfismo sexual que hace distinguir a las hembras de los machos a simple vista (Figura 3).

Las hembras son siempre ápteras e inmóviles, con un escudo céreo que las recubre. A lo largo de su ciclo para por tres estados de desarrollo diferentes, los cuales comprenden dos estados larvarios y un estado adulto. Al salir del huevo, la larva recién nacida realiza una muda para transformarse en una larva de segundo estado, la cual mudará para convertirse en una hembra

adulta. La metamorfosis de la hembra podría ser clasificada como heterometábola, ya que los estados larvarios son muy similares a los estados adultos.

En cambio, el ciclo biológico del macho pasa por cinco estados evolutivos, los dos primeros son muy similares a los de la hembra, sobretodo el primero de ellos, pero después de la segunda muda, la larva se transforma en prepupa, la cual constituye el tercer estado de desarrollo. La prepupa llevará a una pupa, correspondiéndose con el cuarto estado de desarrollo, del cual saldrá el macho adulto que se corresponde con el quinto y último estado de desarrollo (Koteja, 1990).

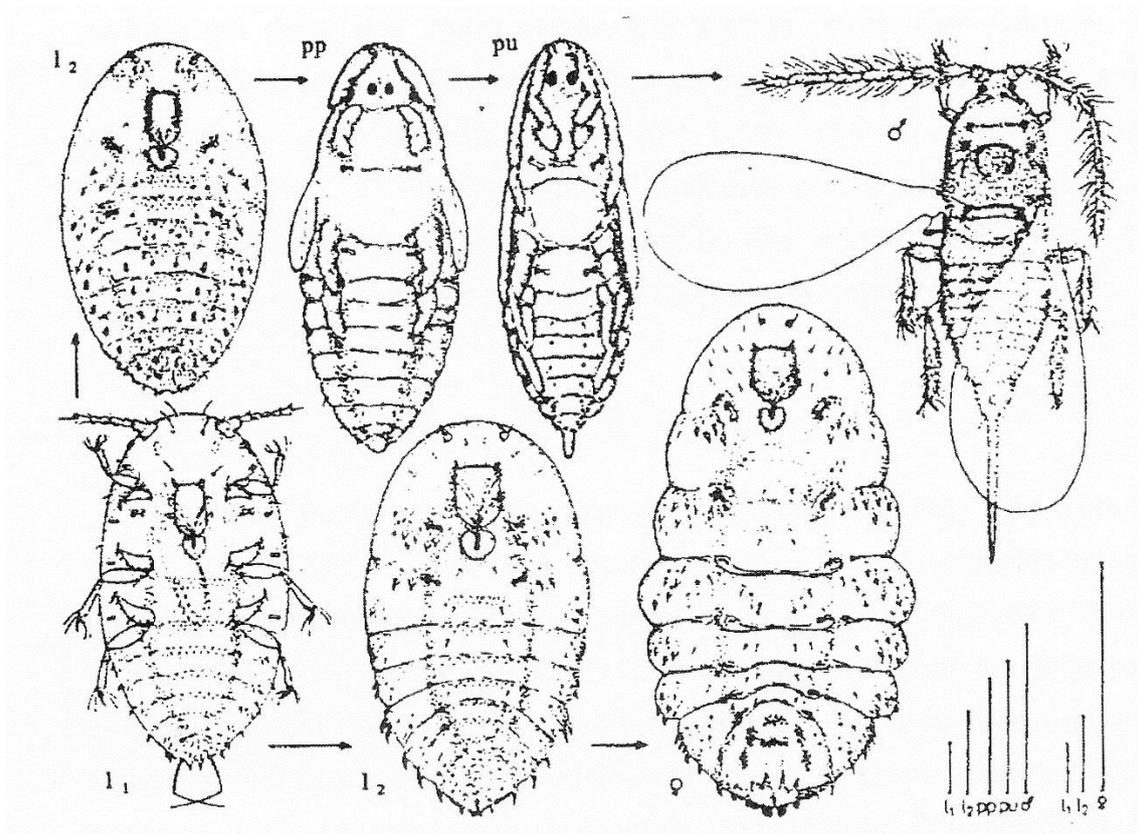


Figura 3. Desarrollo de un *Diaspididae* (*Chionaspis* sp.): (L1) primer estado larvario, (L2) segundo estado larvario, (pp) prepupa, (pu) pupa (Modificado de Koteja, 1990).

1.2.5 Cicadélidos (*Cicadelidae*)

Cientos de especies de cicadélidos se alimentan de árboles y arbustos, pero son pocos los que causan daños directos graves. El único efecto visible de la alimentación de ninfas y adultos es el manchado blanco del follaje y la coloración marrón y enrollamiento de algunas hojas. Sin embargo, muchos son vectores de organismos que causan enfermedades en plantas, en especialmente fitoplasmas y virus (Coulson & Witter, 1990).

Scaphoideus titanus Ball, es un cicadélido que fue introducido en Europa en la década de 1950, es conocido por ser vector del fitoplasma que causa la flavesencia dorada de la vid, enfermedad que bloquea el floema de las plantas y evita que se distribuya la savia elaborada por el resto de la planta. Los síntomas que presentan las viñas son retorcimiento hacia abajo de las hojas y coloración rojiza en variaciones de viñas de uva tinta y coloración amarilla en

variaciones de uva blanca. Estudios anteriormente realizados demuestran que la densidad de plantas por unidad de superficie está directamente relacionada con el número de individuos capturados. Además también existen evidencias sobre preferencias demostradas sobre el color de las trampas por parte de los insectos, siendo las de color rojo más atractivas que las de color blanco, azul o amarillo. Por otra parte, también se llegó a la conclusión de que los machos sentían mayor atracción por este tipo de trampas o bien, el número de estos en las poblaciones de cicadélidos era mayor (Lessio & Alma, 2004).

Por otra parte, otra misma especie del mismo género, *Scaphoideus luteolus* Van Duzee, es la única que se conoce como vector de la necrosis del floema de los olmos en Estados Unidos. Los adultos transmiten el virus al alimentarse de árboles infestados y posteriormente hacerlo en hojas de árboles sanos (Baker, 1948, 1949).

1.3 Fenómeno del secado de las acículas de las copas de pinos

Los pinos carrascos de la Comunidad Valenciana son hospedantes de numerosas especies de insectos y otros artrópodos. A pesar de que muchos de estos insectos se alimenten de ellos han sobrevivido con éxito a sus ataques y formas de alimentación. En los últimos años se ha producido una serie de fenómenos climáticos que han producido sequías y grandes periodos de altas temperaturas, lo que ha debilitado los árboles a causa del déficit hídrico y ha propiciado el aumento del número de insectos en los árboles al disfrutar de un periodo templado más largo. Todo ello ha hecho que los pinos sean más vulnerables al ataque de artrópodos, y los ataques que antes provocaban menos daños en individuos de pino ahora sean más notables y graves (Robinet & Roques, 2010).

Entre las plagas que afectan a los pinos se encuentra la procesionaria (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff.), que con el aumento de la temperatura global se ha vuelto un problema mayor al incrementarse las poblaciones de este lepidóptero (Hódar *et al.*, 2003). Además de los lepidópteros, también han sido dañinos los ataques de escolítidos (*Coleoptera*) como se ha demostrado en ensayos anteriores (Hernández, 2007). Es el caso de los escolítidos pertenecientes al género *Tomicus* sp. los cuales han provocado grandes daños en las masas de pinos de la Península Ibérica. Estos insectos, en condiciones normales no son capaces de colonizar árboles sanos, pero con niveles de población por encima de lo habitual (debido a las elevadas temperaturas) pueden conseguirlo. Si a ello le sumamos el estrés hídrico al que han estado sometidos los árboles, se da un escenario perfecto para el ataque de los pinos (Martín, 2010).

Por otro lado, se ha venido observando hace escasos años la aparición de zonas de acículas secas en las partes superiores de la copa de pinos carrascos, síntoma hasta ahora del que se desconoce su causa pero que coincide con este periodo de debilidad de las masas forestales mediterráneas.

1.4 Fitoplasmas

Históricamente en la patología de plantas, se ha tendido a nombrar, en muchas ocasiones, a las enfermedades por los síntomas de los hospedantes que afectaban y a los patógenos por las enfermedades que provocaban. Los fitoplasmas no es un caso aparte. También se les ha nombrado de acuerdo a la sintomatología que provocaban, como si cada síntoma únicamente fuera provocado por un solo fitoplasma. Sin embargo, la investigación ha dejado en claro que diferentes fitoplasmas pueden causar síntomas aparentemente idénticos en ciertas plantas. Por otro lado, algunos fitoplasmas estrechamente relacionados pueden causar síntomas claramente diferentes en las plantas hospedantes. Además una misma enfermedad puede ser producida por diferentes fitoplasmas en diferentes regiones geográficas (Camarena, 2008).

Cuando se encuentra una planta enferma, se tiende a ver el síndrome como la indicación de una enfermedad particular. Algunos síndromes inducidos por fitoplasmas específicos pueden estar suficientemente caracterizados para confiar en que los síntomas, o bien en la microscopia, son suficientes para el diagnóstico práctico. El diagnóstico de la enfermedad con base en los síntomas o la microscopia en circunstancias inapropiadas puede llevar a un diagnóstico erróneo y, como consecuencia, a realizar esfuerzos equivocados en el manejo de la enfermedad. El diagnóstico preciso requiere la identificación del patógeno para el control efectivo de la enfermedad. Los fitoplasmas causan síndromes similares y se transmiten ampliamente por diferentes vectores, así que el control efectivo de la enfermedad puede requerir la intervención en el ciclo de vida del vector. La identificación precisa del patógeno, es necesaria en casos de diferentes síndromes causados por fitoplasmas relacionados. Por ejemplo, diferentes cepas clasificadas en el grupo I de fitoplasmas (16S rRNA grupo I) pueden causar síntomas idénticos o diferentes en la misma especie de hospedante, dependiendo de la cepa elegida para comparación. La comprensión de las relaciones entre las propiedades biológicas y la clasificación basada en las secuencias conservadas requiere de estudios amplios del genoma de los fitoplasmas (Camarena, 2008). A continuación, se describen de manera breve las principales enfermedades que producen así como las características moleculares de estos procariontes, que les permiten clasificarse dentro de la clase *Mollicutes*.

1.4.1 Morfología y taxonomía

Son parásitos estrictos del hábitat intracelular de plantas e insectos vectores. Su tamaño y crecimiento depende del grado de desarrollo de los tubos cribosos donde se localizan, y tienen la capacidad de pasar lentamente a través de los poros de las células cribosas del floema. La célula del fitoplasma está rodeada por una membrana plasmática trilaminar, de unos 10 nm de grosor, compuesta, al igual que en el resto de procariontes, de dos tercios de proteínas y un tercio de lípidos. Su citoplasma contiene ribosomas para la síntesis de proteínas, y una molécula de ADN doble circular. Se ha detectado también la presencia de ADN extracromosómico (Nishigawa *et al.*, 2001).

El genoma es pequeño, con un alto contenido de genes. Presenta un único gen de rRNA isoleucina, común en todos los fitoplasmas (Kirkpatrick *et al.*, 1994). Por estudios serológicos y moleculares también se ha visto que los fitoplasmas contienen un gen que codifica para una proteína de membrana y ésta es única para cada especie. Estas proteínas son abundantes en la

superficie externa de la célula, y de su estudio se podría explicar la posible interacción fitoplasma-huésped.

1.4.2 Transmisión y ciclo biológico

Los fitoplasmas, como parásitos estrictos, sólo viven en las plantas y en sus insectos vectores. Los fitoplasmas se transmiten a través de insectos vectores pertenecientes al orden *Homoptera*, familias *Cicadellidae*, *Cixidae*, *Cercopidae*, *Psyllidae* y *Fulgoridae*, se multiplican en el interior del insecto y persisten en él hasta su muerte. Aunque normalmente no se transmiten a la descendencia, se ha podido demostrar la transmisión vertical de los fitoplasmas FD y SWLP en los vectores *Scaphoideus titanus* Ball (Alma *et al.*, 1997) y *Matsumuratettix hiroglyphicus* Matsumura (Hanboonson *et al.*, 2002).

Los fitoplasmas se pueden transmitir por uno o varios vectores, dependiendo del grado de especificidad en la interacción fitoplasma-insecto. Existen fitoplasmas con baja especificidad por el vector, como la Enfermedad X del melocotonero, CP o AY a los que se les conocen varias especies de insectos transmisores de la enfermedad. En cambio, otros fitoplasmas sólo se transmiten por un vector, como es el caso del fitoplasma FD de la vid, transmitido únicamente por el cicadelido *Scaphoideus titanus* Ball (Alma *et al.*, 1997). El rango de plantas hospederas para cada fitoplasma depende del comportamiento alimenticio de vector. Vectores monófagos u oligófagos, diseminan el fitoplasma entre una o pocas especies vegetales, como es el caso de *Cacopsylla pyri* y el fitoplasma PD. En cambio, si el insecto se alimenta de diferentes especies vegetales, el fitoplasma afectará a un mayor rango de plantas, como es el caso de *Macrosteltes fascifrons* que transmite el fitoplasma AAY (16Srl-A, 16Srl-B) a más de 191 especies de plantas diferentes.

1.4.3 Sintomatología producida por enfermedades causadas por fitoplasmas

En general, las enfermedades de las plantas asociadas a la presencia de estos patógenos, se reconocen por un conjunto de síntomas, que sugieren profundas alteraciones en el equilibrio hormonal de la planta; la fotosíntesis; las sustancias de reserva. Los síntomas que presentan las plantas con mayor frecuencia son: amarillamiento o clorosis; enrojecimiento precoz de las hojas; esterilidad de las flores; virescencia, donde los pétalos tienen color verde, sin desarrollo del color característico de la flor; enanismo generalizado; desarreglos vegetativos, como el desarrollo de grandes cúmulos de hojas o flores sin desarrollarse, acumulándose generalmente en lugar de las yemas axilares; enrollamiento de hojas; decaimiento general; filodio, cuando sucede la transformación de los órganos florales en estructuras foliares; y proliferación de yemas adventicias que al desarrollarse crecen muchas ramificaciones de un solo sitio, dando lugar a “escobas de bruja”. Algunos de estos síntomas como la virescencia, escoba de brujas, y filodio son casi exclusivos de fitoplasmas. Concretamente, en el caso de los *Pinus halepensis* afectados por las escobas de bruja se demostró la presencia de fitoplasmas en las acículas de árboles sintomáticos (Pastor, 2015).

1.4.4 Clasificación de los fitoplasmas

El gen 16S rDNA está constituido por 1,500 bases, se encuentra dentro del operón ribosómico de los procariontes, junto con otros 2 genes de ADN ribosómicos, el 23S de 2,900 bases y el 5S de 120 bases. Sus órdenes son 16S, 23S y 5S. Entre estos genes se encuentran las regiones espaciadoras, que pueden contener uno o más genes ADNt o de transferencia. Los operones ribosómicos en los procariontes se transcriben en una sola molécula de ARN, y más adelante se separan por cortes enzimáticos.

Los ARN ribosómicos han adquirido vital importancia en el estudio de la evolución de las bacterias. En concreto, los genes ribosómicos 16S y 23S son utilizados como cronómetros moleculares en el estudio de la filogenia microbiana y sistemática. Así, el estudio del gen 16S rDNA (con regiones muy conservadas) mediante RFLP, se ha utilizado para separar los fitoplasmas en grupos y subgrupos (Schneider *et al.*, 1993).

Mediante la amplificación de secuencias de regiones del gen 16S rDNA por se han clasificado a los fitoplasmas en 20 grupos. Sin embargo, este gen parece no tener suficiente variabilidad como para permitir diferenciar aislados que, siendo clasificados como el mismo fitoplasma, difieren en la planta o en los insectos que los hospedan. Asimismo, la amplificación de genes de algunas proteínas ribosómicas y de factores de transcripción y de elongación, han confirmado las relaciones filogenéticas establecidas para los fitoplasmas, entre ellos, y con otros microorganismos, como los acholeplasmas (Lee *et al.*, 1998).

Por otra parte, la utilización de la tecnología del ADN recombinante, ha permitido aislar distintos fragmentos cromosómicos y extra cromosómicos de ADN pertenecientes a fitoplasmas, que se han utilizado por un lado, para detectar los fitoplasmas mediante hibridación de ácidos nucleicos en plantas e insectos y, por otro, para establecer nuevas relaciones filogenéticas. Actualmente se está abordando el estudio de genes diferentes al 16S rRNA para la comprensión de la biología de los fitoplasmas, y con el estudio de la genómica, también se espera dar respuesta a cuales son las condiciones necesarias para su cultivo, así como los factores que intervienen en la especificidad vector-planta. Hasta el momento, se han aislado genes que codifican para proteínas de membrana de diferentes fitoplasmas, a partir de los cuales se han desarrollado sueros monoclonales y policlonales. Estas proteínas de membrana, al igual que en otros Mollicutes, podrían estar implicadas en el reconocimiento específico del huésped y patogénesis.

1.4.5 ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’

“*Candidatus Phytoplasma pini*” es el nombre que se propuso para el fitoplasma encontrado en *Pinus halepensis* y *Pinus silvestris* de España y Alemania respectivamente. Fue encontrado tanto en árboles sintomáticos como en árboles asintomáticos colindantes a ellos. Como se ha mencionado anteriormente, la clasificación de los fitoplasmas es compleja debido a la similitud genética entre todos ellos. Es el caso del fitoplasma del castaño, del que provoca el amarilleamiento letal de las palmeras y del enanismo y amarilleamiento del arroz, con los que comparte entre un 94,5 y 96,6% de la secuencia del gen 16S rRNA (Schneider, 2005).

Por otro parte en estudios más recientes (Pastor, 2015) se encontró este fitoplasma en árboles que presentaban secado de acículas, escobas de bruja, enanismo en acículas y deformaciones varias.

Justificación y Objetivos

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Desde principios del año 2016 se vino observando un fenómeno de secado en zonas de la copa de individuos de *Pinus halepensis*, sobretodo de la parte superior y más externa. Los árboles presentaban zonas de la copa con las acículas totalmente secas, las cuales formaban manchas que podían presentarse en una zona de la copa concreta o estar repartidas por toda ella. Este fenómeno se podía distinguir de otros tipos de secado de acículas, como puede ser, el que se produce al romperse una rama, o cuando se van secando las acículas de la zonas más interior de una rama al aumentar su diámetro y aumentar la corteza de la misma.

Estudios de años anteriores habían puesto de manifiesto este problema y sus posibles causas (Pastor, 2015). Se asociaba el secado de las acículas a la presencia de un fitoplasma en el interior de las mismas.

Estos daños parecen haber aumentado tras este último cálido invierno. El nivel de afectación de los pinos no es homogéneo en todos los individuos, pudiendo haber individuos totalmente sanos y otros con prácticamente la totalidad de la copa afectada, todo ello en la misma zona de muestreo.

Los objetivos del presente TFG son:

- Identificar los artrópodos que puedan ser causantes de los daños que sufren las acículas, con especial atención de los artrópodos chupadores: ácaros, cicadélidos, pulgones y cochinillas.
- Se estudiará si alguno de ellos se comporta como vector del fitoplasma.
- Como consecuencia de su forma de alimentación, los insectos chupadores provocan el secado de las acículas del pino. Se diseñará una estrategia de Gestión Integrada de Plagas como indica el Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre de uso sostenible de fitosanitarios, para estos artrópodos, dada la gravedad de los daños que se están produciendo actualmente.

Material y métodos

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Prospección de pies de *Pinus halepensis* y toma de muestras

Para estudiar el secado de las acículas y los artrópodos que podían estar implicados en este daño se eligieron dos zonas de muestreo con características geográficas distintas: la pinada de la Devesa del Saler y jardines de la ciudad de Valencia. El periodo de muestreo fue desde el 15 de abril de 2016 hasta el 17 de junio del mismo año.

Se muestrearon un total de 20 pies, diez por cada zona de muestreo. Cada árbol fue georreferenciado e identificado para su posible posterior seguimiento mediante la aplicación móvil “Gestor del Arbolado” (desarrollada por profesores del Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la ETSIAMN). Con el fin de hacer una comparativa visual de árboles sintomáticos, se hizo un registro fotográfico de árboles sintomáticos al principio (abril de 2016) y al final del trabajo (julio de 2016).

De cada árbol se tomaron cuatro muestras, las cuales se obtuvieron utilizando una podadora de pértiga (Fig. 4), rodeando su perímetro e intentando obtener una muestra dispersa de toda la copa. Las muestras se obtuvieron de árboles sintomáticos, intentando coger dos muestras cercanas a zonas de la copa afectadas por el secado y otras dos de zonas lejanas al síntoma.

En árboles de gran altura se cogieron muestras de la zona más baja dada la longitud limitada de la pértiga, siempre que se pudiera intentando coger muestras de zonas cercanas y lejanas al síntoma. Cada muestra era una rama lo suficientemente grande como para poder dividirla en cinco ramillos los cuales eran observados uno a uno. Las muestras se almacenaron en bolsas marcadas con el código asignado al árbol y en el mismo día se trasladaron al laboratorio de protección de cultivos de la ETSIAMN, donde se conservaron en una nevera para ayudar a su conservación. El volumen de muestras obtenido finalmente fue de 80, al haber obtenido 4 muestras de cada uno de los 20 árboles muestreados, 10 por cada una de dos zonas de muestreo. El número de ramillos observados fue de 400, al haber dividido cada una de las 80 muestras en cinco ramillos.

3.2 Conteo e identificación de artrópodos y preparación del material vegetal para su análisis

Una vez en el laboratorio, las muestras se fueron inspeccionando siguiendo un método que pudiera proporcionar una estadística de los artrópodos presentes en cada árbol y una posible relación con los síntomas que presentaban.

De cada muestra se separaron cinco ramillos de un tamaño homogéneo, en cada uno de los cuales se anotaron todos los artrópodos visibles a la lupa. De cada muestra se sacaron los



Figura 4. Toma de muestras utilizando pértiga en la Devesa del Saler.

porcentajes de presencia de cada tipo de artrópodo. Dado que se tenían cinco ramillos de cada muestra, la presencia en un ramillo suponía un 20% de presencia en la muestra, la presencia en dos ramillos un 40% y así sucesivamente. Posteriormente, se agruparon datos por árbol, realizando la media de las 4 muestras de cada árbol, y por zona de muestreo, realizando la media de las 40 muestras pertenecientes a los 10 árboles de cada zona.

La detección y observación de los artrópodos se realizó, primeramente, golpeando el ramillo en una bandeja de laboratorio y observando las especies de artrópodos que caían en ella. A continuación con ayuda de una lupa binocular estereoscópica “Leica” se observaron todos los artrópodos presentes tanto en el ramillo como en las acículas. Los que no se pudieron identificar fácilmente, fueron conservados en placas Petri para su posterior identificación.

En cuanto a los cicadélidos, se debía comprobar si actuaban como vectores del fitoplasma. Por ello, estos insectos, además de ser contabilizados, fueron capturados y conservados en alcohol al 70° en botes individuales, de forma que todos los insectos procedentes del mismo árbol eran conservados en el mismo bote para su posterior análisis y detección del fitoplasma. Y en el caso de darse la presencia de éste, confirmar al cicadélido como vector del fitoplasma. Además, también se capturaron otros insectos chupadores, los cuales fueron pulgones.

Cada artrópodo se intentó identificar hasta el nivel de especie siempre que fue posible, siendo los órdenes de más interés para el trabajo los ácaros, áfidos y cicadélidos. La clasificación de los artrópodos en categorías taxonómicas se realizó consultando la base de datos Fauna Europaea (de Jong *et al.*, 2014). Para ayudar con la identificación también se utilizó un binocular “Leica” provisto de sistema de captación de imágenes digitales, las cuales facilitaron la consulta y comparación con guías de identificación.

Para los ácaros fue necesario, en ocasiones, realizar preparaciones para observar al microscopio. Este método sirve para digerir el ácaro y obtener un exoesqueleto totalmente transparente, en el cual se puede hacer mediciones y observar formas para identificar la muestra. El proceso para realizar la preparación se detalla a continuación.

Primeramente, sobre uno de los extremo de un portaobjetos se aplicaba una gota de ácido láctico. Después se colocaba el insecto sobre la gota con ayuda de un pincel fino u otro utensilio previamente lavado en alcohol. El ácaro debía quedar en posición anatómica sobre el portaobjetos, para de esta forma poder ver ambas caras (dorsal y ventral) del ácaro. Seguidamente se ponía un cubreobjetos encima de la gota dejándolo car suavemente sobre el portaobjetos para evitar que se formen burbujas de aire y que la gota se expanda por fuera del cubreobjetos. Una vez hecho esto, se sellaban los bordes con esmalte de uñas para fijar el cubreobjetos al portaobjetos. Finalmente se etiquetaba la preparación en el extremo libre con los datos de localización, fecha y hospedante y se dejaba actuar el ácido láctico durante dos días en una estufa a 40°C.

Los insectos chupadores son capaces de ser vectores de fitoplasmas dado al contacto que se produce entre su aparato bucal y el floema de la planta (Dajoz, 2001). Por ello, y para conocer las características de los insectos chupadores que habitan en el hospedante estudiado, fue interesante realizar la identificación taxonómica más precisa posible de los mismos.

Una vez realizado el conteo e identificación de artrópodos, antes de que pasaran 7 días desde la toma de la muestra, para evitar su deterioro, las muestras vegetales se dispusieron en bolsas individuales de 50 mg de acículas por árbol muestreado (ocho acículas por bolsa, 2 de cada orientación del árbol). Luego se enviaron al laboratorio de virología de la unidad docente de patología vegetal del departamento de ecosistemas agoforestales, junto con los cicadélidos conservados en alcohol para su análisis y comprobación de la presencia de fitoplasmas.

3.3 Conteo de insectos chupadores en trampas amarillas pegajosas

Durante el año 2016 se colocaron trampas cromáticas de color amarillo que atraen a determinados insectos voladores como homópteros y los atrapan dejándolos adheridos a una sustancia pegajosa. Las trampas fueron situadas en distintos puntos de la Devesa del Saler. Permanecían colgadas de forma que el color atrajera a los insectos voladores que se desplazaban cerca de ellas. Los insectos, al chocar contra la trampa o intentar apoyarse en ella quedaban pegados a una sustancia que los mantenía adheridos a la trampa.

Transcurrido un periodo determinado, el cual no fue el mismo en todas las trampas, se recogían, se envolvían en un plástico protector para evitar que se deterioraran los insectos y se transportaban al laboratorio de protección de cultivos de la ETSIAMN para su conteo.

Los insectos contabilizados fueron únicamente aquellos con aparato bucal chupador-picador. Las trampas estaban divididas mediante una cuadrícula que permitía estimar de forma más rápida el número de insectos en el caso de que éstos fueran muy numerosos. Se contaban los insectos pertenecientes a un cuadrado y se multiplicaba por el número de cuadrados que visualmente tenían la misma densidad de insectos. Si por el contrario el número de insectos no era demasiado elevado, se contaban todos los insectos de todos los cuadrados.

A partir de los datos que se obtuvieran, se realizarían curvas de vuelo para estimar el momento en el que la abundancia de insectos fuera mayor.

3.4 Detección de fitoplasmas

El proceso de detección e identificación de fitoplasmas constó de tres fases: extracción del DNA mediante kit comercial EZNA™, amplificación del DNA por el método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) empleando cebadores generales de fitoplasmas (Kummert & Rufflard, 1997) y revelado de las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa. Todas estas fases y métodos se describen a continuación.

3.4.1 Extracción del DNA total

La extracción de DNA consiste en el aislamiento del material genético del resto de orgánulos de la célula y demás material vegetal. Para conseguirlo hemos de hacer pasar el material vegetal por unos procesos de filtrado y diferenciación por densidades utilizando una centrifugadora (Fig. 5).

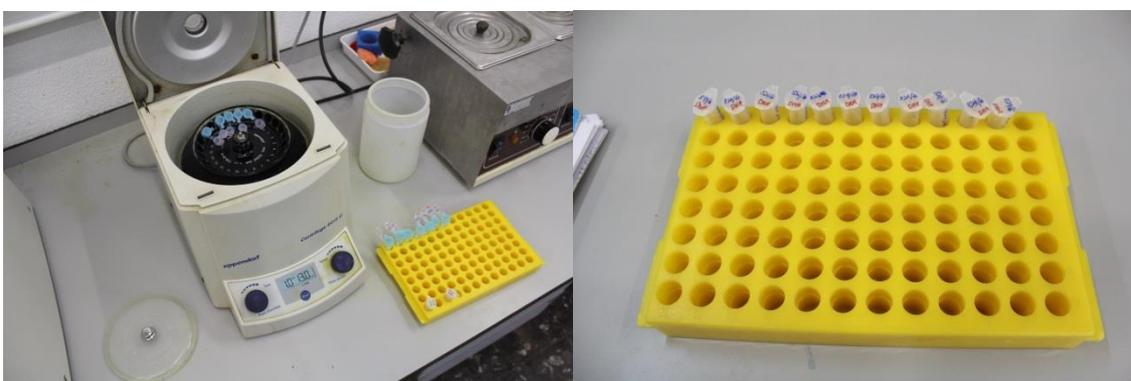


Figura 5. Centrifugadora utilizada en la extracción (izquierda) y muestras de DNA ya aislado en tubos *ependorf* (derecha).

Para la preparación de las muestras para realizar la extracción del DNA se utilizó una maza de mortero con la que se trituraron las muestras dentro de una bolsa de plástico (Fig. 6). Este método es más sencillo y rápido y además, se ha comprobado en estudios anteriores en los que se ha realizado una comparación entre métodos de preparación del material vegetal para extracción de DNA que produce más cantidad y calidad del mismo (Pastor, 2015).

Para la extracción de DNA se empleó el kit comercial EZNA™ (Fig. 7) siguiendo las indicaciones el fabricante. Básicamente consta de unas soluciones ya preparadas (tampones) que se usan en el proceso de extracción, el cual se detalla en el Anexo 1.

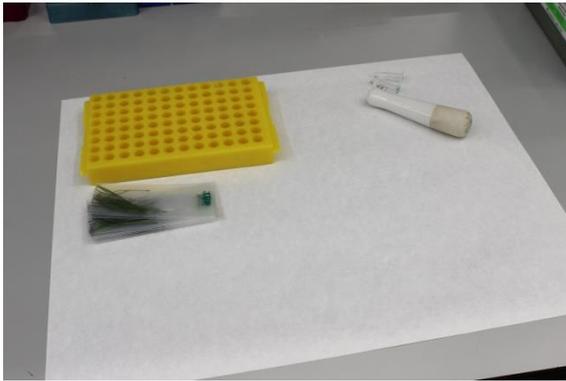


Figura 6. Maza para trituración y muestras vegetales en bolsas.



Figura 7. Kit comercial EZNA™.

3.4.2 Amplificación del DNA del fitoplasma mediante PCR

La técnica de amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento de DNA específico. Para llevar a cabo esta amplificación es necesario conocer la secuencia del fragmento de DNA que es característico del fitoplasma que se está intentando detectar en las muestras.

De esta forma, para que se produzca la reacción se debe seguir un método específico de PCR (Lorenz *et al.*, 1995) y se debe seguir el protocolo descrito en el Anexo 2 y añadir una serie de reactivos, los cuales son:

- El tampón (TAB10X) que actúe como medio en el que se produzca la reacción.
- Los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) que componen el DNA (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), en una mezcla equimolar de cada uno de ellos.
- Los *primers* o cebadores, deben reconocer la secuencia de pares de bases de la región de DNA a amplificar. En el caso del fitoplasma de los pinos, los *primers* utilizados han sido U3 (5' – TTC AGC RAC TCT TTG TAA CA – 3') Y U5 (5' –CGG CAA TGG AGG AAA CT– 3') (Kummert & Rufflard, 1997).
- La enzima polimerasa, la cual se encarga de unir los nucleótidos y formar las nuevas cadenas de DNA. En el caso de la PCR ha de ser la una polimerasa especial capaz de resistir las elevadas temperaturas a las que se va a someter el tubo de reacción. Dicha DNA polimerasa, es la llamada Taq-polimerasa, aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*.

La PCR se lleva a cabo en tres etapas: desnaturalización, alineamiento y elongación. Todas ellas se producen de forma consecutiva, y cada vez que se completa el ciclo el número de cadenas de DNA de la región que queremos amplificar aumenta de forma exponencial. De esta forma el número de cadenas de la sección de DNA que queremos amplificar es mucho mayor que el de cadenas completas.

La primera etapa es la desnaturalización, en la cual se separan las dos cadenas complementarias de nucleótidos que forman el DNA, y ocurre al elevar la temperatura de las muestras hasta los 94°C. Posteriormente se desciende la temperatura entre los 40°C y los 60°C dependiendo de determinadas características de los *primers* en cuestión para que éstos se alineen con las cadenas que anteriormente se han separado. Por último, se aumenta la

temperatura a 72°C para que se produzca la elongación, que es la formación de cadenas complementarias uniendo nucleótidos a las ya existentes.

Todo este proceso forma un ciclo y al realizar unas pocas decenas de ciclos se obtienen millones de copias de la región del DNA que se quiere analizar. La automatización de este proceso se realiza mediante un aparato llamado termociclador (Fig. 8), el cual permite que el procedimiento resulte sencillo y práctico.



Figura 8. Termociclador empleado en la técnica de PCR.

En todas las PCRs se añadieron controles positivos y negativos. Los controles positivos eran muestras que habían dado positivo a la presencia del fitoplasma, como controles negativos se emplearon pinos sanos y además se incluyeron muestras sin DNA.

3.4.3 Electroforesis en gel de agarosa y revelado

Para visualizar los productos amplificados en la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 1,2 %. Este proceso consiste en someter a las muestras de DNA a una corriente eléctrica en un medio por el que pueda circular (gel de agarosa). El DNA está cargado negativamente, por lo que al someterlo a una corriente eléctrica entre un cátodo y un ánodo migra hacia el polo positivo a través del gel, el cual está bañado en un medio acuoso conductor de la electricidad (Figura 9). La velocidad con la que migra depende de su peso molecular. Para conocerlo, se usan marcadores de peso molecular conocido, los cuales se disponen en el gel y migran paralelos al DNA de las muestras.

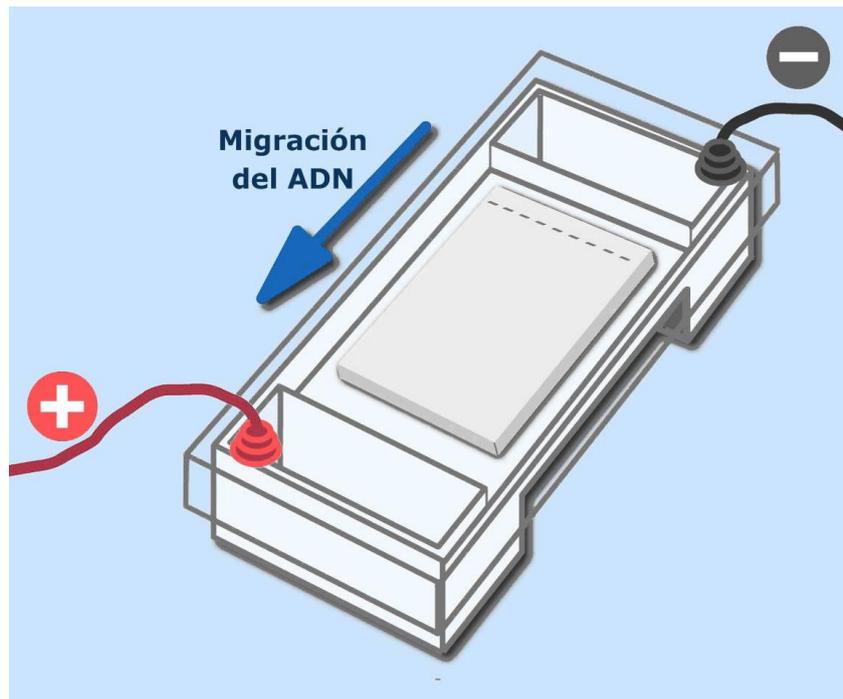


Figura 9. Migración de DNA empleando la técnica de electroforesis en gel de agarosa.

Finalmente, una vez ha terminado el proceso de migración del DNA, los geles se bañan en bromuro de etidio y se revelan en un equipo de fotodocumentación con rayos ultravioleta para comprobar si las muestras dan positivo, es decir, si se observa una banda en el mismo lugar que en el positivo. El protocolo para realizar todo este proceso se detalla en el Anexo 3.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Identificación de áfidos

Tras analizar los ramillos de las muestras, se obtuvieron numerosos insectos del orden de los áfidos. Concretamente se encontraron cuatro especies, tres de ellas con una abundancia considerable. A continuación se detallan las especies encontradas.

4.1.1 Género *Eulachnus*

En el caso de los individuos pertenecientes al género *Eulachnus* se encontraron dos especies, diferenciables a simple vista por la coloración del cuerpo, siendo unos de color verde, los cuales fueron identificados como *Eulachnus brevipilosus* Börner (Figura 10) y otros grises, identificados como *Eulachnus rileyi* Williams (Figura 11). Ambas especies fueron identificadas utilizando las guías de identificación de Blackman & Eastop (1994) y Remaudière & Seco (1990).



Figura 10. *Eulachnus brevipilosus*, vista dorsal.



Figura 11. *Eulachnus rileyi*, vista ventral.

4.1.2 Género *Cinara*

El género *Cinara* es un género más diverso y amplio, que cuenta con veinte especies diferentes de pulgones (Castresana & Notario, 1992). Para su identificación se utilizaron distintas fuentes bibliográficas, además de claves de identificación (Blackman & Eastop, 1994) con las que se compararon mediciones de diferentes partes anatómicas del insecto para determinar la especie del mismo. Las fuentes bibliográficas que citaban presencia de las diferentes especies en *Pinus halepensis* fue resumida para ayudar a corroborar la identificación (Tabla 1).

Tabla 3. Especies del género *Cinara* sp. junto con la bibliografía en la que aparecen citadas sobre *Pinus halepensis*.

Especie	Bibliografía	Nº Citas
<i>Cinara maghrebica</i> Mimeur	(Notario <i>et al.</i> , 1992) (Notario & Baragaño, 1992) (Blackman & Eastop, 1994) (Binazzi <i>et al.</i> , 1996)	4
<i>Cinara pinimaritimae</i> Dufour	(Notario <i>et al.</i> , 1992) (Notario & Baragaño, 1992) (Blackman & Eastop, 1994) (Binazzi <i>et al.</i> , 1996)	4
<i>Cinara pini</i> L.	(Notario <i>et al.</i> , 1992) (Notario & Baragaño, 1992) (Blackman & Eastop, 1994)	3
<i>Cinara acutirostris</i> Hille Ris Lambers	(Notario <i>et al.</i> , 1992) (Notario & Baragaño, 1992)	2
<i>Cinara balachowskyi</i> Remaudiere	(Notario <i>et al.</i> , 1992) (Blackman & Eastop, 1994)	2
<i>Cinara palaestinensis</i> Hille Ris Lambers	(Notario <i>et al.</i> , 1992) (Blackman & Eastop, 1994)	2
<i>Cinara pinea</i> Mordvilko	(Blackman & Eastop, 1994)	1
<i>Cinara cronartii</i> Tissot & Pepper	(Blackman & Eastop, 1994)	1

Finalmente se determinó que la especie encontrada fue *Cinara maghrebica* (Figura 12 y 13) utilizando la clave de Blackman & Eastop (1994) y apoyándose en las referencias bibliográficas anteriormente citadas. El resultado fue coherente debido a que la especie que se determinó era una de las más citadas sobre *Pinus halepensis*.



Figura 12. Individuo adulto de *Cinara maghrebica* sobre ramillo de *Pinus halepensis*.



Figura 13. Colonia de *Cinara maghrebica* junto con un individuo de *Eulachnus brevipilosus* (cuerpo verde) sobre ramillo de *Pinus halepensis*.

4.1.3 Género *Aphis*

Por último, también se encontraron algunos individuos del género *Aphis* (Figura 14) pero en un número muy reducido por lo que únicamente se identificaron a nivel de género. Se utilizó la clave de pulgones de Blackman & Eastop (1994).



Figura 14. *Aphis* sp., vista dorsal.

4.2 Estudio de artrópodos diferentes a áfidos presentes en las muestras

Tras realizar el muestreo de los pies se encontraron numerosas especies de artrópodos. En los dos siguientes apartados se detalla tanto la diversidad como la abundancia de ellos.

4.2.1 Descripción de artrópodos encontrados

En la tabla 2 y en las figuras 15 a 38 se muestra un listado de las categorías taxonómicas de las que se han encontrado especímenes a lo largo de todo el muestreo:

Tabla 4. Listado de categorías taxonómicas de las cuales se han encontrado individuos.

Clase	Subclase	Orden	Familia	Especie
Arachnida				
		Araneae		
		Pseudoscorpionida		
	Acari			
		Oribatida		
		Prostigmata		
			Tetranychidae	
				<i>Oligonychus</i> sp.
		Trombidiformes		
			Cheyletidae	
				<i>Cheyletogenes ornatus</i> Can. & Fanz.
			Tydeidae	
			Tenuipalpidae	
			Trombidiidae	
		Mesostigmata		
			Phytoseiidae	
Insecta				
		Hemiptera		
			Anthocoridae	
			Cicadelidae	
			Diaspididae	
			Margarodidae	
				<i>Palaeococcus fuscipennis</i> Burm.
			Psyllidae	
		Psocoptera		
		Neuroptera		
			Chrysopidae	
			Coniopterygidae	
		Coleoptera		
			Coccinellidae	
				<i>Myrrha octodecimguttata</i> L.
				<i>Rhizobius chrysomeloides</i> Herbst
			Silphidae	
			Rhizophagidae	
				<i>Rhizophagus</i> sp.
		Thysanoptera		
			Tubulifera (Suborden)	
		Hymenoptera		
			Formicidae	



Figura 15. Araña (*Araneae*), vista dorsal.



Figura 16. Pseudoescorpión (*Pseudoescorpionida*), vista dorsal.



Figura 17. Oribátidos (*Oribatida*) sobre ramillos de pino, vista dorsal.



Figura 18. *Cheyletozenes ornatus*, preparación al microscopio.



Figura 19. Trombídido (*Trombidiidae*), vista dorsal.



Figura 20. Trombídido (*Trombidiidae*), vista ventral.



Figura 21. Cicadélido (Cicadellidae), vista dorsal.



Figura 22. Diaspídido (Diaspididae), sobre una acícula de pino.



Figura 23. Diaspídido (Diaspididae), vista dorsal.



Figura 24. Palaeococcus fuscipennis, vista dorsal.



Figura 25. Palaeococcus fuscipennis, vista ventral.



Figura 26. Psocóptero (Psocoptera), vista dorsal.



Figura 27. *Crisopa* (Chrysopidae) adulta, vista lateral.



Figura 28. *Crisopa* (Chrysopidae) ninfa, vista lateral.



Figura 29. *Myrrha octodecimguttata*, vista dorsal.



Figura 30. *Myrrha octodecimguttata*, vista ventral.



Figura 31. *Rhyzobius chrysoloides*, vista dorsal.



Figura 32. *Rhyzobius chrysoloides*, vista ventral.



Figura 33. Trip (*Thysanoptera tubulifera*), vista dorsal.



Figura 34. Hormiga (*Formicidae*), vista dorsal.



Figura 35. *Oligonychus* sp. hembra, vista dorsal.



Figura 36. *Oligonychus* sp. (hembra), vista ventral.

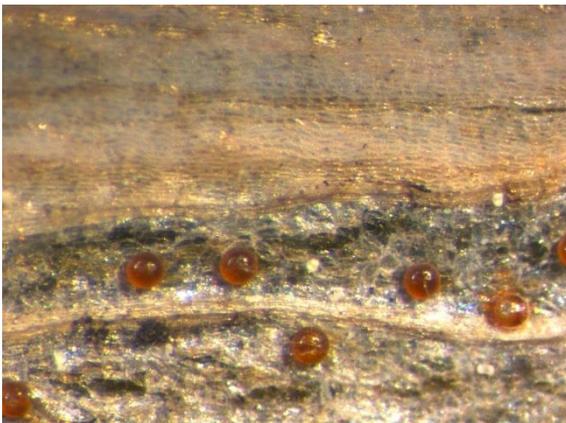


Figura 37. Huevos de *Oligonychus* sp.

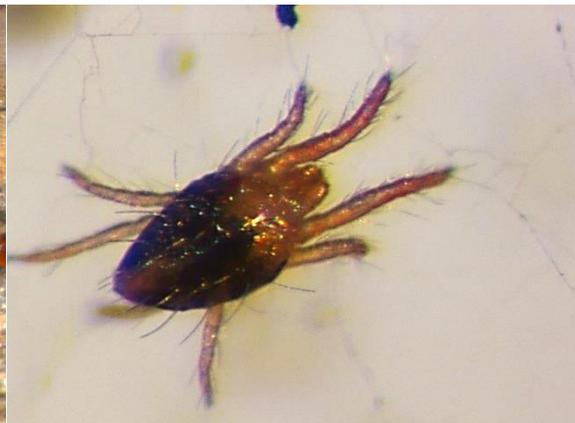


Figura 38. *Oligonychus* sp. macho, vista dorsal.

4.2.2 Abundancia de artrópodos en los ramillos de los árboles de las dos zonas muestreadas

En la tabla 3 se muestran los artrópodos encontrados en las muestras. Los porcentajes representan la cantidad de ramillos en los que había presencia del artrópodo en cuestión. Algunos de los artrópodos fueron contabilizados atendiendo además al estado de desarrollo en el que se encontrara el individuo.

Tabla 3. Porcentaje de ramillos con presencia de artrópodos (resaltados aquellos porcentajes superiores al 20%).

Artrópodo/Localización	Devesa del Saler	Jardines de Valencia
Antocóridos	0,0%	13,5%
<i>Aphis</i> sp.	0,0%	1,0%
Arañas	7,5%	18,0%
<i>Cheyletogenes ornatus</i>	2,5%	1,0%
Cicadélidos	35,0%	20,0%
<i>Cinara maghrebica</i>	2,5%	9,0%
Diaspídeos	63,5%	81,5%
Coccinélidos adultos	1,0%	10,0%
Coccinélidos larva	5,5%	13,5%
<i>Coniopterygidae</i>	0,5%	0,0%
Crisopas	8,5%	5,0%
<i>Eulachnus brevipilosus</i>	44,5%	25,0%
<i>Eulachnus rileyi</i>	27,0%	1,5%
Fitoseidos	36,0%	34,5%
Formícidos	0,5%	0,0%
Larvas de sílfidos	0,5%	0,0%
<i>Myrrha octodecimguttata</i>	0,5%	5,5%
<i>Oligonychus</i> sp.	2,9%	6,0%
Oribátidos	17,0%	3,5%
Otros ácaros	9,0%	5,0%
Otros coleópteros	2,0%	1,0%
Otros hemípteros	13,5%	7,0%
<i>Palaeococcus fuscipennis</i>	5,0%	22,0%
Psilas	3,0%	0,0%
Psocópteros	44,5%	64,5%
<i>Rhizophagus</i> sp.	10,0%	2,0%
<i>Rhizobius chrysomeloides</i>	1,0%	2,0%
Tenuipálpidos	6,0%	11,0%
<i>Thysanoptera tubulifera</i>	0,0%	24,0%
Tideidos	25,5%	57,0%
Trombídidos	4,0%	0,0%

De los fitófagos, los cicadélidos y los áfidos del género *Eulachnus* son más abundantes en la zona de la Devesa del Saler, mientras que en la ciudad de Valencia los ácaros, trips y cochinillas (Superfamilia *Coccoidea*) eran más abundantes. El resto de artrópodos aparecían aproximadamente por igual en las dos zonas de muestreo.

En la zona de la Devesa del Saler la mayor presencia de insectos chupadores y de cuerpo blando, coincide con la menor abundancia de grupos depredadores. En la zona de los jardines de Valencia, se da la situación inversa, con niveles de población altos en insectos depredadores y bajos niveles de insectos chupadores.

4.3 Análisis de la abundancia de insectos chupadores en 2016 mediante trampas amarillas pegajosas

En las trampas amarillas pegajosas instaladas en la Devesa del Saler, se capturaron en la primera mitad de 2016 cerca de 8000 insectos con aparato bucal picador-chupador (Tabla 4). De todos los insectos capturados los más abundantes fueron los áfidos y los trips.

Tabla 4. Número de insectos capturados en trampas amarillas pegajosas durante el primer semestre de 2016 en la Devesa del Saler.

Insecto	Individuos
Cicadélidos	10
Áfidos	7361
Tisanópteros	590
Machos de diaspídidos	9
Aleuródidos	33
Psílidos	10
Total	7966

En las figuras 39, 40 y 41 se muestran los periodos de vuelo de los insectos capturados y los momentos de máximo vuelo. Los cicadélidos, moscas blancas (aleuródidos), machos de diaspídidos y psilas comparten figura al poderse comparar sus curvas de vuelo en la misma escala. Los trips y áfidos están en figuras diferentes debido a que presentan niveles de población distintos y no comparten la misma escala.

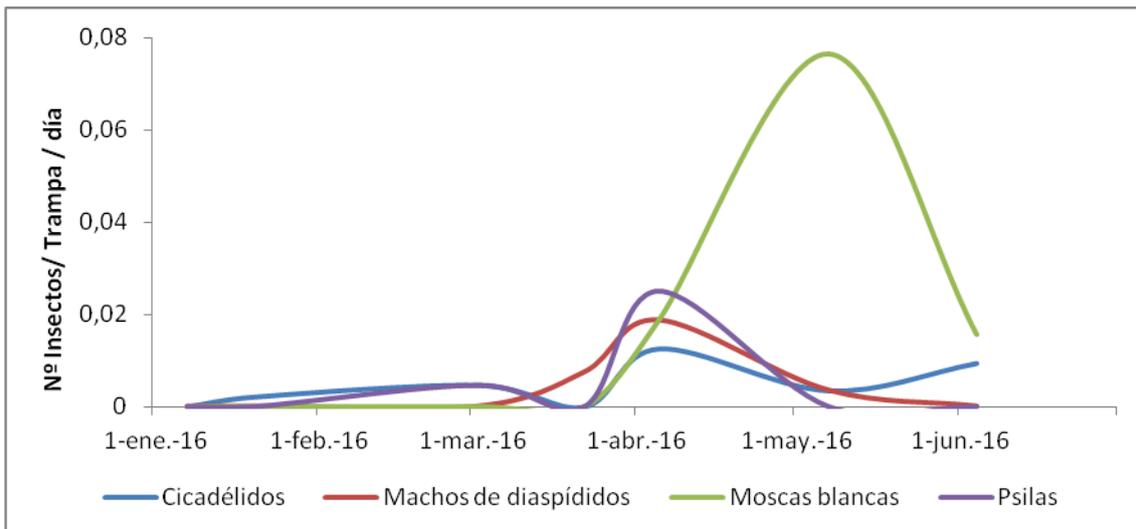


Figura 39. Curva de vuelo de cicadélidos, machos de diaspididos, moscas blancas y psilas.

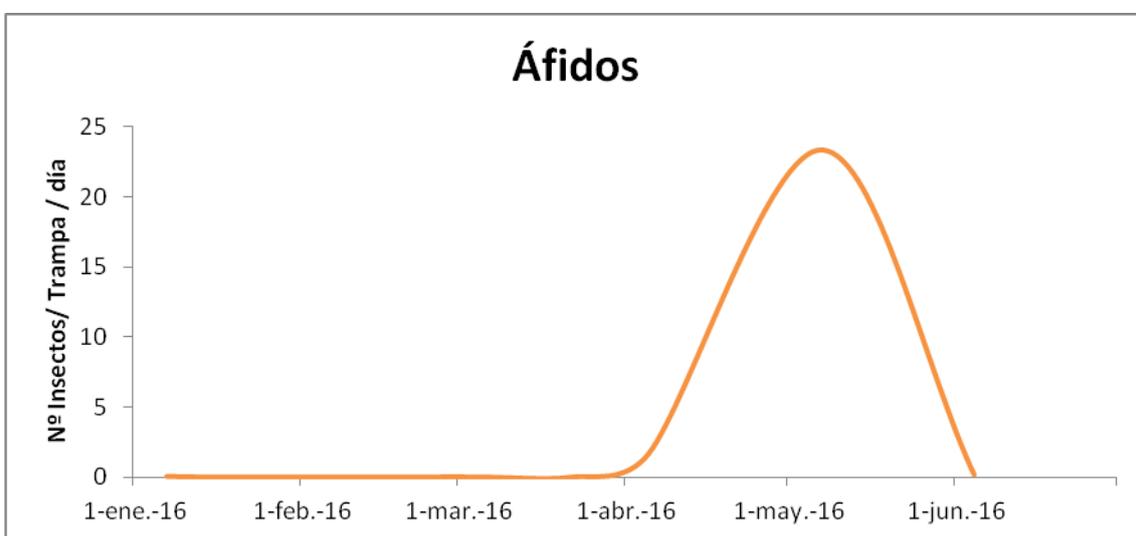


Figura 40. Curva de vuelo de áfidos.

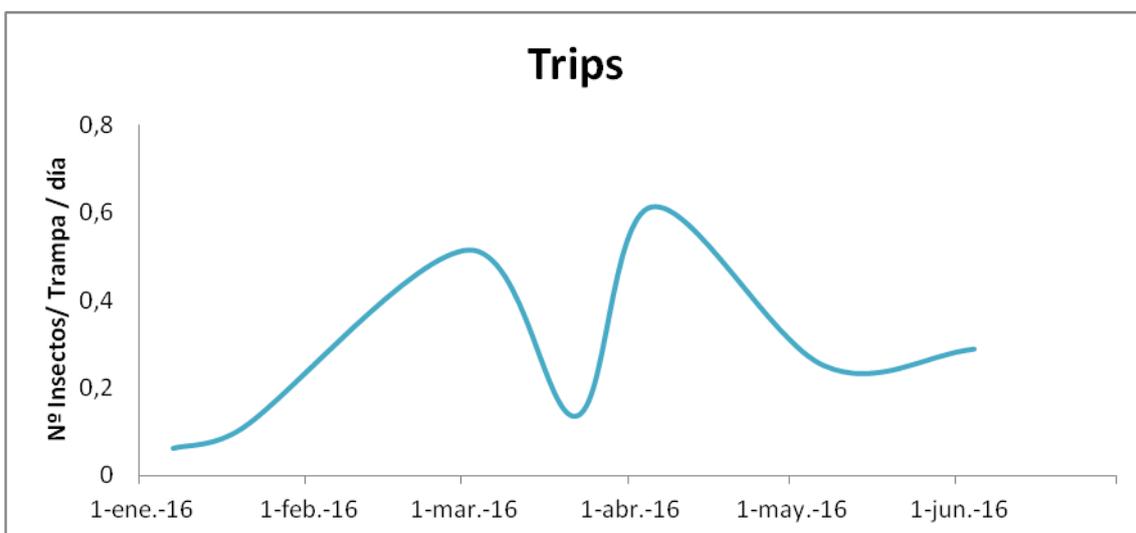


Figura 41. Curva de vuelo de trips.

Los seis grupos de insectos chupadores presentan un momento cumbre en el número de individuos entre los meses de marzo y mayo. Los trips tienen sus niveles máximos en dos momentos, a principios de marzo y principios de abril. Los machos de diaspídeos, las psilas y los cicadélidos en abril. Finalmente, las moscas blancas y áfidos lo hacen en mayo. El aumento de las temperaturas favorece la reproducción de los insectos y por consiguiente, que haya un mayor número de ellos en el aire en busca de un nuevo hospedante.

El periodo entre abril y mayo es aquel en el que se produce la mayor concentración de insectos chupadores. De estos, los más abundantes han sido los áfidos y los trips, siendo los primeros mucho más abundantes que los últimos.

4.4 Resultados de los análisis moleculares

De los 20 pies de pino que fueron muestreados se tomó y analizó una muestra de acículas por cada uno (mapas y coordenadas de los árboles muestreados en el Anexo 4). En cuanto a los cicadélidos, se encontraron en 17 de los 20 pies, y en uno de ellos se dividió la muestra en dos análisis, debido a la gran cantidad de insectos que presentaba ese árbol, obteniendo un total de 18 muestras de cicadélidos. En total se obtuvieron 38 muestras, de cada una se realizaron dos análisis, uno con la concentración inicial (1:1) y otro en dilución (1:10). Ninguna dio positivo a la presencia del DNA del fitoplasma (Tablas 5 y 6) por lo que no se pudo comprobar ni la presencia del fitoplasma en los tejidos de la planta, ni la posible función de vector de los cicadélidos en estudio (Tablas completas en el Anexo 5 y 6).

Tabla 5. Muestras de acículas y resultados.

Fecha	Nombre completo	Resultado PCR 1:1	Resultado PCR 1:10
17/06/2016	Saler - Frente IES	Negativo	Negativo
17/06/2016	Saler - IES cerca rotonda	Negativo	Negativo
17/06/2016	Saler - Camino Sentidos pto 2	Negativo	Negativo
17/06/2016	Saler - Carretera El Saler - El Palmar	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Gola de Pujol	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Jardín Detrás pueblo Saler	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Carretera Sur Saler	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Autovía V-15	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Parador Saler	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Devesa Trampa 4	Negativo	Negativo
03/05/2016	1 Viveros	Negativo	Negativo
03/05/2016	2 Viveros	Negativo	Negativo
03/05/2016	3 Viveros	Negativo	Negativo
03/05/2016	4 Viveros	Negativo	Negativo
03/05/2016	1 Rambleta	Negativo	Negativo
20/05/2016	Alameda (Passeig Albereda)	Negativo	Negativo
03/06/2016	Tres Creus	Negativo	Negativo
03/06/2016	UNED	Negativo	Negativo
03/06/2016	Barri La Llum	Negativo	Negativo
03/06/2016	Hermanos Maristas	Negativo	Negativo

Tabla 6. Muestras de cicadélidos y resultados.

Nombre completo	Analizados		Total	Resultado PCR 1:1	Resultado PCR 1:10
	Ninfas	Adultos			
Saler - Frente IES	5	2	7	Negativo	Negativo
Saler - IES cerca rotonda	9	1	10	Negativo	Negativo
Saler - Camino Sentidos pto 2	0	2	2	Negativo	Negativo
Saler - Camino Perpend Sentidos	0	0	0	Negativo	Negativo
Saler - Gola de Pujol	5	2	7	Negativo	Negativo
Saler - Jardín Detrás pueblo Saler	10	0	10	Negativo	Negativo
Saler - Carretera Sur Saler	1	1	2	Negativo	Negativo
Saler - Autovía V-15	5	3	8	Negativo	Negativo
Saler - Parador Saler	7	1	8	Negativo	Negativo
Saler - Devesa Trampa 4	0	9	9	Negativo	Negativo
Saler - Jardín Detrás pueblo Saler	4	6	10	Negativo	Negativo
1 Viveros	2	0	2	Negativo	Negativo
2 Viveros	7	1	8	Negativo	Negativo
3 Viveros	6	1	7	Negativo	Negativo
4 Viveros	0	1	1	Negativo	Negativo
1 Rambleta	5	2	7	Negativo	Negativo
Alameda (Passeig Albereda)	6	2	8	Negativo	Negativo
Tres Creus	3	6	9	Negativo	Negativo
UNED	4	0	4	Negativo	Negativo
Barri La Llum	0	0	0	-	-
Hermanos Maristas	0	0	0	-	-

En la figura 42 se puede observar el resultado del revelado de las muestras de DNA en gel de agarosa para la detección del fitoplasma. Además de los positivos de referencia, que son muestras en las que el DNA del fitoplasma está presente y el marcador molecular, el cual indica el peso molecular del fragmento de DNA que se busca en las muestras.

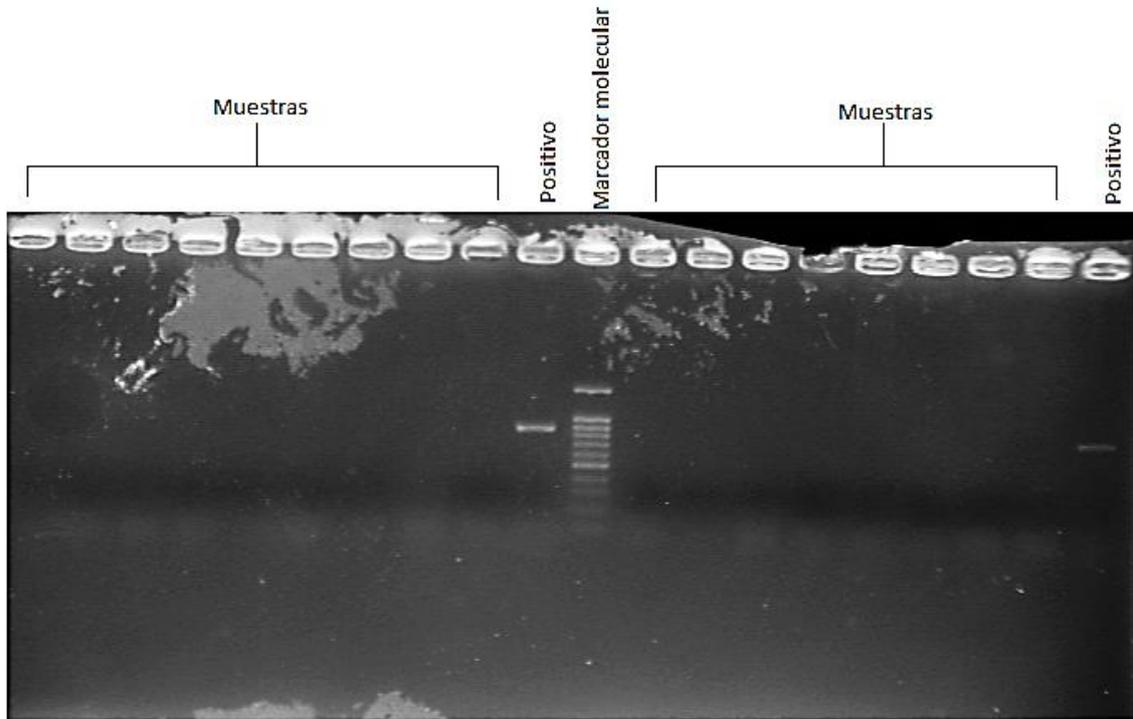


Figura 42. Geles de agarosa revelados con rayos ultravioletas. En la parte superior se observan los pozillos contenedores de DNA, además de los positivos y el marcador molecular.

4.5 Análisis de la sintomatología observada en los árboles en primavera y verano

Durante el invierno transcurrido entre los años 2015 y 2016 se observó sintomatología relacionada con el secado de acículas en distintas zonas de la provincia de Valencia. Se tomaron fotografías de los árboles en ese momento (Figura 43) para realizar un seguimiento de la evolución de los síntomas.



Figura 43. Secado de acículas en *Pinus halepensis* de la Devesa del Saler. Secado de zonas de la copa (izquierda y superior-derecha) y muestra de rama afectada por el secado (inferior-derecha). Febrero de 2016.

Para comparar los posibles cambios observables en las copas de los pinos se realizó un registro fotográfico en los meses de abril y julio, del cual se muestran algunos ejemplos a continuación (Figura 44, 45, 46 y 47).

En todos los árboles se observó como las zonas secas de la copa no volvieron a brotar, quedando totalmente muerta la rama, lo que significa un descenso de la actividad fotosintética del árbol. A pesar de ello, en algunos casos, con la brotación del resto de la copa, las acículas secas y de color marrón quedaban entre los nuevos brotes, adquiriendo el árbol una apariencia estética mejor.



Figura 44. Síntomas de secado de acículas en Valencia. Abril 2016 (arriba) Julio 2016 (abajo).



Figura 45. Síntomas de secado de acículas en la Devesa del Saler. Abril 2016 (izquierda) Julio 2016 (derecha).



Figura 46. Síntomas de secado de acículas en Paseo de la Alameda, Valencia. Abril 2016 (izquierda) y Julio 2016 (derecha).



Figura 47. Síntomas muy marcados de secado de acículas en Valencia, Julio 2016. Vista general (arriba) y vista de detalle (abajo).

Discusión

5 DISCUSIÓN

Entre los meses de octubre y marzo de 2015-2016, en diferentes zonas de Valencia se observaron gran cantidad de pinos carrascos las copas de los cuales presentaban una parte con acículas secas y de color marrón. El secado de la copa podía variar entre un 10% de la copa afectada hasta un 50%. La sintomatología era recurrente en muchos de los árboles, afectando siempre al extremo superior de la copa y desde ahí se propagaba hacia abajo.

Esta sintomatología había sido ya observada con anterioridad, pero en el invierno de 2015 se acentuó y fueron numerosos los avisos que llegaron al Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la ETSIAMN advirtiéndolo sobre el problema. Estos avisos procedían de técnicos encargados de la gestión de plagas de jardines municipales (del ayuntamiento de Valencia, Moncada y Museros), técnicos de empresas de fitosanitarios o alumnos de la escuela ETSIAMN.

Hace unos años, en este mismo departamento se hizo un estudio en pinos que presentaban esta misma sintomatología (fogonazo) y en el 21% de los casos se identificó un fitoplasma, *Ca. phytoplasma pini* (Pastor, 2015). Estos resultados coincidieron con estudios realizados en pinos carrasco en otras zonas de España (Schneider *et al.*, 2005). De las muestras donde se identificó el fitoplasma, fue más abundante en los muestreos de primavera-verano que en los de otoño invierno.

A partir del mes de abril se inició el presente TFG, estudiando dos zonas de características muy diferentes pero cuyos pinos presentaban los mismos daños: los pinos de la Devesa del Saler y jardines de la ciudad de Valencia.

Lo primero que se planteó fue volver a realizar los análisis para comprobar la presencia del fitoplasma al tiempo que se hacía un estudio de los artrópodos presentes en los ramillos de los pinos. Se hizo especial hincapié en los artrópodos con aparato picador-chupador (ácaros, pulgones, trips, cochinillas, psilas y cicadélidos) por sus efectos en las plantas. Este tipo de artrópodos al succionar los tejidos de las plantas producen punteados y decoloraciones en los órganos de los que se alimentan (tallos y hojas) y posterior secado y caída de dichos órganos. Otro daño importante que realizan estos artrópodos es la inoculación de toxinas que aumentan los daños y sobre todo que inoculan enfermedades en las plantas como virus, bacterias y fitoplasmas. Los pulgones son conocidos transmisores de virosis, al igual que los trips (Bethke *et al.* 2014), mientras que cicadélidos y psilas transmiten fitoplasmas (Coulson & Witter, 1990).

Para hacer una gestión integrada de plagas en este problema, la única manera que se puede actuar es controlando a los vectores de los patógenos, es decir, a los artrópodos.

Los análisis moleculares se realizaron por una parte en las acículas de los pinos con síntomas igual que en el trabajo anterior (Pastor, 2015). Por otro lado se hicieron análisis de los insectos que podían actuar como vectores, los cicadélidos presentes en los ramillos de los árboles afectados. En ambos casos los resultados han sido negativos.

Las observaciones en los árboles han seguido durante todo el periodo de estudio. Conforme avanzaba la primavera y la temperatura iba en aumento, los daños no se incrementaban, confirmando los resultados de que los daños no eran debidos a un fitoplasma. En abril y mayo, con la nueva brotación de los pinos las partes secas de los árboles quedaron ocultas por las nuevas hojas. Pero el daño persiste. La parte de copa que estaba seca no ha vuelto a brotar y estos daños contribuyen al debilitamiento de los pinos.

En las acículas de los pinos de los ramillos analizados hemos encontrado cochinillas diaspíridas del género *Leucaspis* sp. que en algunos árboles son muy abundantes y que con su alimentación producen el secado de las acículas.

En el pinar de la Devesa del Saler, se instalaron trampas amarillas pegajosas las cuales atraen a un gran número de homópteros, trips y enemigos naturales como himenópteros parasitoides. Después de analizarlas y realizar un conteo, se detectaron un gran número de trips y pulgones durante los meses de abril y mayo respectivamente. Los pulgones se han identificado hasta el nivel de especie. Sin embargo no consideramos que la población de pulgones haya sido lo suficientemente elevada como para provocar daños tan graves. Respecto de los trips no tenemos información de daños por trips en pinos, aspecto que queda por estudiar.

Durante la primavera se recolectaron muestras de ramillos de pinos afectados y en ellos se encontraron ácaros del género *Oligonychus*. Al no tener la capacidad de volar, la observación de los ramillos fue el único método posible para obtener datos sobre sus poblaciones. Las especies del género *Oligonychus* están consideradas plagas graves de coníferas, incluidos los pinos (Puchalska, 2006). Como resultado de la alimentación de estos ácaros se produce moteado, punteado y decoloración de las acículas. Las acículas se vuelven de color marrón y posteriormente caen. Todos los estadios de desarrollo de los ácaros que se alimentan de las acículas prefieren las acículas viejas a las recién nacidas, y constituyen un problema sobre todo en primavera y otoño. Los veranos calurosos y secos provocan un marcado descenso de su actividad (Johnson & Lyon, 1991). Es posible que debido al invierno tan suave del presente año, la actividad del ácaro se haya mantenido durante toda la estación y por ello los daños hayan sido más visibles. Al llegar la primavera y con el aumento de las temperaturas, cabe la posibilidad de que la actividad del ácaro haya disminuido y también los daños. A este efecto de la temperatura hay que añadir los periodos de sequía tan prolongados que se han dado en los últimos años y que contribuyen también al debilitamiento de los árboles, haciéndolos más vulnerables al ataque de organismo patógenos.

Con este trabajo se ha empezado a analizar los agentes que pueden provocar el secado de las acículas en la primavera e inicio del verano. Con estos datos, se podría continuar con los estudios durante el otoño y el invierno, volviendo a analizar los artrópodos presentes en los ramillos y en particular la presencia de ácaros.

El problema que hemos denominado “secado de acículas” es un problema sanitario que afecta a la salud de los pinos. La única forma de combatir el daño producido por fitoplasmas es actuando sobre sus vectores, que normalmente son insectos. Es obligatorio hacer un control de las plagas siguiendo los principios de la GIP (Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre

de uso sostenible de fitosanitarios), lo que obliga a conocer a los artrópodos responsables de los daños y su biología para poder aplicar los métodos de control más adecuados.

Debido a la gran alarma que produjo el secado de las copas en el invierno pasado, se tomaron muestras de algunos árboles y en ellos se hicieron aplicaciones de plaguicidas. El día 24 de abril de 2016 se realizó un tratamiento fitosanitario para el control de ácaros del género *Oligonychus* consistente en la aplicación de Align (azadiractina) mediante inyecciones en el tronco de los árboles. Se trataron siete pinos del paseo de la Alameda y seis pinos del Jardín del Real de Viveros. El producto fue diluido en agua al 12,5% de volumen. El gasto de caldo utilizado por árbol fue de 2 ml de producto por cada 10 cm de perímetro del tronco a una altura de 1-2 metros del suelo. Se realizaron inyecciones cada 20 cm de perímetro del tronco. Los resultados de los tratamientos no han mostrado una mejoría demostrable debido a que la brotación de los árboles en verano puede ser la causante del mejor aspecto visual de los árboles.

Como propuesta de GIP se propone hacer un seguimiento de los artrópodos chupadores para hacer algún tipo de actuación (química o silvícola) en cuanto se detecten los primeros daños y la aparición de los primeros artrópodos chupadores, dado que una vez producido el secado en una zona de la copa los daños son irrecuperables.

Conclusiones

6 CONCLUSIONES

- Se ha estudiado el problema del secado de copas del pino carrasco para averiguar sus posibles responsables, y se han obtenido datos que sirven como base para conocer el estado de la masa de *Pinus halepensis* y sus artrópodos hospedadores.
- La diversidad de artrópodos encontrada ha sido muy amplia, habiendo encontrado en las muestras de ramillos: pulgones, cicadélidos, cochinillas diaspíridas, trips y ácaros del género *Oligonychus*.
- Tanto en las muestras de acículas como en los cicadélidos, mediante las pruebas moleculares, no se ha detectado la presencia del fitoplasma '*Candidatus Phytoplasma pini*'
- De todos los artrópodos encontrados en el periodo de muestreo ninguno ha aparecido en un nivel de población lo suficientemente elevado para considerarlo responsable.
- Para hacer una GIP según el Real decreto Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre de uso sostenible de fitosanitarios en parques y jardines, se recomienda hacer un tratamiento en cuanto se detecten nuevos síntomas en otoño y la aparición de los primeros artrópodos chupadores sobre los árboles.
- Se propone realizar podas de saneamiento en las zonas secas de la copa para estimular la brotación del árbol y, además, mejorar el aspecto estético de los árboles, al tratarse de árboles utilizados como ornamentales.
- Repetir el muestreo a partir del mes de septiembre cuando las temperaturas empiecen a suavizarse y comiencen a subir los niveles de población de los artrópodos.

Bibliografía

7 BIBLIOGRAFÍA

ALMA, A.; BOSCO, D.; DANIELLI, A.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; ARZONE, A. 1997, "Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants", *Insect Molecular Biology*, no. 6, pp. 115-121.

BAKER, W. L. 1948, "Transmission by leafhoppers of the virus causing phloem necrosis of American elm", *Science*, no. 108, pp. 307-308.

BAKER, W. L. 1949, "Studies on the transmission by leafhoppers of the virus causing phloem necrosis of American elm, with notes on the biology of its vector", *J. Econ. Entomol.*, no. 42, pp. 729-732.

BETHKE, J. A.; DREISTADT, S. H. & VARELA, L. G. 2014, *Integrated Pest Management Program*, University of California, Davis, CA 95618-7774.

BINAZZI, A., MICHELENA, J. M., & SANCHÍS, A. 1996, "Lachninae (Homoptera, Aphididae) del Sistema Ibérico Meridional", *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, vol. 22, no. 3, pp. 621-629.

BLACKMAN, R. L., & EASTOP, V. E. 1994, *Aphids on the world's trees*, CAB International. Natural History Museum, Londres.

CAMARENA GUTIÉRREZ, G., ALMARAZ, T., & DE LA, R. 2008, "Fitoplasmas: síntomas y características moleculares", *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, vol. 14, no. 2, 81-87.

CASTRESANA, L. & NOTARIO, A. 1992, "Consideraciones acerca de los pulgones de coníferas en España y sus claves de Identificación" *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, vol. 18, no.2, pp. 373-376.

COULSON, R. & WITTER, J. 1990, *Entomología Forestal: Ecología y control*, Editorial Limusa, México, 1ª ed.

DAJOZ, R. 2001, *Entomología Forestal: los insectos y el bosque. Papel y diversidad de los insectos en el medio forestal*, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, edición española.

DE JONG Y.; VERBEEK, M.; MICHELSEN, V.; BJØRN, ; LOS, W.; STEEMAN, F.; BAILLY, ; BASIRE, C.; CHYLARECKI, P.; STLOUKAL, E.; HAGEDORN, G.; WETZEL, F.; GLÖCKLER, F.; KROUPA, A.; KORB, G.; HOFFMANN, A.; HÄUSER, C.; KOHLBECKER, A.; MÜLLER, A.; GÜNTSCH, A.; STOEVE, P. & PENEV, L. 2014, Fauna Europaea – all European animal species on the web. *Biodiversity Data Journal* 2: e4034. doi: 10.3897/BDJ.2.e4034.

GODFREY, L. D., 2011, *Integrated Pest Management Program*, University of California, Davis, CA 95618-7774.

HANBOONSONG, Y.; CHOOSAI, C.; PANYIM, S.; DAMAK, S. 2002, "Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura)", *Insect Molecular Biology*, no. 11, pp. 97-103.

HÓDAR, J. A., CASTRO, J., & ZAMORA, R. 2003, "Pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa* as a new threat for relict Mediterranean Scots pine forests under climatic warming", *Biological Conservation*, vol. 110, no. 1, pp. 123-129.

JOHNSON, W. T., & LYON, H. H. 1976, *Insects that feed on trees and shrubs*, Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Second Edition.

KIRKPATRICK, B. C.; SMART, C.; BLONQUIST, C.; GUERRA, L.; HARRISON, N.; AHRENS, U.; LORENZ, K H.; SCHNIDER, B.; SEEMÜLLER, E. 1994, "Identification of MLO-specific PCR primers obtained from 16s/23s rRNA spacer sequences", *Proceedings of the 10^a internacional Congress of the Internacional Organization for Mycoplasmaology (IOM)*, pp. 261-262

KUMMERT, J. & RUFFLARD, G. 1997, "A preliminary report on the detection of phytoplasma by PCR", *Biochemica*, vol. 1, no. 1, pp. 19-22.

LEE, I. M.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; DAVIS, R. E.; BARTOSZYK, I. M. 1998, "Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences", *International Journal of Systematic Bacteriology Microbiol*, no. 48, pp. 1153-1169.

LESSIO, F. & ALMA, A. 2004, "Dispersal patterns and chromatic response of *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera Cicadellidae), vector of the phytoplasma agent of grapevine flavescence dorée", *Agricultural and Forest Entomology*, vol. 6, pp. 121-127.

LORENZ, K.-H.; SCHNEIDER, B.; AHRENS, U. & SEEMÜLLER, E. 1995, "Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA", *Phytopathology*, vol. 85, no. 7, pp. 771-776.

MARTÍN, E. 2010, "*Tomicus piniperda*, perforador de pinos: ciclo biológico, daños y métodos de control.", *Plagas y Enfermedades, Sanidad Forestal*, Red Foresta.

NISHIGAWA; SHIN-ICHI MIYATA; KENRO OSHIMA; TOSHIMI SAWAYANAGI; AKIHIRO KOMOTO; TSUTOMU KUBOYAMA; IZUMI MATSUDA; TSUNEO TSUCHIZAKI; SHIGETOU NAMBA. 2001, "In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins", *Microbiology*, no. 147, pp. 507-513.

NOTARIO, A. & BARAGAÑO, J. R. 1992, "Die Pflanzenläuse (*Aphidina*) der Nadelhölzer (*Coniferae*) in Spanien" *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*, vol. 65, no. 1, pp. 11-13.

NOTARIO, A., BARAGAÑO, J. R., & CASTRESANA, L. 1992, "Contribución al estudio de los pulgones que atacan a las coníferas españolas", *Ecología, ICONA*, Madrid, no. 6, pp. 313-333.

PASTOR, C. 2015, "Deformaciones en pino relacionadas con 'Candidatus Phytoplasma pini' en la Comunidad Valenciana", Trabajo de fin de Máster en Producción Vegetal y Ecosistemas Agroforestales, Universidad Politécnica de Valencia.

PUCHALSKA, E. 2006, "The influence of *Oligonychus ununguis* Jacobi (Acari: Tetranychidae) on photosynthetic activity and needle damage of *Picea glauca* 'Conica'", *Biological Lett*, vol. 43, no.2, pp. 353-360.

- REMAUDIÈRE, G. & SECO, V. 1990, *Claves de pulgones alados de la región mediterránea*, Universidad de León Secretariado de Publicaciones, vol. 1, 1ª edición.
- ROBINET, C., & ROQUES, A. 2010, "Direct impacts of recent climate warming on insect populations", *Integrative Zoology*, vol. 5, no. 2, pp. 132-142.
- ROSEN, D., 1990, *Armored scale insects: their biology, natural enemies and control*, vol. A, Elsevier Science Publishers.
- SERRADA, R., MONTERO, G., & REQUE, J. A. 2008, *Compendio de selvicultura aplicada en España*, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid.
- SCHNEIDER, B., TORRES, E., MARTÍN, M. P., SCHRÖDER, M., BEHNKE, H. D., & SEEMÜLLER, E. 2005, "'graner Phytoplasma pini', a novel taxon from Pinus silvestris and Pinus halepensis", *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 55, no. 1, pp. 303-307.
- SCHNEIDER, B.; AHRENS, U.; KIRKPATRICK, B. C.; SEEMULLER, E. 1993, "Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR amplified 16S rDNA", *J Gen Microbiol*, no. 139, pp. 519-527.
- VILLANUEVA, J. 2005, *Tercer inventario forestal nacional (1997-2007)*, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.



Anexos

8 ANEXOS

ANEXO.1. Protocolo de extracción de DNA: Método KIT EZNA™

1. Triturar aproximadamente 50 mg de muestra congelada usando uno de los tres métodos que se citan a continuación:
 - *Tissuelyser*: Mediante el uso del aparato. Durante 10 min. A 50 oscilaciones.
 - *Nitrógeno*: Con mortero y maza, autoclavado, preenfriado y nitrógeno líquido se tritura hasta conseguir un polvo homogéneo.
 - *Con maza en bolsa*: Se dispone la muestra en bolsas de plástico transparente “tipo ELISA” y se tritura el material vegetal golpeando con una maza.
2. Añadir 800 µl de tampón P1 y vortear vigorosamente.
3. Transferir 600 µl a un nuevo tubo *ependorf*.
4. Incubar a 65°C al menos 5 min agitando los tubos una vez durante la incubación.
5. Añadir 140 µl de tampón P2 y vortear.
6. Centrifugar 10 min a 13000 rpm.
7. Cuidadosamente pipetear 600 µl del sobrenadante a un nuevo tubo, sin transferir restos vegetales.
8. Añadir ½ volumen de tampón P3 (300 µl) y un volumen de Etanol absoluto (600 µl) y mezclar.
9. Pasar 800 µl a una columna HiBindDNA acoplada a un tubo colector de 2 ml.
10. Centrifugar 1 min a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.
11. Pasar el resto del volumen por la columna.
12. Centrifugar 1 min a 13000 rpm y descartar el sobrenadante y el tubo colector.
13. Pasar la columna a nuevo tubo colector y añadir 750 µl de Wash Buffer.
14. Centrifugar 1 min a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.
15. Volver a centrifugar 2 min a 13000 rpm para eliminar restos de alcohol de la columna.
16. Transferir la columna a un tubo *ependorf* estéril y añadir 100 µl de agua PCR precalentada a 65°C e incubar 1 min a RT.
17. Centrifugar 1 min a 13000 rpm
18. Volver a añadir 50 µl de agua PCR precalentada, incubar 1 min a RT y centrifugar 1 min a 13000 rpm.
19. Con este protocolo se obtienen de a 10 µg.

ANEXO.2. Protocolo de PCR

1. Preparar bandeja con hielo picado de forma que se mantenga la temperatura de los reactivos y de las muestras para evitar su deterioración por desnaturalización.
2. Sacar las muestras de DNA del congelador (Concentración 1:1) y los reactivos necesarios para que se vayan descongelando.
3. Preparar dilución 1:10 de las muestras de DNA, 9 partes de H₂O PCR (45 µl) por cada parte de DNA (5 µl).
4. Sacudir los tubos para evitar formaciones de gotas en las paredes y procurar ir metiendo los tubos en el hielo conforme se van haciendo las diluciones.
5. Preparar la mezcla de reactivos de PCR acorde al número de muestras en un tubo *ependorf* de 1,5 ml tal como se indica a continuación:

Biotoools TAB10X	2,5 µl		X µl
dNTP	0,5 µl		X µl
U3 (<i>Primer</i>) 20 µM	0,5 µl		X µl
U5 (<i>Primer</i>) 20 µM	0,5 µl	· nº de muestras + 10% + 3 *	X µl
Taq Polimerasa	1,0 µl		X µl
H2O PCR	19,0 µl		X µl
Suma	24,0 µl		X µl
DNA	<u>1,0 µl</u>		
Suma total	25,0 µl		

*Se estima un 10% de error de pipeteo, además de 2 de muestras positivas y una en blanco (sin DNA) para el control de la PCR.

6. Rotular tubos *ependorf* de 200 µl e ir añadiendo 24 µl de disolución para PCR y 1 µl de cada muestra de DNA, tanto de concentración 1:1 como de las diluciones 1:10.
7. Centrifugar durante unos segundos cada tubo *ependorf*.
8. Introducir en el termociclador, seleccionando el programa indicado para nuestros *primers* U3 y U5.
9. Una vez finalizado el programa, sacar las muestras del termociclador.

ANEXO.3. Protocolo de Electroforesis en gel de agarosa

En un molde de metacrilato se coloca un peine o los necesarios (para formar los pocillos donde se colocarán posteriormente las muestras) y dos topes de goma a los lados para formar un molde estanco en el que verter el gel.

Para un gel de 15 x 7,5 x 0,5 cm, se disuelven 1,2 g de agarosa en 100 ml de tampón TAE 1X calentando la solución en microondas sin que llegue a hervir.

Se deja enfriar la agarosa en el recipiente hasta que se pueda coger con las manos desnudas sin peligro de que se quemen, de esta forma se evita que la placa de metacrilato se deforme por verter el líquido demasiado caliente.

Se vierte la agarosa en la placa con cuidado de no formar burbujas, dejándola 25 minutos a temperatura ambiente para que gelifique. Una vez gelificada se retiran con cuidado los topes de goma y los peines.

Se coloca la placa en una cubeta horizontal de electroforesis y se llena con tampón TAE 1X de forma que el gel quede cubierto.

En los pocillos de gel se pipetea mezclas de 2 μ l de tampón de carga con 5 ml del producto de PCR amplificado. En los pocillos de cada extremo del peine se añaden 3 μ l de un marcador de peso molecular conocido (GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Alemania).

Se conectan los dos electrodos de la fuente eléctrica a la cubeta (cerciorándonos de que la parte más cercana a los pocillos debe estar más cerca del polo negativo) aplicando un voltaje de 160 V durante un tiempo suficiente hasta que el frente del colorante se encuentre a 2 cm del final del gel.

Tras la electroforesis el gel se revela tiñéndolo con una solución de bromuro de etidio (0,5 μ l/ml) durante 20 minutos. Tras ello se elimina el exceso de bromuro de etidio sumergiendo el gel en agua destilada brevemente.

Para visualizar los fragmentos de DNA se emplea un transiluminador con luz ultravioleta (UV) (315nm) instalado en un equipo de fotodocumentación de geles (Gelprinter plus, TDI, Madrid, España).

Colorante de electroforesis

6X DNA Loading Dye (Fermentas, Alemania)

ANEXO.4. Mapas de pies con afecciones y tablas de coordenadas

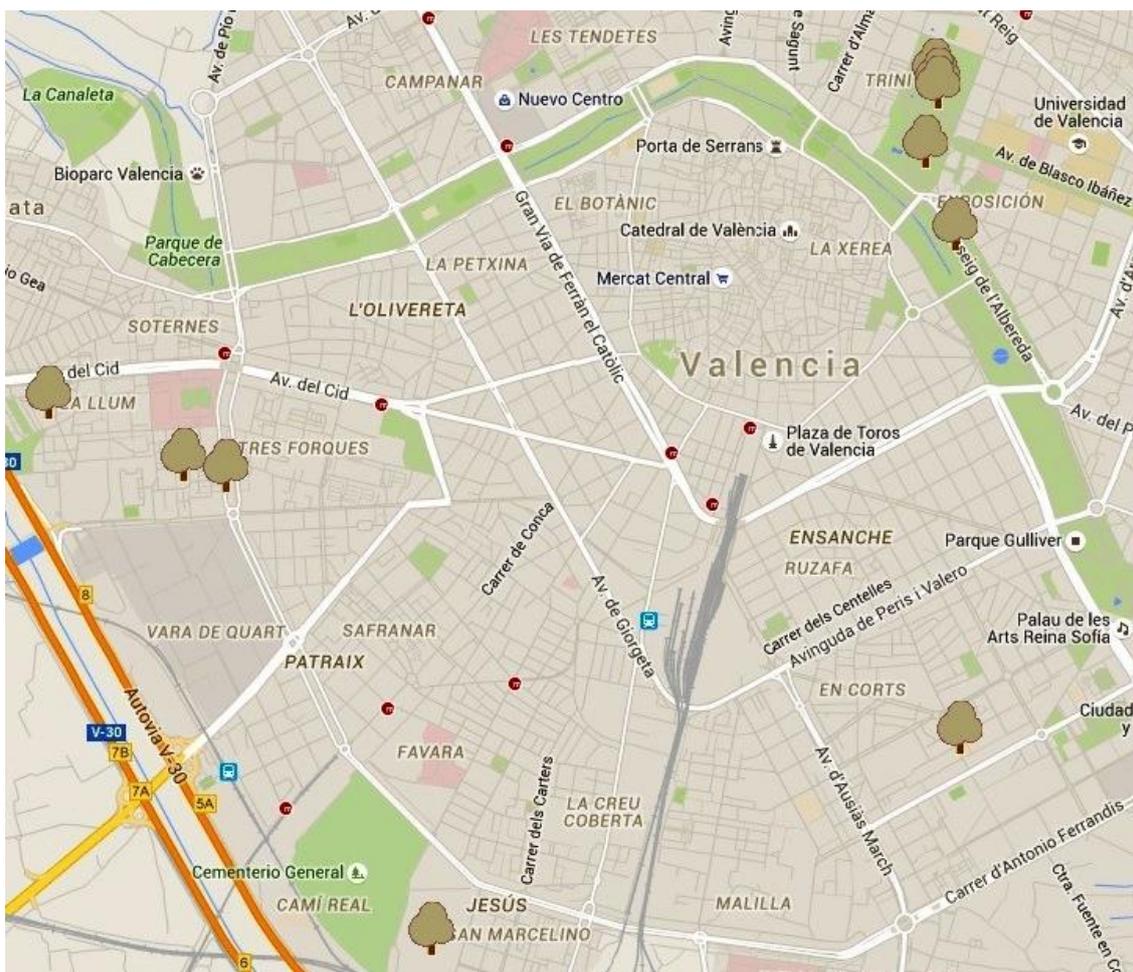


Figura 48. Mapa de los pies de *Pinus halepensis* Miller muestreados y analizados de los jardines de la ciudad de Valencia.

Tabla 7. Coordenadas de árboles de jardines de la ciudad de Valencia.

Nombre completo	Coordenadas (Grados)	Coordenadas (UTM)
1 Viveros	39.48147, -0.36734	30 S 726429 4373517
2 Viveros	39.48147, -0.36734	30 S 726429 4373517
3 Viveros	39.47819, -0.36783	30 S 726398 4373152
4 Viveros	39.47819, -0.36783	30 S 726398 4373152
1 Rambleta	39.44476, -0.39490	30 S 724176 4369373
Alameda (Passeig Albereda)	39.47583, -0.36709	30 S 726469 4372892
Tres Creus	39.46473, -0.40618	30 S 723142 4371562
UNED	39.46488, -0.40840	30 S 722950 4371573
Barri La Llum	39.46756, -0.41583	30 S 722302 4371852
Hermanos Maristas	39.45328, -0.36596	30 S 726639 4370391

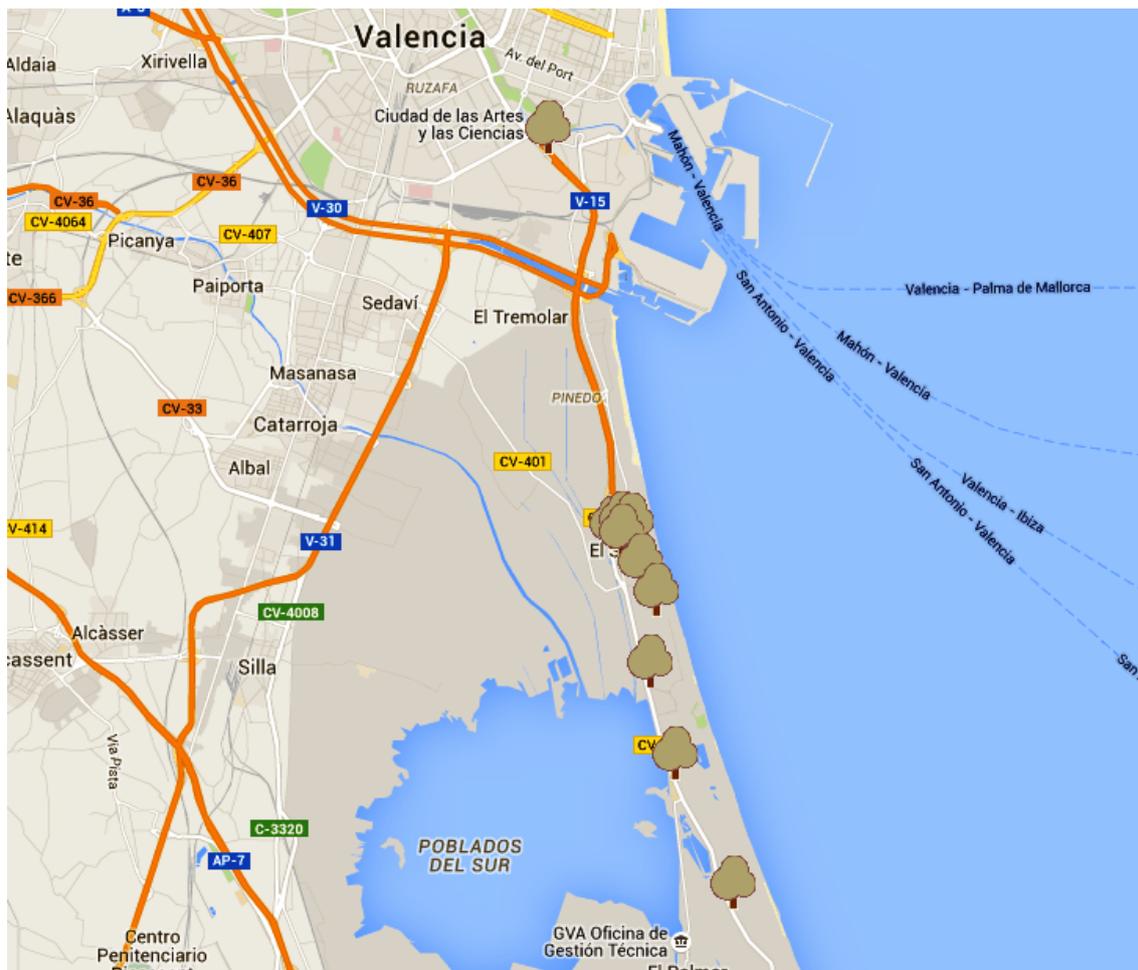


Figura 49. Mapa de los pies de *Pinus halepensis* Miller muestreados y analizados de la Devesa del Saler.

Tabla 8. Coordenadas de árboles de la Devesa del Saler.

Nombre completo	Coordenadas (Grados)	Coordenadas (UTM)
Salser - Frente IES	39.38232, -0.33144	30 S 729843 4362602
Salser - IES cerca rotonda	39.38263, -0.33197	30 S 729796 4362635
Salser - Camino Sentidos pto 2	39.37564, -0.32731	30 S 730221 4361871
Salser - Carretera El Salser - El Palmar	39.36531, -0.32811	30 S 730185 4360723
Salser - Gola de Pujol	39.34308, -0.32057	30 S 730909 4358274
Salser - Jardín Detrás pueblo Salser	39.38235, -0.33408	30 S 729615 4362599
Salser - Carretera Sur Salser	39.38104, -0.33213	30 S 729788 4362458
Salser - Autovía V-15	39.44965, -0.34817	30 S 728182 4370033
Salser - Parador Salser	39.32096, -0.30778	30 S 730909 4358274
Salser - Devesa Trampa 4	39.37103, -0.32463	30 S 730467 4361366

ANEXO.5. Tabla de muestras de acículas

Tabla 9. Muestras de acículas, códigos de identificación y resultados de presencia de fitoplasma.

Fecha	Nombre completo	Nº Registro Laboratorio	Nº Identificación Laboratorio	Acrónimo	Resultado PCR 1:1	Resultado PCR 1:10
17/06/2016	Saler - Frente IES	855/16	58	IES	Negativo	Negativo
17/06/2016	Saler - IES cerca rotonda	856/16	59	JIES	Negativo	Negativo
17/06/2016	Saler - Camino Sentidos pto 2	854/16	56	CS2	Negativo	Negativo
17/06/2016	Saler - Carretera El Saler - El Palmar	857/16	60	CEP	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Gola de Pujol	784/16	48	GP	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Jardín Detrás pueblo Saler	785/16	49	JDS	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Carretera Sur Saler	783/16	47	CSS	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Autovía V-15	781/16	45	AUT	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Parador Saler	782/16	46	PAS	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Devesa Trampa 4	786/16	50	DT4	Negativo	Negativo
03/05/2016	1 Viveros	766/16	40	1V	Negativo	Negativo
03/05/2016	2 Viveros	767/16	41	2V	Negativo	Negativo
03/05/2016	3 Viveros	765/16	42	3V	Negativo	Negativo
03/05/2016	4 Viveros	768/16	43	4V	Negativo	Negativo
03/05/2016	1 Rambleta	769/16	44	1R	Negativo	Negativo
20/05/2016	Alameda (Passeig Albereda)	849/16	51	1AL	Negativo	Negativo
03/06/2016	Tres Creus	850/16	52	TC	Negativo	Negativo
03/06/2016	UNED	851/16	53	UNED	Negativo	Negativo
03/06/2016	Barri La Llum	852/16	54	BLL	Negativo	Negativo
03/06/2016	Hermanos Maristas	853/16	55	HM	Negativo	Negativo

ANEXO.6. Tabla de muestras de cicadélidos

Tabla 10. Muestras de cicadélidos, códigos de identificación, número de capturas por árbol y resultados de presencia del fitoplasma

Fecha	Nombre completo	Nº Registro Laboratorio	Nº Identificación Laboratorio	Acrónimo	Analizados Ninfas	Adultos	Total	Resultado PCR 1:1	Resultado PCR 1:10
15/04/2016	Saler - Frente IES	793/16	7	1Scic	5	2	7	Negativo	Negativo
15/04/2016	Saler - IES cerca rotonda	794/16	8	2Scic	9	1	10	Negativo	Negativo
15/04/2016	Saler - Camino Sentidos pto 2	795/16	9	3Scic	0	2	2	Negativo	Negativo
15/04/2016	Saler - Camino Perpend Sentidos	-	10	4Scic	0	0	0	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Gola de Pujol	796/16	11	GPcic	5	2	7	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Jardín Detrás pueblo Saler	797/16	12	JDScic B1	10	0	10	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Carretera Sur Saler	798/16	13	CSScic	1	1	2	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Autovía V-15	799/16	14	AUTcic	5	3	8	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Parador Saler	800/16	15	PAScic	7	1	8	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Devesa Trampa 4	801/16	16	DT4cic	0	9	9	Negativo	Negativo
23/05/2016	Saler - Jardín Detrás pueblo Saler	802/16	17	JDScic B2	4	6	10	Negativo	Negativo
03/05/2016	1 Viveros	787/16	1	1Vcic	2	0	2	Negativo	Negativo
03/05/2016	2 Viveros	788/16	2	2Vcic	7	1	8	Negativo	Negativo
03/05/2016	3 Viveros	789/16	3	3Vcic	6	1	7	Negativo	Negativo
03/05/2016	4 Viveros	790/16	4	4Vcic	0	1	1	Negativo	Negativo
03/05/2016	1 Rambleta	791/16	5	1Rcic	5	2	7	Negativo	Negativo
20/05/2016	Alameda (Passeig Albereda)	792/16	6	1ALcic	6	2	8	Negativo	Negativo
03/06/2016	Tres Creus	858/16	18	TCcic	3	6	9	Negativo	Negativo
03/06/2016	UNED	859/16	19	UNEDcic	4	0	4	Negativo	Negativo
03/06/2016	Barri La Llum	-	20	BLLcic	0	0	0	-	-
03/06/2016	Hermanos Maristas	-	21	HMcic	0	0	0	-	-