

XIV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, Valencia, 2013

Estudio de la flora arvense como posible reservorio natural de agentes implicados en el nuevo problema fitosanitario que afecta a los cultivos de apio y zanahoria en Villena (Alicante)

F. Rodríguez-León^{*a}, A. Alfaro-Fernández^{*}, M.I. Font^{*}, J. C. Ferrándiz^{**}, S. Sanjuán^{**}, G.R. Teresani^{***}, E. Bertolini^{***}, M. Cambra^{***}, M. Verdeguer^{*}

^{*}Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, 46022-Valencia, ^apaco.rodriiguezleon@gmail.com

^{**}Agrícola Villena Coop. V., Crta. Del Puerto s/n, 03400-Villena (Alicante).

^{***}Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada a Náquera km 5, 46113-Moncada, Valencia

Resumen: En primavera de 2008 apareció una nueva patología en cultivos de apio (*Apium graveolens*) y zanahoria (*Daucus carota*) de la empresa Agrícola Villena Coop. V de Villena (Alicante). que provocó importantes pérdidas en ambos cultivos. Con el fin de identificar posibles reservorios naturales de los agentes implicados en su desarrollo, se tomaron muestras de las especias arvenses presentes en campos de apio y zanahoria y sus alrededores y se realizaron análisis moleculares para la detección de fitoplasmas, *Spiroplasma citri* y "*Candidatus Liberibacter solanacearum*". Se procesaron 135 muestras de flora arvense, algunas presentaban alteraciones en su desarrollo, pero la gran mayoría eran asintomáticas. Se identificaron 58 especies pertenecientes a 23 familias. De los tres agentes fitopatógenos analizados, únicamente se detectaron fitoplasmas en *Setaria adhaerens* y *Amaranthus blitoides*.

Palabras clave: *Daucus carota*; *Apium graveolens*; arvenses; cicadélidos; psílidos; fitoplasma; *Spiroplasma citri*; "*Candidatus Liberibacter solanacearum*".

1. INTRODUCCIÓN

Desde 2008, un nuevo problema fitosanitario que afecta a los cultivos de apio y zanahoria en Villena (Alicante) se viene repitiendo campaña tras campaña en mayor o menor medida. Según los antecedentes, las sintomatologías anómalas observadas podrían estar causadas por virus, fitoplasmas, *Spiroplasma citri* y "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" (Font *et al.*, 1999; Villaescusa, 2010; Cebrián *et al.*, 2010; Alfaro-Fernández *et al.*, 2012a y b). Como posibles vectores de dichos patógenos se detectó la presencia de hemípteros de las familias *Cicadellidae* y *Aphididae* y de la superfamilia *Psylloidea* en las parcelas afectadas (Villaescusa, 2010; Villaescusa *et al.*, 2011). Dado el carácter polífago de los posibles vectores asociados al problema y a que no existen estudios previos sobre las especies arvenses que podrían estar actuando como reservorio de dichos patógenos en las zonas afectadas, se planteó como objetivo del presente trabajo el estudio de la flora arvense como posible reservorio natural de los patógenos implicados en el nuevo problema fitosanitario que afecta a los cultivos de zanahoria y apio en Villena (Alicante).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se procedió a la realización de inventarios (unidad 100 m²) y toma de muestras de la flora arvense en 4 parcelas y sus alrededores, en tres fechas (12/04/12, 08/05/12 y

03/07/12), muestreando un total de 135 plantas. La cobertura de cada especie se estimó usando los índices de abundancia-dominancia de Braun-Blanquet (Braun-Blanquet, 1979). Las especies muestreadas fueron herborizadas e identificadas, utilizando diversas claves de clasificación Botánica. Las muestras recogidas, tras la extracción previa del ADN, fueron analizadas mediante nested-PCR a fitoplasmas y PCR convencional a *S. citri* y *Ca. L. solanacearum*. Para confirmar la identidad de los fitoplasmas detectados mediante nested-PCR, los productos de PCR obtenidos fueron purificados y secuenciados. Posteriormente, las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov) mediante un análisis BLAST.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. *Inventario e identificación de la flora arvense.* De las 135 muestras de arvenses tomadas en las parcelas de apio y zanahoria y sus alrededores se identificaron un total de 58 especies pertenecientes a 23 familias (algunas muestras eran diferentes ejemplares de la misma especie) y se cuantificó su cobertura (Tabla 1).

Tabla 1. Inventarios de las arvenses identificadas en las cuatro parcelas muestreadas. La cobertura de las mismas se indica mediante los índices de abundancia-dominancia de Braun-Blanquet.

	4.12 P1	5.12 P1	5.12 P2	7.12 P1	7.12 P2	7.12 P3	7.12 P4
PTERIDOFITAS							
Familia Equisetaceae							
<i>Equisetum ramosissimum</i> Desf.						2-3	
MONOCOTILEDÓNEAS							
Familia Amaryllidaceae							
<i>Allium ampeloprasum</i> L.							+
Familia Asparagaceae							
<i>Muscari neglectum</i> Guss. ex Ten.	+						
Familia Cyperaceae							
<i>Cyperus rotundus</i> L.		1-2	1	2	1	1	1
Familia Poaceae							
<i>Bromus madritensis</i> L.	+						
<i>Hordeum marinum</i> Huds.	2						
<i>Oryzopsis miliacea</i> (L.) Asch. & Schweinf.		+					
<i>Phragmites communis</i> Trin.			2		2		
<i>Setaria adhaerens</i> (Forssk.) Chiov.				1			
<i>Setaria verticillata</i> (L.) P. Beauv.				2		2-3	
Familia Xanthorrhoeaceae							
<i>Asphodelus aestivus</i> Brot.		+		2		2-3	
DICOTILEDÓNEAS							
Familia Amaranthaceae							
<i>Amaranthus blitoides</i> S.Watson.		1	2	2		1-2	1-2
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.		2		2-3		2	2
Familia Apiaceae							
<i>Daucus carota</i> L.				+			
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.							1
Familia Boraginaceae							

	4.12 P1	5.12 P1	5.12 P2	7.12 P1	7.12 P2	7.12 P3	7.12 P4
<i>Echium italicum</i> L.				+			
Familia Brassicaceae							
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik.	+	1					
<i>Cardaria draba</i> (L.) Desv.	1						
<i>Diplotaxis erucooides</i> (L.) DC	2	2	2				
<i>Eruca vesicaria</i> (L.) Cav.	+						
<i>Sisymbrella aspera</i> (L.) Spach	1	2	2				
<i>Sisymbrium irio</i> L.	1	2-3	2				
Familia Chenopodiaceae							
<i>Bassia scoparia</i> (L.) A.J.Scott		1-2	2-3				1
<i>Beta vulgaris</i> L.		1					
<i>Chenopodium album</i> L.		2					
<i>Chenopodium opulifolium</i> Schrad.		1					
<i>Salsola vermiculata</i> L.	3-4	3-4		3-4			
Familia Compositae							
<i>Anacyclus clavatus</i> (Desf.) Pers.	1						
<i>Andryala integrifolia</i> L.		+					
<i>Carduus tenuiflorus</i> Curtis		1					
<i>Centaurea aspera</i> L.							+
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	+						
<i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronq.						2-3	
<i>Eryngium campestre</i> L.							1-2
<i>Podospermum laciniatum</i> (L.) DC.	+						
<i>Scolymus hispanicus</i> L.							2
<i>Senecio vulgaris</i> L.	1						
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	1			1			2
<i>Sonchus tenerrimus</i> L.	+						
<i>Taraxacum dens-leonis</i> Desf.	+						
Familia Convolvulaceae							
<i>Convolvulus arvensis</i> L.					2		
Familia Euphorbiaceae							
<i>Euphorbia serrata</i> L.	+						
Familia Geraniaceae							
<i>Erodium botrys</i> (Cav.) Bertol.	1						
<i>Erodium ciconium</i> (L.) L'Hér.	2						
Familia Lamiaceae							
<i>Lamium amplexicaule</i> L.	1	1-2	1-2				
<i>Salvia verbenaca</i> L.	+						
Familia Leguminosae							
<i>Medicago minima</i> (L.) L.		1-2					
<i>Medicago sativa</i> L.							+
Familia Malvaceae							
<i>Malva neglecta</i> Wallr.			2	1		2	
Familia Papaveraceae							
<i>Fumaria officinalis</i> L.	1	1-2	1-2				
<i>Fumaria parviflora</i> Lam.	+						
<i>Hypecoum imberbe</i> Sm.	+						
<i>Papaver hybridum</i> L.	+	+					
<i>Papaver rhoeas</i> L.	1						
Familia Portulacaceae							
<i>Portulaca oleracea</i> L.		1-2					

	4.12 P1	5.12 P1	5.12 P2	7.12 P1	7.12 P2	7.12 P3	7.12 P4
Familia Ranunculaceae							
<i>Adonis aestivalis</i> L.	+						
Familia Resedaceae							
<i>Reseda alba</i> L.	+						
Familia Urticaceae							
<i>Urtica urens</i> L.	2	2-3	2				

Cobertura += pocos individuos, muy baja; 1= <5%; 2= 5-25%; 3=25-50%; 4=50-75%

En términos de cobertura total las especies de la familia *Brassicaceae* fueron las dominantes en los primeros inventarios (realizados a principios de abril y mayo).

Es destacable el caso de *Salsola vermiculata*, especie que cubría prácticamente la totalidad de la superficie de una de las parcelas anexas a la parcela muestreada P1, ya que al tratarse de una especie perenne podría ser reservorio de vectores polifagos potencialmente transmisores de los agentes estudiados. Una especie del mismo género, *S. kali*, ha sido descrita como reservorio de *Circulifer tenellus*, uno de los principales vectores de *S. citri* (Bové *et al.*, 1988).

3.2. *Detección de los patógenos estudiados en la flora arvense muestreada.* En las 135 muestras de flora arvense analizadas no se detectó ningún positivo a *Ca. L. solanacearum* ni a *S. citri*. Sin embargo, al analizar las muestras mediante nested-PCR con cebadores universales F2n/R2 de fitoplasmas se obtuvieron 21 positivos (Figura 1).

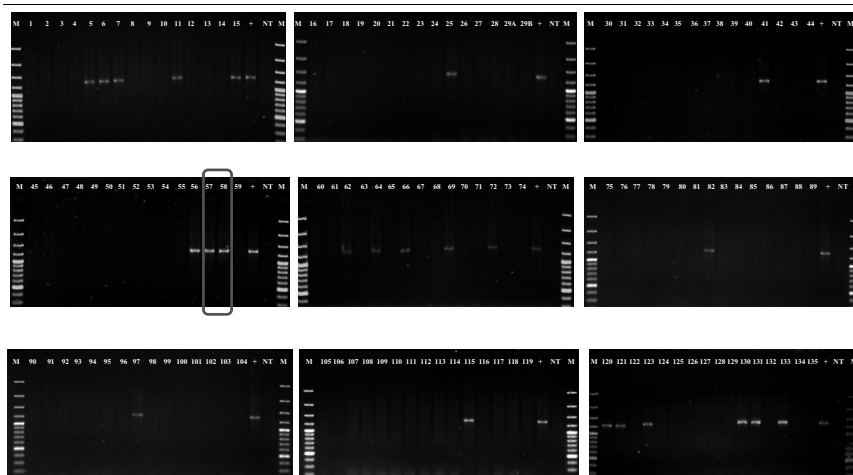


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados en la nested-PCR con cebadores universales F2n/R2 de fitoplasmas. En el recuadro se indican las muestras identificadas como fitoplasma.

Los fragmentos amplificados fueron secuenciados e identificados. Únicamente en dos de las muestras positivas se identificaron fitoplasmas. Con las secuencias se comprobó que el resto de amplificaciones obtenidas correspondían a bacterias no fitopatógenas, pertenecientes principalmente al género *Bacillus*, algunas de ellas descritas en muestras vegetales o presentes en la piel humana. De todas las arvenses

identificadas solo dos especies *Setaria adhaerens* y *Amaranthus blitoides* se registraron como hospedantes de fitoplasmas fitopatógenos. Esta última se encontraba en todas las parcelas, con una abundancia por encima de la media.

4. AGRADECIMIENTOS

Actividades financiadas por el proyecto INIA (RTA2011000142-C03-00).

5. REFERENCIAS

- Alfaro-Fernández A, Cebrián C, Villaescusa, F J, Hermoso de Mendoza A, Ferrándiz JC, Sanjuán S and Font MI (2012a). First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in carrot in mainland Spain. *Plant Disease*, 96, 582.
- Alfaro-Fernández A, Cebrián C, Villaescusa FJ and Font MI (2012b). “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” associated with *Bactericera trigonica* affected carrots in the Canary Islands. *Plant Disease*, 96, 581.
- Bové JM, Fos A, Lallemand J, Raie A, Ali Y and Ahmed N (1988). Epidemiology of *Spiroplasma citri* in the old world. *Proceedings of the 10th International Organization of Citrus Virology Conference (IOCV'86)*, Riverside, USA, pp,295-299.
- Braun-Blanquet J. (1979). *Fitosociología. Bases para el estudio de las comunidades vegetales*. H. Blume Ediciones, Madrid (España).
- Cebrián MC, Villaescusa FJ, Alfaro-Fernández A, Hermoso De Mendoza A, Córdoba-Sellés MC, Jordá C, Ferrándiz JC, Sanjuán S and Font MI (2010). First report of *Spiroplasma citri* in carrot in Europe. *Plant Disease*, 94, 1264.
- Font I, Abad P, Albiñana M, Espino AI, Dally EL, Davis RE and Jordá C (1999). Amarilleos y enrojecimientos en zanahoria: una enfermedad a diagnóstico. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* 25, 405-415.
- Villaescusa F (2010). Avances en el estudio de los agentes implicados en el desarrollo de amarilleos, enrojecimientos y deformaciones en cultivos de apio, zanahoria y chirivía en el Sureste español, y clasificación de sus vectores (cicadelidos, psílidos y áfidos). Trabajo Final de Carrera. ETSIA. 75 pp.
- Villaescusa F, Sanjuan MC, Cebrián A, Alfaro-Fernández A, Font MI, Ferrándiz JC, Hermoso de Mendoza A (2011). Prospección de posibles vectores (Hemiptera: Cicadellidae, Aphididae y Psylloidea) de patógenos en apio y zanahoria. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas*, 37, 163-171.

Summary: *Study of weeds as potential natural reservoir of pathogens associated to the new disease affecting celery and carrot crops in Villena (Alicante). In spring 2008 a new disease was observed in celery (*Apium graveolens*) and carrot (*Daucus carota*) crops in Villena Agricultural Company Coop. V de Villena (Alicante) causing significant losses in both crops. In order to identify potential natural reservoirs of the agents involved in its development, samples of weeds present in celery and carrot fields and surroundings were classified and subjected to molecular analyzes to detect phytoplasmas, *Spiroplasma citri* and “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”. A total of 135 samples were processed, some showed alterations in their development, but the majority were asymptomatic. 58 species were identified belonging to 23 families. Of the three plant pathogens analyzed, only phytoplasmas were detected in *Setaria adhaerens* and *Amaranthus blitoides*.*

Keywords: *Daucus carota; Apium graveolens; weeds; leafhoppers; psyllids; Phytoplasma; Spiroplasma citri; “Candidatus Liberibacter solanacearum”.*