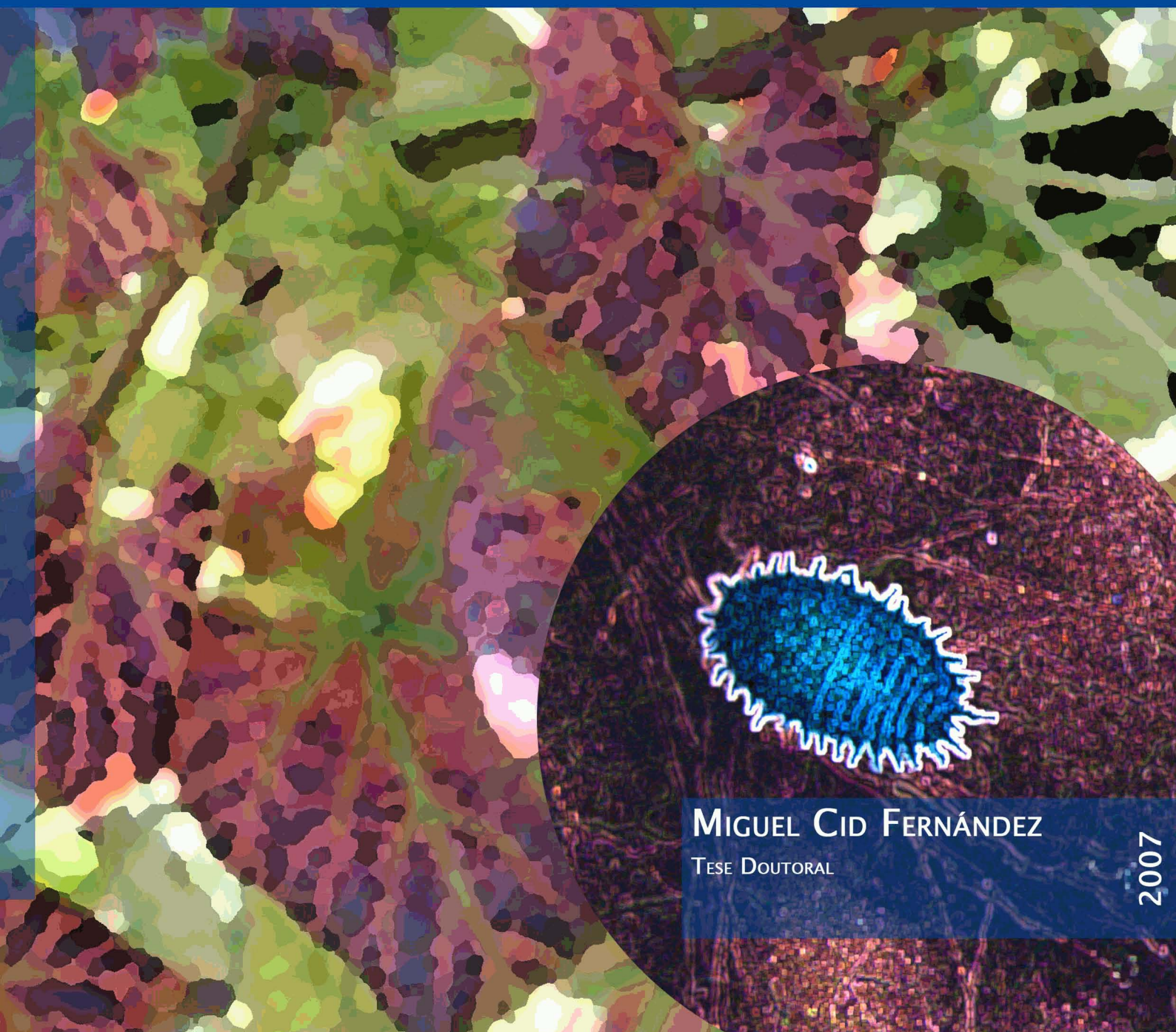


A COCHINILLA ALGODONOSA DOS CÍTRICOS,
Planococcus citri (Risso),
COMO VECTOR DO VIRUS 3 DO ENROLADO DA VIDE (GLRaV-3)



MIGUEL CID FERNÁNDEZ

TESE DOUTORAL

2007

A COCHINILLA ALGODONOSA DOS CÍTRICOS, *Planococcus citri* (RISSO), COMO VECTOR DO VIRUS 3 DO ENROLADO DA VIDE (GLRaV-3)



MIGUEL CID FERNÁNDEZ

2007



FACULTADE DE BIOLOXÍA
Departamento de Fisioloxía Vexetal

A COCHINILLA ALGODONOSA DOS CÍTRICOS, *Planococcus citri* (RISSO), COMO VECTOR DO VIRUS 3 DO ENROLADO DA VIDE (GLRaV-3)

Memoria presentada por

Miguel Cid Fernández
Licenciado en Bioloxía

Para optar ó grao de Doutor

V. e pr. do Director

Miguel Cid Fernández

Antonio Segura Iglesias
Dr. en Bioloxía
Dpto. de Fisioloxía Vexetal
Universidade de Santiago de Compostela

Agradecementos

Ó Dr. Antonio Segura que confiou en min, abriu para min as portas do seu laboratorio e me permitiu facer nel esta tese.

Ó Dr. Franco Faoro que se amosou sempre disposto a colaborar en todo o que lle propuxen, fixo do seu laboratorio o meu e me transmitiu parte da súa fascinación polo mundo da microscopía electrónica.

Ó Dr. Alberto Fereres que me acolleu no seu grupo e me deu a oportunidade de me iniciar no mundo dos EPGs, me guiou polas ondas, estimulou a miña mente e me amosou outro xeito de facer investigación.

Ó Dr. Freddy Tjallingii e á Dra. Cristina Cabaleiro que me aconsellaron e brindaron a súa experiencia.

A Fernando Massó, que brindou xentilmente acceso á súa finca, onde se desenvolveron parte dos ensaios.

Ó Ministerio de Educación Cultura y Deporte que me concedeu a bolsa de Formación de Profesorado Universitario coa que comecei esta longa tese e me permitiu facer a miña primeira estancia no Laboratorio do Dr. Franco Faoro.

Á Fundación Caixa Galicia que me concedeu a bolsa que fixo posible a estancia no Laboratorio do Dr. Alberto Fereres.

Á Dra. María Isabel Fraga que confiou en min e me contratou introducíndome no mundo das algas e do traballo en grupo e facendo posible que continuase os meus traballos coas cochinillas.

Á Universidade de Santiago de Compostela que me concedeu a axuda de viaxe, con participación do Fondo Social Europeo, coa que fixen a miña segunda e fructífera estancia no Laboratorio do Dr. Franco Faoro.

Á Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento da Xunta de Galicia que financiou en parte os traballos co proxecto “Detección do virus do enrolado da vide serotipo 3 (GLRaV-3) en portaenxertos asintomáticos de vide” PGIDT99PXI2003A

Ó Ministerio de Ciencia y Tecnología que financiou en parte os traballos co proxecto “Epidemiología y características de la transmisión del virus del enrollado de la vid (GLRaV-3)” AGL2002-02438

Á Facultade de Bioloxía da Universidade de Santiago de Compostela, ó Istituto di Virologia Vegetale – Sezione di Milano do Consiglio Nazionale delle Ricerche e ó Centro de Ciencias Medioambientales do Consejo Superior de Investigaciones Científicas que me permitiron empregar as súas instalacións.

In Memoriam

*A Ulises e mais a África, por seren negriñas
e quererme tanto tódolos días*

Á serea que me conduciu coa súa cántiga a esta Itaca,
porque sen a súa axuda non tería chegado

*Vinyes verdes vora el mar,
verdes a punta de día,
verd suau cap al tard...
Feu-nos sempre companyia,
vinyes verdes vora el mar!*

Josep M^a de Sagarra

Ós meus pais que están comigo e se preocupan e fixeron que seguise intentándoo
A Bibi, Tino e Berta que me adoptaron como tío e cos que tanto me divirto
A Xabier por tantos anos de matrimonio
Ós que compartiron comigo voltas en bici, paseos polo campo,
algunhas loitas ecoloxéticas e moitos piqueniques
A Pupi, Cris, Bea, Pili e Tere porque con elas pasei moi bos momentos e por
seguielos pasando de aquí en diante aínda que estamos máis lonxe
A Sonia que me acompañou un pouco na longa noite de pedra, porque os
pasteiros vaian mellor que as viñas
A Marián con quen tanto me divirto espantándolle o deus que non deixa de
vixiala, porque cada vez estea máis distraído
A Abelenda que sempre ten algo que che contar e porque sempre anda con
estrañas historias metidas na cabeza,
e a Piti que o baixa das nubes de cando en vez
A Iole, Carlos e Allegue, porque foron moitos aniños xogando ó tute e falando da
iode e porque dá gusto ver de novo á xente á que queres
Ós colonos de Catán que se espallan polo mundo pasando boas tardes
e mellores noites, aínda que ás veces se piquen
A Andrés ó que agora entendo mellor andando todo o tempo con bichiños,
para que nos perdoe por non lle gustar nunca as películas,
e a Carola aínda que non sexa a miña amiga
Á xente da Parede e ós enfeitizadores de plantas que sempre me
botaron unha man cando lles pedín algo
Ós eunucos e eunucas do harén de pulgonas, que por moito
que vixíen sempre acaban preñadas, porque así dá gusto
traballar aínda que ás veces haxa demasiado barullo
Ós galegos de Salamanca, porque me acolleron coma un galego máis e porque alí
se está de vicio, para que nuns anos poidamos deixar correr os días alí

Ós Martín e ás Contreras que me coidan e me miman aínda que sexa “el nuevo”,
porque río moito con eles, aínda que sexan tantísimos
Ós das algas, porque me axudaron a remontar a costa e a verlle outra
cara á investigación, por tantos amenceres ó borde do mar,
iso si que eran mostraxes
Á xente de precarios que ve que un científico é moito máis que pura ciencia,
porque as cousas poden mellorar e foi bonito facelo xuntos
Á xente da Facultade de Bioloxía á que aprecio e coa que sempre hai tempo
de se parar un anaco a falar nas escaleiras
A Suso, que sempre nos abre as portas e nos alimenta un pouco, por ser sempre
a nosa embaixada en Santiago. Por unha adicatoria adebedada
A Flufi co que sempre boto unhas risas e o paso moi ben
Á xente de Milano á que sempre teño gana de volver visitar,
porque están no meu mapa do mundo
A Bonaval que sempre queda nun anaco do recordo, para poder ir tirarse
na herba e ler disfrutando o bo tempo de Santiago
A Lola que me trouxo e me levou tantiñas veces ate as viñas ó pé do mar
e a tantos outros sitios chulos, porque che queden aínda
moitos anos de percorrer mundo
Ás cochis que me soportan estoicamente aínda que ás veces ás ignore
ou as maltrate, porque elas me reconciliaron co mundo
dos que se moven aí abaixo, ou arriba
Ás vides que, aínda que non lles fago xa moito caso, me cativan
e non só polo viño que se tira delas
Ó que sexa que me fai ser feliz e miralo todo cunha boa perspectiva
porque iso me fai vivir moito máis as cousas
Ós que esquecín sen pretendelo

Índice

<i>Agradecementos</i>	5
<i>Índice</i>	11
<i>Introdución</i>	13
<i>Obxectivos e xustificación do traballo</i>	41
<i>Capítulo 1:</i>	45
Bioloxía de <i>Planococcus citri</i> (Risso) como praga de baixa infestación nun viñado conducido en emparrado	
<i>Capítulo 2:</i>	69
Presence of <i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> in primary salivary glands of the mealybug vector <i>Planococcus citri</i> suggests a circulative transmission mechanism	
<i>Capítulo 3:</i>	77
Caracterización mediante EPG dos patróns de onda e o comportamento alimentar de <i>Planococcus citri</i> (Risso) en folla de vide cv. Cabernet franc e en membrana	
<i>Discusión</i>	105
<i>Conclusións</i>	111
<i>Abreviaturas</i>	113

Introdución

Os virus vexetais representan hoxe, xunto coa seca e outros fenómenos climáticos, un dos maiores problemas que poden afectar á agricultura. Enfermidades de graves efectos, incluída a morte da planta, transmisións que poden ser moi rápidas e masivas e a práctica imposibilidade de tratamento das doenzas fan destas uns dos maiores riscos económicos que deben afrontar os agricultores.

A transmisión de virus vexetais pode ser mediada por vectores –insectos (a grande maioría), ácaros, nemátodos e plasmodióforos–, mecanicamente por contacto entre plantas ou por prácticas de cultivo ou ben por grans de pole infectados (Adams & Antoniw, 2007). As transmisións de virus vexetais mediadas por vectores veñen determinadas por tres interaccións distintas: interacción virus-planta, interacción virus-vector e interacción vector-planta.

As interaccións virus-planta son normalmente as primeiras en ser estudadas porque é o primeiro problema que se presenta en campo: a infección. Dentro destas interaccións poderíamos salienta algúns puntos de relevancia: se o virus é restrinxido a algún tecido ou se se espalla sistemicamente por todo o organismo, se a taxa de replicación e movemento dentro do hospedador son altas ou baixas, se os efectos a nivel fisiolóxico e de produción son importantes, se causa a morte do hospedador e o tempo que tarda en producilas, se o hospedador é unha planta anual, bianual ou ben unha leñosa perenne, se existen hospedadores alternativos que poidan servir coma fonte de inóculo en campo e se os síntomas poden servir de reclamo para os vectores do virus.

As interaccións virus-vector poden, en moitos casos, tardar en ser estudadas pois en primeiro lugar hai que descubrir cales son os vectores, no caso de os existir. Unha vez coñecidos os vectores o estudio das interaccións entre ambos é complicado. As máis das veces implica o traballo con plantas con e sen virus e os vectores que fan que os traballos sexan complexos e en moitos casos que se alonguen no tempo ata conseguir coñecer os resultados. Os puntos de interese neste caso inclúen a análise da adquisición e o tempo necesario para que

Introdución

esta se produza, o tempo, o modo e lugar de permanencia de virus infectivos no vector, a eficacia de transmisión, o mecanismo de inoculación para que a infección teña lugar e a transmisión á descendencia do vector.

As interaccións planta-vector son habitualmente estudados dende a perspectiva de seren considerados pragas. O obxectivo será entón analizar o efecto que sobre a produción e rendemento do cultivo ten o vector. Sen embargo a transmisión viral non ten porque estar ligada ó feito de seren praga do cultivo. Os danos derivados das infeccións virais poden ser producidos por niveis de vectores moi baixos que non supoñen problemas para as plantas e o seu cultivo, podendo producirse aínda no caso de non ser a planta hospedadora do vector. Así pois é necesario coñecer as dinámicas poboacionais dos vectores atendendo ó manexo que se fai do cultivo, a capacidade de desprazamento dos vectores, se existen hospedadores alternativos para o vector e se eses hospedadores alternativos supoñen tamén unha fonte de inóculo para a transmisión, o comportamento alimentario dos vectores na planta problema e a coexistencia temporal entre os vectores e as plantas.

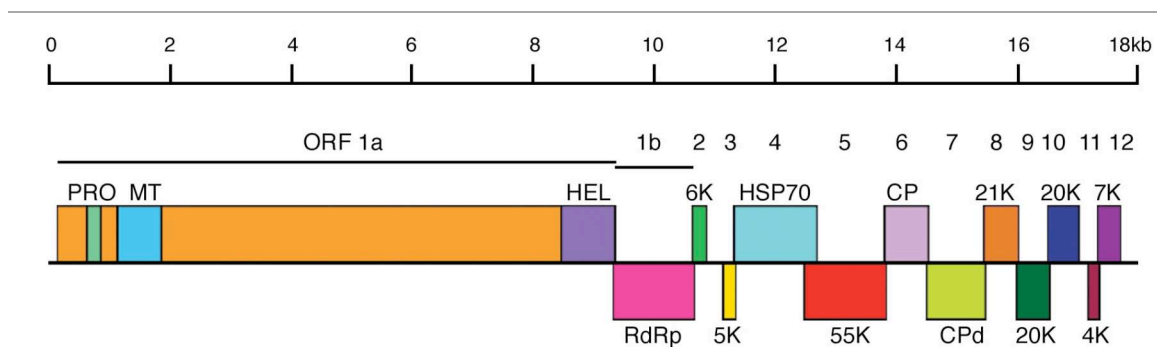


Figura 1: Esquema do xenoma do GLRaV-3. Na parte de abaixo amósase o esquema do xenoma completo do GLRaV-3 aparecen separados como caixas independentes os distintos marcos de lectura aberta (ORF) nos que se estrutura o xenoma (numerados na parte superior). Aparece asimismo ó seu carón o nome segundo a función que presentan, ben cada ORF ben os diferentes dominios. Así pois no primeiro ORF identifícanse un dominio con semellanza a unha proteasa semellante á papaína, un dominio análogo ó dunha metiltransferasa e un dominio análogo a unha helicasa. O segundo ORF (1b) codifica para unha RNA-polimerasa RNA-dependente; o cuarto para unha proteína de choque térmico de 70 KDa; o sexto para a proteína da cápside e o sétimo para a copia diverxente da proteína. O resto dos ORFs aparecen identificados polo tamaño da proteína codificada expresado en kilodaltons. Na parte superior amósase a escala de tamaño do xenoma. (Ling *et al.*, 2004)

VIRUS	XÉNERO	VECTORES	TRANSMISIÓN MECÁNICA
GLRaV-1	Ampelovirus	2 spp. Pseudococcidae e 2 spp. Coccidae	Non
GLRaV-2	Closterovirus	Sen vector coñecido	Si
GLRaV-3	Ampelovirus	9 spp. Pseudococcidae e 1 sp. Coccidae	Non
GLRaV-4	Ampelovirus (provisional)	Sen vector coñecido	Non
GLRaV-5	Ampelovirus	<i>Pseudococcus longispinus</i>	Non
GLRaV-6	Ampelovirus (provisional)	Sen vector coñecido	Non
GLRaV-7	Closteroviridae sen xénero	Sen vector coñecido	Non
GLRaV-8	Ampelovirus (provisional)	Sen vector coñecido	Non
GLRaV-9	Ampelovirus	<i>Pseudococcus longispinus</i>	Non

Táboa 1: Familia dos virus asociados ó enrolado da vide (GLRaV). Na táboa amósanse os membros da familia así como as súas principais características

As tres interaccións están moi ligadas entre si e, en boa medida, as características de cada unha determinan e van estar determinadas polas das outras. Así pois un virus mortal en curto prazo é moi difícil que sexa transmitido por un vector cunha capacidade de movemento moi limitada e cunha efectividade de transmisión moi baixa e de moi baixa persistencia no vector pois o tempo de coexistencia de individuos infectado con sans sería demasiado breve para que teña lugar un suceso infectivo (un vector adquire o virus da planta infectada antes de que esta morra e se despraza ate a planta sa e é quen de lle inocular o virus antes de que perda a súa capacidade infectiva). Sen embargo, se a enfermidade producida polo virus ten un efecto escaso sobre a planta e a súa supervivencia, e sobre todo cando se trata de virus que afectan a plantas perennes, é factible a transmisión por vectores moi pouco eficaces, aínda que o tempo de retención da infectividade por parte do vector sexa baixa: o tempo de coexistencia de plantas sas e infectadas pode chegar a ser moi longo co que aínda que a probabilidade de que se dea un suceso infectivo sexa moi baixa é sinxelo que durante ese longo período se produza alomenos un.

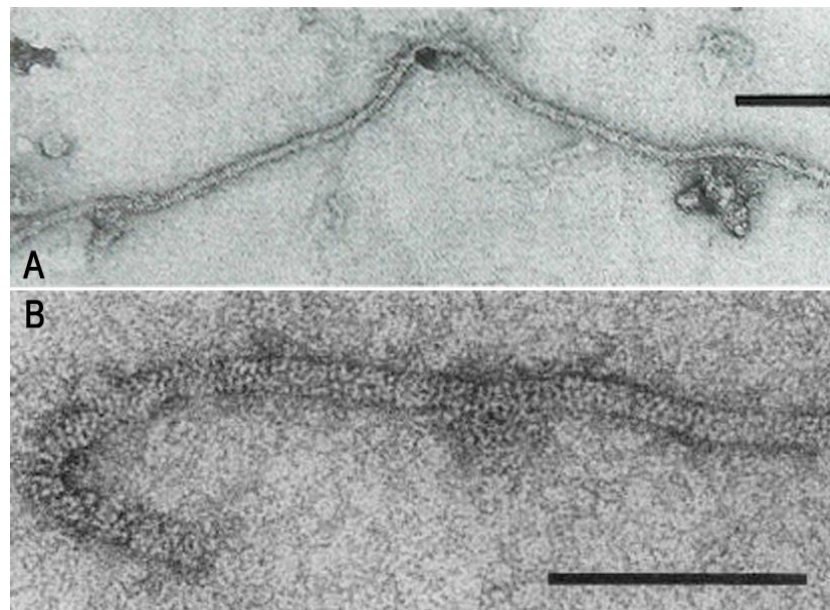


Figura 2: **A.** Micrografía de microscopio electrónico de transmisión dunha partícula de GLRaV-3 capturada por anticorpos e resaltada con tinción negativa realizada con acetato de uranilo ó 2%. (Credi & Giunchedi 1996). **B.** Micrografía de microscopio electrónico de transmisión dunha partícula de *Beet yellows virus* (BYV), especie tipo do xénero *Closterovirus* tinguida con acetato de uranilo no que se pode apreciar o arrollado das proteínas da cápside. (Agranovsky *et al.*, 1995). Barra = 100 nm

Dentro deste último grupo se atopa o sistema virus-planta-vector que vai ser estudio desta tese doutoral. Trátase do sistema *Grapevine leafroll-associated virus 3-Vitis vinifera-Planococcus citri*.

Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)

Este virus, o virus 3 do enrolado da vide, é a especie tipo do xénero *Ampelovirus* que pertence á familia *Closteroviridae* (Martelli *et al.*, 2002). É un dos membros da familia de virus asociados ó enrolado da vide que ata este momento está formada por 9 virus (Táboa 1)

É un virus de RNA de cadea simple de polaridade positiva de 17.919 nucleótidos (nt) (Ling *et al.* 2004). O xenoma está composto por 13 secuencias de lectura aberta (ORFs) franqueadas por dúas secuencias non transcribíbeis (UTRs) unha de 158 nt no extremo 5' e outra de 277 nt no extremo 3' (Ling *et al.* 2004) (Fig. 1). A ORF 1a codifica para unha longa



Figura 3: Microfotografía dun virión de BYV decorado con anticorpos para a copia diverxente da proteína da cápside que amosa a súa distribución nun dos extremos da partícula viral (→). Este tipo de estrutura denomínase *rattlesnake* ou cobra de crótalos. (Agranovsky *et al.*, 1995). Barra = 300 nm.

poliproteína autolítica de 245.277 Da que presenta tres dominios de homoloxía coñecida cunha proteinasa análoga á papaína, unha metiltransferasa e unha helicasa; a ORF 1b que codifica para a RNA-polimerasa RNA-dependente de 60.678 Da; a ORF 2 codifica para unha proteína de 5.927 Da e ven seguida dunha gran rexión interxénica de 1.067 nt; a ORF 3 codifica para unha proteína de 5.090 Da; a ORF 4 codifica para unha proteína de 59.113 Da de alta homoloxía coas HSP70 de closterovirus e que é probable que teña un dominio con actividade ATPasa no extremo N-terminal e outro determinante de interaccións proteína-proteína no extremo C-terminal; a ORF 5 codifica para unha proteína de 54.852 Da sen similaridade significativa con outras secuencias agás un 11-12% de homoloxía coa proteína correspondente de outros membros da familia Closteroviridae; a ORF 6 codifica para a proteína da cápside, de 34.866 Da, que ten unha homoloxía dun 12-16% coa proteína da cápside doutros membros da familia Closteroviridae; a ORF 7 codifica para a copia diverxente da proteína da cápside, típica da familia Closteroviridae, de 53.104 Da; as 5 ORFs restantes, dende a 8 ate a 12 codifican para 5 proteínas sen homoloxía con proteínas de función coñecida. As súas masas moleculares son: ORF 8, 21.248 Da; ORF 9, 19588 Da; ORF 10, 19652 Da; ORF 11, 3933 Da e ORF 12, 6768 Da (Ling *et al.*, 1997, 1998, 2004).

A partícula viral é filamentosa e flexuosa de entre 1800 e 2000 nm de lonxitude (Ling *et al.* 1997) (Fig. 2) e 12 nm (Credi & Giunchedi, 1996) de grosor que está formada, ate onde

se sabe, por dúas proteínas da cápside e unha molécula de RNA. A estrutura da cápside suponse análoga á do resto de membros da familia Closteroviridae: o xenoma aparece arrolado no interior protexido pola proteína da cápside que, disposta de xeito helicoidal, o recubre na súa maior parte, deixando só un dos seus extremos libre, onde aparece a copia diverxente da proteína da cápside (Agranovsky *et al.*, 1995). Esta disposición helicoidal cunha clara polaridade denomínase estrutura en cobra de crótalos (*rattlesnake*) (Fig. 3).

A vide

A vide, *Vitis vinifera* L., é unha liana de bosque caducifolio (Fig. 4). Pertence á familia Vitaceae que agrupa maioritariamente a lianas tanto herbáceas como leñosas de distribución primariamente intertropical aínda que nalgúns casos sufriu adaptacións a medios desérticos. O xénero *Vitis* inclúe unhas 60 especies da área tépeda do hemisferio norte; desas 60 especies a metade son orixinarias de América do Norte, a outra metade de Asia e só unha, *Vitis vinifera*, de Eurasia (Mullins *et al.*, 1992).

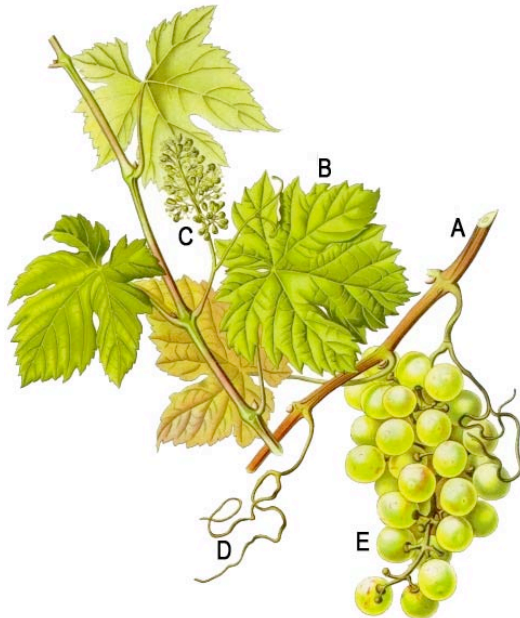


Figura 4: Ilustración de *Vitis vinifera*. Nela amósase o sarmento (A), a folla (B), a inflorescencia en acio (C), o gabián (D) e o acio de froitos (E). (obtido de www.wikipedia.org)

O centro de diversidade de *Vitis vinifera* sitúase a rexión Transcaucásica entre o mar Negro e o mar Caspio, se ben estaba estendida naturalmente por toda Europa á fin do Pleistoceno. Crese que o seu cultivo se orixinou durante o Neolítico (6000-5000 a.n.e.), e aínda que é probable que o primeiro cultivo estivese ligado á utilización da uva para alimentación directa, posteriormente se expandiu ligada á cultura de elaboración do viño. A proximidade do viño

á divindade, que segundo a mitoloxía ensinou o xeito de facelo –é o caso de Osiris, Dionisos e Baco–, e a asimilación do seu uso e emprego en ritos e celebracións polas relixións xudía e cristiá favoreceu a súa expansión. O cultivo da vide pronto se espallou polo Crecente fértil e Exipto e máis tarde a China e, polos fenicios e os gregos, a toda a bacía do Mediterráneo. Foron sen embargo os romanos os que estableceron o cultivo da vide en todo o seu imperio levando con eles as variedades e as técnicas de cultivo. A caída do Imperio Romano xunto con ciclos climáticos fríos repercutiron negativamente no cultivo quedando en grande medida relegado ós mosteiros durante a Idade Media. A importancia do viño e da viña dentro da relixión cristiá fixo entre outras cousas que a viña se movera ó ritmo dos descubrimentos e colonizacións, co que recuperou grande parte do esplendor perdido (Mullins *et al.*, 1992).

Dende o século XVII ó XIX o cultivo da vide tivo que facer fronte a importantes reve- ses que diminuíron importantemente a produción: a Guerra dos Trinta Anos que devastou grande parte dos viñedos do Palatinato, nas ribeiras do Rhin; as xeadas de 1709 que danaron moi seriamente os viñedos setentrionais de Francia e Alemaña; e a entrada en 1868 da filoxe-

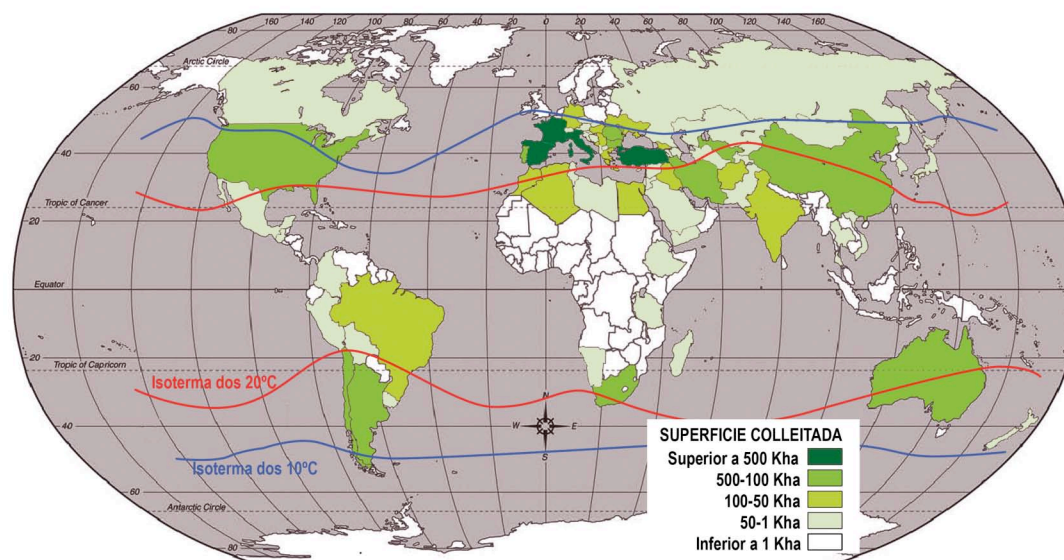


Figura 5: Mapa de distribución do cultivo da vide. O mapa amosa a ditribución da superficie adicada ó cultivo da vide no ano 2006 (datos obtidos a partir de faostat.fao.org) e as isotermas de temperatura media anual (Mullins *et al.*, 1992)

	PRODUCCIÓN (Tm)
Italia	8.325.888
Francia	6.692.550
España	6.401.500
China	6.375.000
Estados Unidos de América	6.093.560
Turquía	4.000.063
Irán	2.963.755
Arxentina	2.880.927
Chile	2.250.000
Xapón	2.098.000
África	3.906.520
Asia	17.337.061
Europa	28.535.598
MUNDO	68.210.510

Táboa 2: Produción mundial de uva segundo territorio. (Datos de 2006 obtidos de faostat.fao.org)

	SUPERFICIE (Ha)
España	1.200.000
Francia	842.026
Italia	754.987
Turquía	550.000
China	483.200
Estados Unidos de América	320.000
Irán	314.547
Portugal	222.528
Arxentina	218.991
Romanía	187.094
África	339.637
Asia	1.883.311
Europa	3.973.023
MUNDO	7.258.420

Táboa 3: Superficie adicada ó cultivo da vide segundo territorio. (Datos de 2006 obtidos de faostat.fao.org)

ra procedente de Norteamérica que afectou rapidamente á maior parte das rexións vitícolas europeas e que deu lugar á posterior entrada do mildeu e o oídio procedentes tamén de Norteamérica a través da utilización de portaenxertos resistentes á filoxera (Mullins *et al.*, 1992).

Vitis vinifera é unha especie de clima tépedo que non aguanta fortes fríos en inverno e que precisa calores relativamente altas no verán para a maduración do seu froito. Estas características, xunto coa preferencia pola seca estival, fan que o clima ideal para o cultivo da vide sexa o mediterráneo, sendo destacables os viños das zonas que posúen este clima (Táboas 2 e 3). O cultivo da vide esténdese en dous cintos entre os paralelos 30 e 50 de latitude norte e entre os 30 e 40 de latitude sur. Estas zonas correspóndense aproximadamente coas delimitadas polas isothermas 10°C e 20°C (Fig. 5). Sen embargo outros factores como correntes frías ou quentes, grandes masas continentais ou a proximidade do mar, así como diferentes altitudes poden modular a súa distribución (Mullins *et al.*, 1992).

A cultivo da vide en Galicia foi introducido probablemente polos primeiros pobos comerciantes que chegaron ás costas, pero foi coa romanización cando se expandiu por gran-

de parte da súa extensión. As oscilacións climáticas modificaron a distribución de xeito que hoxe en día se cultiva prioritariamente na zona sur da Comunidade Autónoma ben ligado á influencia mariña ben ligado ós vales fluviais nas zonas interiores (Martínez Chantada *et al.*, 1999).

O cultivo da vide é análogo ó da maior parte das froiteiras leñosas. O feito de seren plantas perennes e o retardo en chegar á plena produción fai que o emprego das técnicas de enxerto sexan parte vital do seu cultivo. Este feito, ligado ós problemas derivados da filoxera que fan necesaria a utilización de portaenxertos obtidos a partir das vides americanas que son resistentes a este insecto, fai que as trasfegas de material vexetal sexan abundantes. Deste modo o principal xeito de transmisión e dispersión dos virus ligados ó cultivo da vide son as propias técnicas de cultivo.

Sen embargo o feito de se tratar dunha liana fai que a distribución de pés e os modos de titoreo sexan particulares da vide. Tres son os xeitos maioritarios de cultivo empregados (Fig. 6):

-cepa baixa, no que as vides se dispoñen dun xeito máis ou menos ordenado e no que o titoreo é escaso, quedando limitado a unhas cantas varas. En Galicia é frecuente que este

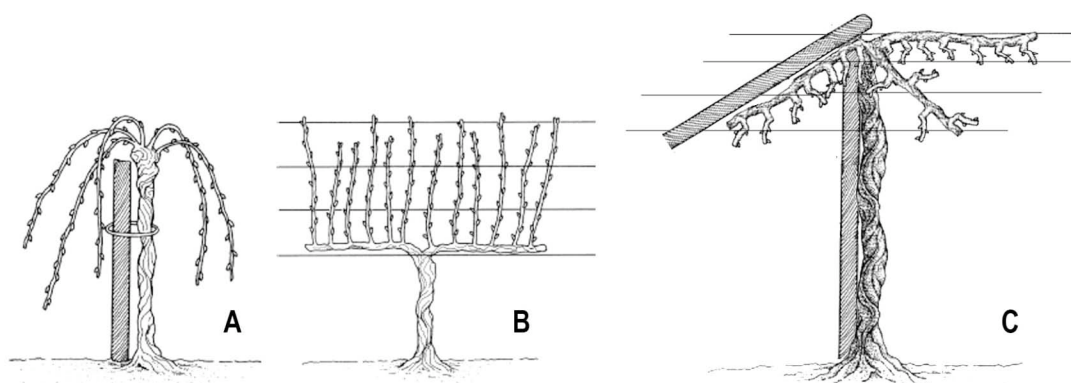


Figura 6: Tipos de condución do cultivo. Os esquemas amosan os principais tipos de condución empregados no cultivo da vide: cepa baixa (A), na que non se emprega un sistema de condución e a planta crece sen guías; en arxóns (B), no que as plantas medran sobre o soporte de cables que se dispoñen nun plano vertical; e en emparrado (C) no que as plantas medran guiadas por cables dispostos en horizontal nun plano elevado entre metro e medio e dous metros de altura.

manexo vaia asociado ó cultivo en socalcos.

-arxóns ou en espaller, no que as vides se dispoñen regularmente en ringleiras e se conducen a modo de muros de modo que se favorece unha maior aireación e insolación e ademais permite a mecanización de moitas tarefas do cultivo.

-parras, no que as vides se distribúen igualmente en ringleiras pero se conducen mediante estruturas horizontais elevadas o que permite un grande aproveitamento da insolación así como afastar os froitos do chan para minimizar os problemas derivados das enfermidades fúnxicas (Martínez Chantada *et al.*, 1999).

As características climáticas de Galicia fan que o grao de maduración das uvas se converta a cotío nun punto clave. A entrada de fronte nubosas do océano Atlántico limita a insolación estival e, polo tanto, atrasa a maduración das uvas. As choivas de finais de verán e primeiros de outono favorecen a aparición de botrites e impiden adiar a colleita á espera de mellorar o maduro dos froitos. Deste modo, en función das características particulares de cada ano, acadar o punto de maduración adecuado pode ser unha misión complicada, cando non imposible. O GLRaV-3 ó producir atrasos no proceso de maduración do froito vai supoñer un grande problema nos cultivos vitivinícolas galegos (Cabaleiro *et al.*, 1999).

As cochinillas

As cochinillas algodonosas pertencen á familia Pseudococcidae, sendo polo tanto membros da orde Hemiptera, suborde Sternorrhyncha, superfamilia Coccoidea (Táboa 4). A orde Hemiptera engloba ós insectos zugadoros, na súa maioría de fluídos vexetais pero tamén algúns –certos membros da suborde Heteroptera– de fluídos animais. O seu modo de alimentación confírelles a todos eles unhas características semellantes no que atinxe o seu aparato bucal, a certas características do aparato dixestivo e á presenza de endosimbiontes que lles permiten alimentarse de fluídos que presentan deficiencias nutritivas. Sen embargo outros moitos caracteres como a morfoloxía, modos de vida, e tipo de reprodución son ben diferentes. A suborde Sternorrhyncha abrangue áfidos, cochinillas, psílicos e moscas brancas. Representan grande parte das pragas de cultivo e conforman boa parte dos insectos transmisores de

virus vexetais, o que lles confire unha gran transcendencia. Dentro da superfamilia Coccoidea (Táboa 4) que xunta tódalas cochinillas diferéncianse dez familias e entre elas a familia Pseudococcidae é a que engloba ás cochinillas algodonosas, cun total de 2224 especies (Ben Dov, 2007). Estas cochinillas caracterízanse por non presentar unha cuberta cérea ríxida, senón que o seu corpo brando queda exposto cuberto tan só por unha lixeira capa pulverulenta de ceras brancas. Estas ceras acumúlanse tamén sobre as setas marxinais e caudais o que as fai moi evidentes.

O xénero *Planococcus*, un dos 286 xéneros da familia Pseudococcidae, agrupa 43 especies (Ben Dov, 2007) distribuídas en 5 grupos: o grupo citri da bacía mediterránea e da África tropical, o grupo dendrobii da África tropical e Indonesia, o grupo dorsospinosus do Oriente

e a rexión austrooriental, o grupo volvae restrinxido ás cupresáceas, e o grupo mali presente no Oriente e zona austrooriental. Algunhas delas son consideradas como pragas de cultivos como é o caso de *Planococcus ficus*, na vide, as figueiras e os granados, *P. citri* en cítricos, cacao e un amplo rango de cultivos de invernadoiro, *P. kenyae* en cafeto e *P. lilacinus* e *P. minor* en cacao. Outras malia aparecer en plantas de cultivo non soen presentar poboacións suficientemente grandes como para ser consideradas pragas. Algunhas delas son específicas dun determinado xénero ou familia de hospedador, como as especies do grupo volvae que aparecen só en cupresáceas. Outras, pola contra, son claramente polífagas e aparecen sobre multitude de hospedadores coma *P. citri* ou *P. ficus*. Estas dúas especies aparecen, hoxe en día, espalladas por multitude de países, dispersadas de

FAMILIA	XÉNEROS	ESPECIES
Aclerdidae	5	57
Asterolecaniidae	22	232
Beesoniidae	6	15
Caroyenimidae	4	4
Cerococcidae	3	72
Coccidae	166	1151
Conchaspidae	4	29
Dactylopiidae	1	10
Diaspididae	395	2411
Eriococcidae	69	545
Hamilococcidae	5	21
Kermesidae	10	91
Kerriidae	9	98
Lecanodiaspididae	12	82
Margarodidae	77	445
Micrococcidae	2	8
Ortheziidae	20	196
Phenacoleachiidae	1	2
Phoenicococcidae	1	1
Pseudococcidae	286	2221
Stictococcidae	3	15
Totais	1101	7706

Táboa 4: Superorde Coccoidea. Amósase a composición en familias da superorde Coccoidea así como o número de xéneros e especies de cada unha delas (Datos obtidos a partir de Ben-Dov, 2007)

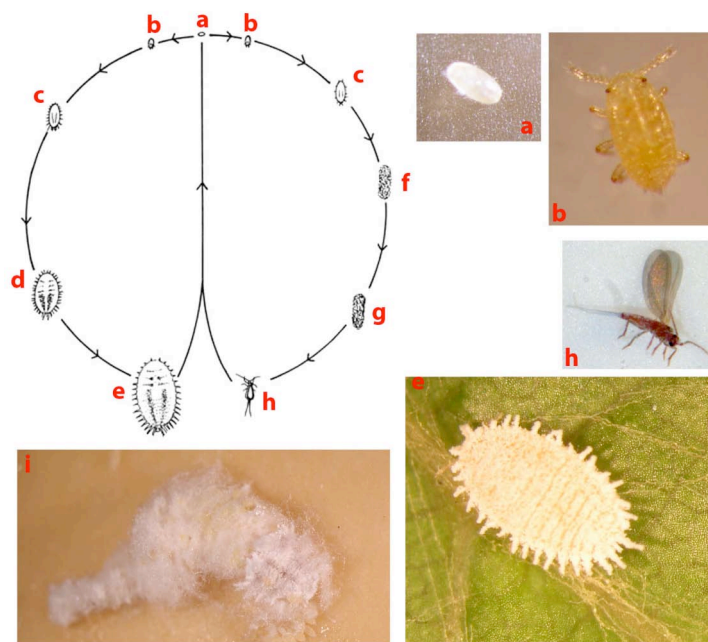


Figura 7: Ciclo vital de *Planococcus citri*: ovo (a), ninfa de primeiro estadio (b), ninfa de segundo estadio (c), ninfa de terceiro estadio femia (d), femia adulta (e), prepupa no capullo (f), pupa no capullo (g), macho adulto (h), femia con posta (i). (Esquema adaptado a partir de Cox, 1987)

xeito fortuíto polo home, sendo *P. citri* unhas das especies do xénero máis abundantes, e que se presentan como praga dun maior número de cultivos (Cox, 1989).

Planococcus citri (Risso) presenta reprodución sexual obrigada. Os dous primeiros estadios son comúns para machos e femias (Fig. 7), se ben a partir dese momento difiren no seu desenvolvemento. As femias mudan dúas veces máis ate chegar o estadio adulto sen presentar case modificacións morfolóxicas, non sendo o aumento de tamaño. Os machos pola contra forman unha pupa da que despois de dúas mudas e unha metamorfose completa sairá o imago.

A femia adulta (Fig. 8) presenta un corpo oval aplanado e sen ás, que acada un tamaño de entre 1.6 e 3.2 mm de longo e entre 1 e 2 mm de ancho (Cox, 1989). Non se aprecian as claras diferencias entre cabeza, tórax e abdome típicas da meirande parte dos insectos, incluídos os machos adultos, pero si un certo grao de segmentación o que permite asignar áreas á cabeza, protórax, mesotórax, metatórax e abdome. Presenta no seu borde 18 pares de cerarios que xunto coas setas que os acompañan lle confiren o característico aspecto con protuberan-

cias laterais. Presenta un par de antenas de sete artellos e tres pares de patas que permanecen funcionais durante toda a súa vida. O dorso aparece engurrado e cuberto dunha grosa capa de ceras de aspecto pulverulento que lles axuda a evitar a desecación. Entre a cabeza e o protórax e no sexto segmento abdominal presenta cadanseu par de ostiolos dorsais polos que excreta, de se sentir acosada, pequenas pingas dunha solución rica en graxas moi semellante á hemolinfa. Crese que estes ostiolos teñen unha múltiple función de defensa, alarma mediante feromonas e mantemento do mutualismo con formigas. Debido ó comportamentos sedentario das cochinillas presentan tamén adaptacións que afectan á excreción. Estas son mecanismos de expulsión das melazas, que evitan o crecemento de fungos nas colonias, chegando a propeler as pequenas gotas de melaza ate a 2 cm de distancia (Gullan & Kosztarab, 1997).

A particular estrutura do esperma das cochinillas, paquetes de entre 16 e 64 espermatozoides envoltos nunha vaiña, permiten que conserven a súa viabilidade e que a fecundación poida ser moito tempo despois da cópula. É cando os óvulos están maduros cando son fecundados e comeza o seu desenvolvemento, que vai parello co aumento de tamaño das cochinillas adultas. Unha vez maduros os ovos, a femia elabora un ovisaco con ceras filamentosas a medida que os vai depositando. Este protexe os ovos de inimigos naturais e de condicións ambientais adversas, como pode ser a desecación (Gullan & Kosztarab, 1997).

Os machos adultos en pouco ou nada se parecen ás femias. O segundo estado ninfal diríxese cara puntos relativamente afastados do resto da colonia, e en moitos casos máis elevados, e aí forma o capullo. O terceiro estadio ninfal, máis alongado, e o cuarto, con primordios alares, permanecen dentro do capullo ate que trala metamorfose emerxe o adulto alado. O seu corpo é sutil, alongado e negro, cun único par de ás de venación sinxela e sen ceras sobre a cutícula; estas só aparecen recubriendo os dous cercos caudais. O seu aparato bucal non é funcional e presentan na parte ventral da cara un par de ocelos a maiores dos ollos da súa parte dorsal (Gullan & Kosztarab, 1997).

A cochinilla dos cítricos presenta ó longo do ano un número moi variable de xeracións en función das condicións climáticas e dos hospedadores. Dende dúas ou tres xeracións anuais detectadas en California ate as 8 xeracións anuais en Palestina (citados por Matínez-

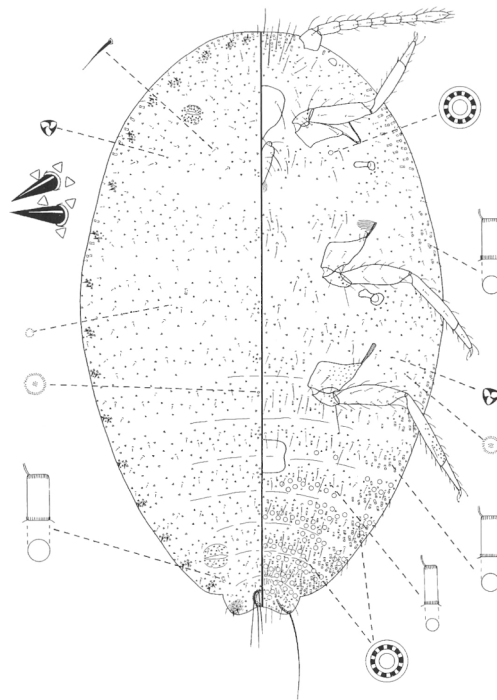


Figura 8: Esquema morfolóxico de *Planococcus citri*: na metade da esquerda amósase a parte dorsal do corpo e na metade dereita a parte ventral coas características de relevancia taxonómica destacadas. (Cox, 1989)

Ferrer *et al*, 2003). O seu desenvolvemento está en función da temperatura estando descritos distintos umbrais de temperatura para o seu desenvolvemento. Bodenheimer (1951) establece o umbral a 8,4°C, Avidov e Harpaz (1969) a 8,2°C, Arai (1996) a 7,7°C, Martínez-Ferrer *et al*. (2003) a 8,3°C e Laflin & Parrella (2004) a 10,9°C.

Interaccións

Entre estes tres elementos están xa descritas un certo número de interaccións. Poida que das que máis se saiba sexa das que engloban ó virus e á planta. Malia isto quedan aínda moitos ocos para coñecer completamente como é a relación entre ambos: taxa de replicación, velocidade de movemento ou o que fai que nos portaenxertos a infección se presente coma asintomática. As interaccións entre a vide e a cochinilla algodonosa dos cítricos permanecen tamén bastante inexploradas, en grande medida derivado do feito de non ser considerada esta unha praga nos cultivos de vide. Non é a cochinilla máis habitual nos viñedos e ademais soe

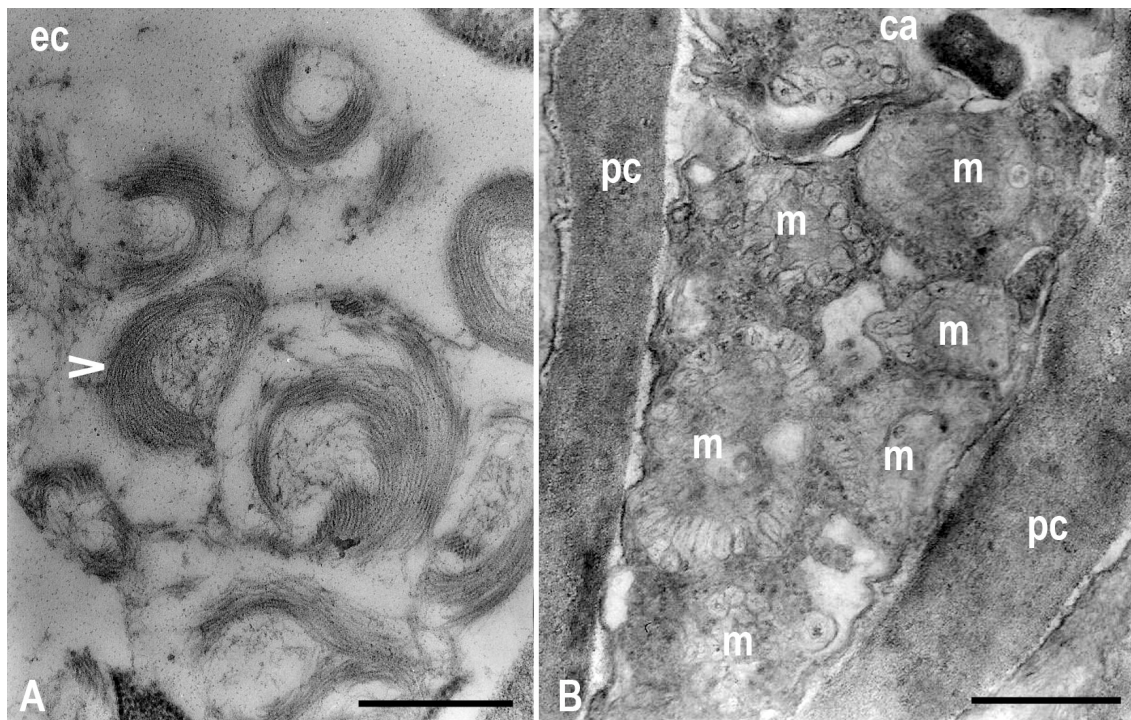


Figura 9: Citopatoloxía do GLRaV-3: **A** Acúmulos de partículas virais (>) nun elemento criboso (ec). **B** Vesiculacións nas mitocondrias (m) das células acompañantes (ca), as vesículas poden verse formando círculos ó se dispoñer entre a membrana externa e interna das mitocondrias. pc: parede celular. Barra = 0,5 μ m

aparecer en poboacións pequenas abondo como para que representen un perxuízo no rendemento do cultivo. As interaccións entre a cochinilla e o virus son tamén pouco coñecidas, debido ós problemas que se presentan á hora de traballar con este sistema viral: un virus restrinxido a floema sen hospedadores alternativos e cunha taxa de replicación relativamente baixa, co que os resultados de ensaios de transmisión poden demorarse ata 13 meses (Cabañero & Segura, 1997), e vectores que presentan unha eficiencia de transmisión baixa e que, debido ó seu comportamento, introducen unha grande incerteza na realización dos ensaios (Golino *et al.*, 2002).

Interaccións virus-planta

O GLRaV-3 infecta tódalas especies do xénero *Vitis*, incluíndo as especies americanas, pero non se coñecen hospedadores alternativos. O virus é restrinxido ó floema, aparecendo

Introdución

tanto nos elementos dos tubos cribosos coma nas células acompañantes (Fig. 9 A e B). A infección ten lugar por inoculación do virus no floema. Isto só sucede cando se realiza un enxerto con material infectado, ou cando un insecto zugador o inxecta no interior dun tubo criboso ou dunha célula acompañante.

A replicación viral ten lugar nas mitocondrias das células acompañantes do floema. Durante a replicación fórmanse entre as dúas membranas das mitocondrias, a externa e a interna, unha serie de vesículas de contido filamentoso (Fig. 9 B) (Faoro *et al.*, 1992). A mitocondria presenta cada vez máis vesiculacións ate que a estrutura colapsa e se liberan no citoplasma as vesículas (Faoro, 1997). É sinxelo chegar a ver masas de virus no interior das células acompañantes, que soen presentar un citoplasma moi compacto e electrodensidade (Fig. 9 B). De xeito esporádico pódense atopar nos elementos do floema algúns acúmulos virais, máis laxos que nas células acompañantes e cunha disposición a modo de niño (Fig. 9 A). Non está estudado o mecanismo polo que o virus sae dende as células acompañantes nin como se despraza ó longo do floema, aínda que parece que o seu movemento, así como a súa taxa de replicación é baixa.

As alteracións histolóxicas producidas polo virus son obliteracións necróticas de células do floema, e consecuentes proliferacións hiperplásicas para paliar os danos causados polas obliteracións (Faoro *et al.*, 1992). Está descrito así mesmo un aumento na acumulación de amidón nas follas (Hoefert & Gifford, 1967). Esta acumulación podería ser debida á diminución da capacidade do floema para translocar a sacarosa debido ás necroses (Hoefert & Gifford, 1967), así como á diminución da actividade de carga do floema das células acompañantes afectadas pola replicación do virus, principalmente pola inutilización das mitocondrias.

Os síntomas son moi variables en intensidade segundo o cultivar de vide e inexistentes noutras especies distintas a *Vitis vinifera*. Estes afectan á coloración e á forma e consistencia da lámina foliar. Nos cultivares tintos as zonas intervenais tórnanse púrpura (Fig. 10 A e B) mentres que nos cultivares brancos se tornan marelo pálido (Fig. 10 C e D) permanecendo en ambos casos os nervios de cor verde. A lámina foliar en tódolos casos sofre un recurvamento cara o envés podendo chegar a formar verdadeiros canutos (Martelli & Boudon-Padieu,

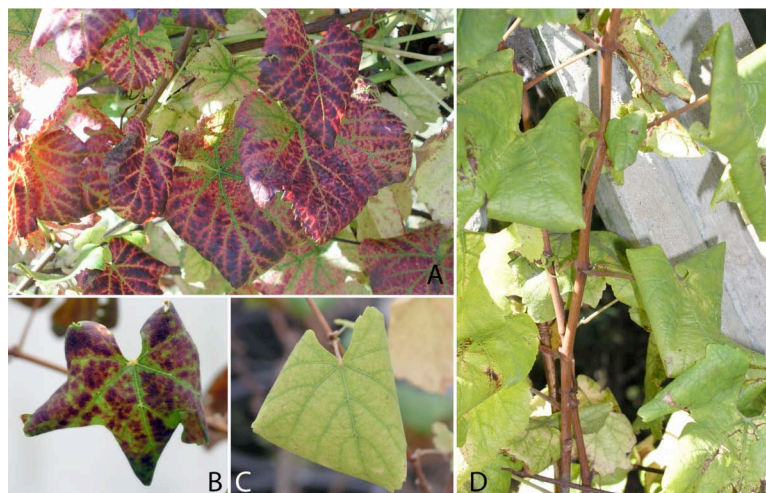


Figura 10: Sintomatoloxía do GLRaV-3. **A** Sintomatoloxía dunha planta de cv. Tinta femia cultivada en campo. **B** Folla de cv. Cabernet franc, cultivar indicador para este virus, cultivado en invernadoiro. **C** Folla de cv. Albariño cultivado en invernadoiro. **D** Sintomatoloxía dunha planta de cv. Albariño cultivada en campo.

2006). Ademais diso a consistencia da lámina vese alterada e se torna fráxil e crebadiza. Nalgúns casos prodúcense alteracións na coloración dos froitos que presentan unha maduración irregular aínda dentro do mesmo acio. Os síntomas son moi variables segundo o ano e soen facerse patentes a medida que avanza o verán ata chegar ó seu máximo a finais de tempada, aínda que nese momento poden ser confundidos coas alteracións presenescentes das follas.

O virus reduce o vigor das plantas, o seu desenvolvemento e a lonxevidade das plantas é menor cá de plantas sas. Afecta tamén á produción das plantas, pero sen embargo o máis serio é a baixada dos niveis de azucres acumulados nos froitos e o incremento de acidez dos mostos obtidos (Hoefert and Gifford, 1967).

A nivel fisiolóxico a infección do GLRaV-3 produce, en *Vitis vinifera*, baixadas nos niveis de pigmentos fotosintéticos e de proteínas de membrana dos tilacoides e diminúe a actividade fotosintética e as actividades da ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa osixenasa e da nitrato reductasa (Bertamini *et al.*, 2004). Os efectos que ten o virus sobre a produción afectan principalmente á produción e calidade de mosto. Segundo os cultivares onde foi analizado, as perdas poden chegar a ser dun 37% da produción. Os mostos sofren incrementos na acidez

Introdución

titulable que poden acadar un gramo de ácido tartárico por litro, e baixadas no contido de azucres dun grao Brix (Cabaleiro *et al.*, 1999). O efecto sobre a calidade dos mostos varía segundo o ano (Cabaleiro *et al.*, 1999), probablemente influenciado pola climatoloxía, aínda que non se estableceu ate o momento unha relación clara entre ambas.

Interaccións planta-vector

Habitualmente *Planococcus citri* non está considerada como unha praga que afecte a viñedos, sobre todo porque outras cochinillas algodonosas supoñen un problema moito máis serio para o cultivo de vide. Temos así a cochinilla da vide (*vine mealybug*), *Planococcus ficus* (Walton & Pringle, 2004; Walton *et al.*, 2004), a cochinilla da uva (*grape mealybug*), *Pseudococcus maritimus* (Geiger & Daane, 2001; Daane *et al.*, 2002; Koplów Wies, 2004), e en menor medida a cochinilla escura (*obscure mealybug*) *Pseudococcus viburni* e a cochinilla rabilonga (*longtailed mealybug*) *Pseudococcus longispinus* (Daane *et al.*, 2003; Malakar-Kuenen *et al.*, 2003; Bentley *et al.*, 2006; Varela *et al.*, 2006). Son escasos sen embargo os estudos sobre *Planococcus citri* como praga en viñedos (Ruiz Castro, 1965; Lucas Espadas, 2002), restrinxidos á Península Ibérica, se ben como praga de cítricos está ben estudada (Bodenheimer, 1951; Berlinger & Golberg, 1978; Martínez-Ferrer *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2004) en toda a bacía do



Figura 11: Colonia de *Planococcus citri* nun tronco vide controlada por unha formiga

Mediterráneo.

Ruiz Castro (1965) analiza o efecto de *Planococcus citri* en viñedos de Almería describindo as súas fases, os seus efectos e distribución nas plantas e nas parcelas e describindo a sucesión de xeracións durante o ano. Observa a aparición de 6 xeracións diferenciadas das que a 6ª sería a xeración hibernante que pode aguantar o inverno en calquera dos estadios de desenvolvemento agás o de ovo. A duración das xeracións, excepto a da hibernante que é moito máis longa, oscila en función das temperaturas entre os 36 e os 55 días. Apunta tamén á grande influencia que presenta a humidade relativa no desenvolvemento das xeracións e os picos explosivos de cochinillas, punto que será tamén salientado por Lucas Espadas (2002). Fai ademais un relatorio dos parásitos e predadores naturais que axudan ó control da poboación de cochinillas e unha descrición de tratamentos químicos que axudan ó seu control.

En casos como o de Almería, nos que as poboacións son elevadas, é frecuente ver, no mes de xullo, ás cochinillas nas partes verdes das parras, infestando follas e brotes tenros. Ás veces, cando a infestación é grave, prodúcense alteracións morfolóxicas facendo que os brotes sexan máis curtos e ramificados dando un aspecto lixeiramente arrefolado. Durante o mes de agosto prodúcese unha forte migración cara os froitos, sendo normal velas só nos acios e as follas que están en contacto cos troncos. Polo xeral sitúanse no interior dos acios sobre o cadrado e e sobre a inserción do pedicelo no froito. Á fin da tempada, e co comezo dos fríos, as cochinillas hibernantes refúxianse nos troncos e algúns outros puntos das plantas que lles confiren protección (Ruiz Castro, 1965). As fortes baixadas nas poboacións de cochinillas durante o lapso invernal, alomenos no caso da cochinilla escura en Chile, parece estar motivadas pola latencia invernal da vide xa que en hospedadores alternativos manteñen a actividade ó longo de todo o ano. Tamén se supón que as chuvias invernaes poderían ter efectos sobre a poboación no caso de se superar os 150 mm anuais (Prado *et al.*, 2000 citado por Koplów Wies, 2004)

Dous son os danos que producen as cochinillas: o perxuízo común a tódolos insectos zugadoros de floema de debilitamento das plantas, aínda que sen rastros de fitotoxicidade, e o efecto do crecemento de fumaxinas na melaza que excretan. En casos nos que a infestación é

moi severa os danos poden ser moi fortes, podendo chegar a se perder a colleita dese ano e a quedar a colleita do ano seguinte seriamente comprometida, por mor do debilitamento xeral da planta. Cando as melazas son moitas e recobren grande parte da planta, a opacidade das capas de fumaxinas, coa súa cor escura, diminúen a capacidade fotosintética da planta co que o debilitamento é aínda máis elevado. Cando a uva se comercializa coma uva de mesa o efecto que poden ter as cochinillas sobre a colleita é moito maior, xa que a presenza dunhas poucas cochinillas no acio imposibilita a súa comercialización (Ruiz Castro, 1965).

O control integrado da cochinilla dos cítricos que afectan a viñedos inclúe tanto emprego de organismos predadores (coleópteros, dípteros, neurópteros e crisópidos) e parasitoides (himenópteros) (Ruiz Castro, 1965), métodos culturais que procuren evitar a dispersión das cochinillas ó longo das parcelas, métodos compatibles co cultivo en ecolóxico como a fumigación con aceites, trampas con feromonas para a captura de machos, barreiras que impidan a dispersión dos estadios móbiles ó longo da planta e a utilización de insecticidas (Bentley *et al.*, 2006; Koplow Wies, 2004). É interesante citar o feito de que o control das po-boacións de formigas sexa un punto importante de cara ó control de cochinillas. As formigas protéxenas de parasitoides e predadores ademais de aproveitar as melazas producidas reducindo o nivel de fungos, sobre todo nos agochos (Bentley *et al.*, 2006). En posicións expostas o mecanismo de excreción propio das cochinillas, que propelen a melaza a unha certa distancia, minimiza ese problema.

Interaccións virus-vector

As cochinillas algodonosas están descritas como vectores de tres xéneros distintos de virus: Badnavirus (Lockhart & Olszewski, 1994), Vitivirus (Adams *et al.*, 2004) e Ampelovirus (Martelli *et al.*, 2002). Todos eles afectan a cultivos perennes ou anuais que se propagan vexetativamente. Debido ó comportamento alimentario das cochinillas é complicado que actúen como vectores en mecanismos de transmisión non persistente, xa que non teñen unha grande capacidade para se desprazar entre plantas facendo catas. Sen embargo si que teñen un comportamento compatible tanto coa transmisión semipersistente coma coa circulativa.

A proposta de Sylvester (1958), posteriormente adoptada, establece unha clasificación dos modos de transmisión mixta, a partir de caracteres temporais da transmisión e caracteres derivados do mecanismo. Isto fai que sexa complicado determinar o tipo de transmisión empregando só a análise de parámetros temporais. A diferenza entre a transmisión non persistente e a semipersistente atinxe ó tempo de retención da infectividade: nos non persistentes o tempo é moi curto e nos semipersistentes a retención da infectividade é algo máis longa. Sen embargo a diferenza entre semipersistente e persistente, que nominalmente parecen derivadas de parámetros temporais, fai referencia a se a retención da infectividade cesa, ou ben continúa, despois da muda. Así pois, dous virus con tempos de adquisición, inoculación e retención da infectividade moi semellantes poden ser semipersistentes ou persistentes.

Os ensaios de transmisión de virus con cochinillas algodonosas son lentos e tediosos. O comportamento alimentario das cochinillas, con moita menor avidez que os pulgóns, xunto coa imposibilidade de observar a posición do labium, fai que xurda un alto grao de incerteza sobre se as cochinillas están ou non comendo durante os períodos de adquisición e inoculación (Posnette & Strickland, 1948). Os primeiros ensaios sobre a transmisión de virus por cochinillas foron realizados con plantas de cacao e o *Cocoa swollen shoot virus* (CSSV), un badnavirus. As diverxencias de resultados obtidos entre uns e outros experimentos dificultaron a caracterización da transmisión. Se ben algúns datos levaban a pensar que a transmisión era de tipo semipersistente (Posnette & Robertson, 1950) outros facían máis probable a opción de que fose unha transmisión de tipo circulativa (Roivainen, 1980). En calquera caso, a disparidade de resultados, xunto coa incerteza sobre a exactitude e o óptimo da metodoloxía empregada en cada caso, e o baixo número de réplicas fai dubidar dos resultados de moitos experimentos (Roivainen, 1980). Hoxe en día está asumida que a transmisión dos badnavirus é semipersistente (Lockhart & Olszewski, 1994). Sen embargo, certos experimentos como os que probaban a transmisión transestadial –capacidade de transmitir virus despois da muda– seguen mantendo un certo grao de incerteza sobre o mecanismo (Roivainen, 1980).

Introdución

FAMILIA	ESPECIE	VIRUS	CITA
COCCIDAE	<i>Neopulvinaria innumerabilis</i> (Rathvon)	GLRaV-1	Fortusini <i>et al.</i> , 1997 (xunto co GVA)
		GVA	Fortusini <i>et al.</i> , 1997 (xunto co GLRaV-1)
	<i>Parthenolecanium corni</i> (Bouché)	GLRaV-1	Sforza <i>et al.</i> , 2003; Hommay <i>et al.</i> , 2007 (xunto co GVA)
GVA		Hommay <i>et al.</i> , 2007 (xunto co GLRaV-1)	
	<i>Pulvinaria vitis</i> (Linnaeus)	GLRaV-3	Belli <i>et al.</i> , 1994
PSEUDOCOCCIDAE	<i>Heliococcus bohemicus</i> Sulc	GLRaV-1	Sforza <i>et al.</i> , 2003
		GLRaV-3	Sforza <i>et al.</i> , 2003; Zorloni <i>et al.</i> , 2003; Zorloni <i>et al.</i> , 2004
		GVA	Zorloni <i>et al.</i> , 2004
	<i>Phenacoccus aceris</i> (Signoret)	GLRaV-1	Sforza <i>et al.</i> , 2003
		GLRaV-3	Sforza <i>et al.</i> , 2003
	<i>Planococcus citri</i> (Risso)	GLRaV-3	Cabaleiro & Segura, 1997; Golino <i>et al.</i> , 2000; Golino <i>et al.</i> , 2002
		GVA	Rosciglione & Castellano, 1985
	<i>Planococcus ficus</i> (Signoret)	GLRaV-3	Rosciglione & Gugerli, 1989; Engelbrecht & Kasdorf, 1990; Goszczynski & Jooste, 2003; Zorloni <i>et al.</i> , 2004
		GVA	Rosciglione & Castellano, 1985; Engelbrecht & Kasdorf, 1990 (xunto co GLRaV-3); Goszczynski & Jooste, 2003
		GVB	Tanne <i>et al.</i> , 1989b, 1993; Boscia <i>et al.</i> , 1993
	<i>Pseudococcus calceolariae</i> (Maskell)	GLRaV-3	Petersen & Charles, 1997
	<i>Pseudococcus comstocki</i> (Kuwana)	GLRaV-3	Nakano <i>et al.</i> , 2003
		GVA	Nakano <i>et al.</i> , 2003
	<i>Pseudococcus longispinus</i> (Targioni Tozzetti)	GLRaV-3	Rosciglione & Gugerli, 1989; Tanne <i>et al.</i> , 1989a; Petersen & Charles, 1997; Golino <i>et al.</i> , 2000; Golino <i>et al.</i> , 2002; Kuniyuki <i>et al.</i> , 2005
		GLRaV-5	Golino <i>et al.</i> , 2002; Sim <i>et al.</i> , 2003
		GLRaV-9	Sim <i>et al.</i> , 2003
GVA		Rosciglione <i>et al.</i> , 1983; Rosciglione & Castellano, 1985; LaNotte <i>et al.</i> , 1997	
GVB		Tanne <i>et al.</i> , 1993 Kuniyuki <i>et al.</i> , 2006	
<i>Pseudococcus maritimus</i> (Ehrhorn)	GLRaV-3	Golino <i>et al.</i> , 2002	
<i>Pseudococcus viburni</i> (Signoret) (= <i>Pseudococcus affinis</i>)	GLRaV-3	Golino <i>et al.</i> , 1995; Golino <i>et al.</i> , 2000	
	GVA	Garau <i>et al.</i> , 1995	
	GVB	Garau <i>et al.</i> , 1995; Golino <i>et al.</i> , 1995	

Táboa 5 : Cochinillas transmisoras de virus de vide. Na táboa recollense tódalas especies descritas ate o momento como transmisoras de virus de vide, sinalando os virus que transmiten, así como as citas bibliográficas nas que se demostra a transmisión

No caso dos vitivirus a caracterización levada a cabo por La Notte e os seus colaboradores (1997), asumiu que a transmisión é tamén semipersistente. O feito de que se poida transmitir a plantas de *Nicotiana clevelandii*, onde a infección é sistémica e pode ter lugar por inoculación en células epidérmicas ou do mesófilo, e a aparición máis temperá dos síntomas facilita as probas. Posteriormente, parece que as partículas virais de GVA, *Grapevine virus A* –virus tipo dos vitivirus– foron detectadas asociadas ó extremo distal do estilete das cochinillas aínda que de momento este extremo non foi publicado (Martelli *et al.*, 2001).

No caso dos ampelovirus a transmisión tamén está definida como semipersistente en virtude dos parámetros temporais: tempo limitado de persistencia no vector (uns poucos días) e non detección nin de período de latencia nin de transmisión transestadial. Sen embargo, as características dos ensaios de transmisión con cochinillas que establecen períodos de adquisición de varios días e/ou grandes períodos de inoculación, fai que sexa moi complicado poder detectar os períodos de latencia.

Os datos obtidos ate o momento co GLRaV-3 e *Planococcus citri* (Cabaleiro & Segura, 1997) e outras cochinillas (*P. ficus* e *Ps. longispinus*) (Krüger *et al.*, 2006) supoñen que a transmisión do virus e de carácter semipersistente. Nestes ensaios os individuos, despois dun período de adquisición de virus en planta infectada, son postos en planta sa para a inoculación. O tempo máximo de retención da infectividade para *P. ficus* é de alomenos 48 h alimentándose en planta non hospedadora e se pode detectar a presenza do virus ate 8 días comendo en planta non hospedadora. No caso de *Ps. longispinus* o tempo de detectabilidade do virus é de 72 h tanto en xerón coma alimentándose en non hospedador (Krüger *et al.*, 2006). Os ensaios con *P. citri* amosaron a detección do virus ate despois de 96 h de alimentación en non hospedador (Cid *et al.*, 2006).

Bibliografía

Adams, M. & Antoniw, J. (2007) Descriptions of plant viruses. How are viruses transmitted? Retrieved 3 September 2007 from <http://www.dpvweb.net/intro/index.php#transmit>

Introducción

- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Martelli, G. P., Milne, R. G. & Fauquet, C. M. (2004) The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*, 149 (5), 1045-1060.
- Agranovsky, A. A., Lesemann, D. E., Maiss, E., Hull, R. & Atabekov, J. G. (1995) Rattlesnake Structure of a Filamentous Plant Rna Virus Built of 2 Capsid Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (7), 2470-2473.
- Arai, T. (1996) Temperature-dependent developmental rate of three mealybug species, *Pseudococcus citriculus* Green, *Planococcus citri* (Risso), and *Planococcus kraunhiae* (Kuwana) (Homoptera: Pseudococcidae) on citrus. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 40 (1), 25-34.
- Avidov, Z. & Harpaz, I. (1969) Plant pests of Israel. (Jerusalem: Israel University press)
- Belli, G., Fortusini, A., Casati, P., Belli, L., Bianco, P. A. & Prati, S. (1994) Transmission of a grapevine leafroll associated closterovirus by the scale insect *Pulvinaria vitis* L. *Rivista di Patologia Vegetale*, 4, 105-108.
- Ben-Dov, Y. (2007) ScaleNet. Pseudococcidae. Retrieved 17 August 2007 from <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>
- Bentley, W. J., Varela, L. G., Zalom, F. G., Smith, R. J., Purcell, A. H., Phillips, P. A., Haviland, D. R., Daane, K. M. & Battany, M. C. (2006) Insects and Mites *UC IPM Pest Management Guidelines: Grape*. Oakland, California: University of California, Davis)
- Berlinger, M. J. & Gol'berg, A. M. (1978) The effect of the fruit sepals on the citrus mealybug population and on its parasite. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24 (3), 238-243.
- Bertamini, M., Muthuchelian, K. & Nedunchezian, N. (2004) Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. Cv. Lagrein). *Journal of Phytopathology*, 152 (3), 145-152.
- Bodenheimer, F. S. (1951) Citrus entomology in the Middle East. (The Hague: W. Junk)
- Boscia, D., Savino, V., Minafra, A., Namba, S., Elicio, V., Castellano, M. A., Gonsalves, D. & Martelli, G. P. (1993) Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. *Archives of Virology*, 130, 109-120.
- Cabaleiro, C. & Segura, A. (1997) Some characteristics of the transmission of *grapevine leafroll associated virus 3* by *Planococcus citri* Risso. *European Journal of Plant Pathology*, 103 (4), 373-378.
- Cabaleiro, C., Segura, A. & Garcia-Berrios, J. J. (1999) Effects of *Grapevine leafroll-associated virus 3* on the physiology and must of *Vitis vinifera* L. cv. Albarino following contamination in the field. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50 (1), 40-44.
- Cid, M., Pereira, S., Gago, P., Couceiro, C., Cabaleiro, C. & Segura, A. (2006) *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae) as GLRaV-3 vector. Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3 - 7 April 2006. South African Society for Enology and Viticulture, 252-253.
- Cox, J. M. (1987) Pseudococcidae (Insecta: Hemiptera). (Wellington: DSIR Science Information Publishing Centre)
- Cox, J. M. (1989) The mealybug genus *Planococcus* (Homoptera : Coccoidea) *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology* 58, 1-78.
- Credi, R. & Giunchedi, L. (1996) *Grapevine leafroll-associated viruses* and *grapevine virus A* in selected *Vitis vinifera* cultivars in northern Italy. *Plant Pathology*, 45 (6), 1110-1116.
- Daane, K. M., Malakar-Kuenen, R., Guillén, M., Bentley, W. J., Bianchi, M. & Gonzalez, D. (2003) Abiotic and biotic refuges hamper biological control of mealybug pests in California vineyards. In: R. vanDriesch (ed), *Proceedings, 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods*. USDA Forest Service Publication, 389-398.
- Daane, K. M., Malakar-Kuenen, R., Rust, M., Yokota, G. Y., Hogg, B., Bianchi, M., Klotz, J., Bentley, W. & Geiger, C. A. (2002) Investigation of grape mealybug population dynamics to forecast and prevent outbreaks and improve control. Retrieved from <http://www.avf.org/externals/03/301b33f0c6cd365693afc7b6e38da2d2117c6c.pdf>
- Engelbrecht, D. J. & Kasdorf, G. G. F. (1990) Transmission if grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the mealybug, *Planococcus ficus*. *Phytophylactica*, 22, 341-346.

- Faoro, F. (1997) Cytopathology of closteroviruses and trichoviruses infecting grapevines. (In P.L. Monette (ed) *Filamentous viruses of woody plants* (pp. 29-47). Trivandrum. India: Research Signpost)
- Faoro, F., Tornaghi, R., Cinquanta, S. & Belli, G. (1992) Cytopathology of grapevine leafroll associated virus III (GLRaV-III). *Rivista di Patologia Vegetale*, 2, 67-83.
- Fortusini, A., G. Scattini, S. Prati, S. Cinquanta, and G. Belli (1997) Transmission of *grapevine leafroll virus 1* (GLRV-1) and *grapevine virus A* (GVA) by scale insects. In: O.A.d. Sequeira, J.C. Sequeira & M.T. Santos (eds), Extended abstracts 12th Meeting ICVG. Dept.Plant Pathology, Estação Agronomica Nacional, Oeiras, Portugal, 121-122.
- Franco, J. C., Suma, P., da Silva, E. B., Blumberg, D. & Mendel, Z. (2004) Management strategies of mealybug pests of citrus in Mediterranean countries. *Phytoparasitica*, 32 (5), 507-522.
- Garau, R., Prota, V. A., Boscia, D., Fiori, M. & Prota, U. (1995) *Pseudococcus affinis* Mask., new vector of *grapevine trichoviruses A* and *B*. *Vitis*, 34, 67-68.
- Geiger, C. A. & Daane, K. M. (2001) Seasonal movement and distribution of the grape mealybug (Homoptera : Pseudococcidae): Developing a sampling program for San Joaquin Valley vineyards. *Journal of Economic Entomology*, 94 (1), 291-301.
- Golino, D. A., Sim, S. T. & Rowhani, A. (1995) Transmission studies of *grapevine leafroll associated virus* and *grapevine corky bark associated virus* by the obscure mealybug. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 408.
- Golino, D. A., Sim, S. T. & Rowhani, A. (2000) Experimental transmission of grapevine leafroll associated viruses by mealybugs. In: R.H. Symons (ed), Extended abstracts 13th Meeting ICVG. University of Adelaide, Adelaide, Australia, 19-20.
- Golino, D. A., Sim, S. T., Gill, R. & Rowhani, A. (2002) California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. *California Agriculture*, 56, 196-201.
- Goszczynski, D. E. & Jooste, A. E. C. (2003) Shiraz disease (SD) is transmitted by mealybug *Planococcus ficus* and associated with *grapevine virus A*. Extended abstracts 14th Meeting ICVG. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bari (Italy), 219.
- Gullan, P. J. & Kosztarab, M. (1997) Adaptations in scale insects. *Annual Review of Entomology*, 42, 23-50.
- Hoefert, L. L. & Gifford, E. M. (1967) Grapevine Leafroll Virus - History and Anatomic Effects. *Hilgardia*, 38 (11), 403-426.
- Hommay, G., Maguet, J. L., Komar, V., Lemaire, O. & Herrbach, E. (2007) Une nouvelle espèce de cochenille vectrice du *Grapevine virus A* (*Vitivirus*) chez la vigne: la lécanine *Parthenolecanium corni*. 11ièmes Rencontres de Virologie Végétale Aussois 28/01-01/02 2007.
- Koplow Wies, C. E. (2004) Monitoreo y control físico de chanchitos blancos (*Pseudococcus viburni* (Signoret)) en vid. Antecedentes para el manejo integrado *Facultad de Agronomía e ingeniería Forestal*. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile, pp. 58.
- Krüger, K., Saccaggi, D. & Douglas, N. (2006) *Grapevine leafroll-associated virus 3*-vector interactions: Transmission by the mealybugs *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudococcidae). Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3 - 7 April 2006. South African Society for Enology and Viticulture, 130-131.
- Kuniyuki, H., Rezende, J. A. M., Willink, C. G., Novo, J. P. S. & Yuki, V. A. (2005) Transmissão do *Grapevine leafroll-associated virus 3* pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti (Hemiptera: Pseudococcidae) *Summa phytopathologica*, 31 (1), 65-68.
- Kuniyuki, H., Gioria, R., Rezende, J. A. M., Willink, C. G., Novo, J. P. S. & Yuki, V. A. (2006) Transmissão experimental do *Grapevine virus B* pela cochonilha *Pseudococcus longispinus* Targioni-Tozzetti (Hemiptera: Pseudococcidae). *Summa phytopathologica*, 32 (2), 151-155.
- La Notte, P., Buzkan, N., Choueiri, E., Minafra, A. & Martelli, G. P. (1997) Acquisition and transmission of *grapevine virus A* by the mealybug *Pseudococcus longispinus*. *Journal of Plant Pathology*, 79, 79-85.
- Lafin, H. M. & Parrella, M. P. (2004) Developmental biology of citrus mealybug under conditions typical of California rose production. *Annals of the Entomological Society of America*, 97 (5), 982-988.

Introducción

- Ling, K. S., Zhu, H. Y., Alvizo, H., Hu, J. S., Drong, R. F., Slightom, J. L. & Gonsalves, D. (1997) The coat protein gene of *grapevine leafroll associated closterovirus-3*: Cloning, nucleotide sequencing and expression in transgenic plants. *Archives of Virology*, 142 (6), 1101-1116.
- Ling, K. S., Zhu, H. Y., Drong, R. F., Slightom, J. L., McFerson, J. R. & Gonsalves, D. (1998) Nucleotide sequence of the 3'-terminal two-thirds of the *grapevine leafroll-associated virus-3* genome reveals a typical monopartite closterovirus. *Journal of General Virology*, 79, 1299-1307.
- Ling, K. S., Zhu, H. Y. & Gonsalves, D. (2004) Complete nucleotide sequence and genome organization of *Grapevine leafroll-associated virus 3*, type member of the genus Ampelovirus. *Journal of General Virology*, 85, 2099-2102.
- Lockhart, B. E. & Olszewski, N. E. (1994) Badnavirus group (In R.G. Webster & A. Granoff (eds) *Encyclopedia of Virology* (pp. 1296-1299). New York: Academic Press)
- Lucas Espadas, A. (2002) Comportamiento de melazo (*Pseudococcus citri* Risso) en uva de mesa en la Región de Murcia. Alternativas de control biológico. *Phytoma-España*, 138, 28-36.
- Malakar-Kuenen, R., Daane, K. M., Godfrey, K. E., Ball, J. C., Bentley, W. J., Yokota, G. Y., Marvin, L. & Gonzalez, D. (2003) Population dynamics of vine mealybug and its natural enemies in the Coachella and San Joaquin valleys. Retrieved from <http://avf.org/externals/d7/f6a310619a6e7e30fa7888ad9085ce73045974.pdf>
- Martelli, G. P. & Boudon-Padieu, E. (2006) Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine: Bibliographic report 1998-2004. (Bari: CIHEAM)
- Martelli, G. P., Conti, M. & Minafra, A. (2001) Grapevine virus A. Retrieved from <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=383>
- Martelli, G. P., Agranovsky, A. A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R. H. A., Dolja, V. V., Falk, B. W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A. V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H. J., Wisler, G. C. & Yoshikawa, N. (2002) The family Closteroviridae revised. *Archives of Virology*, 147 (10), 2039-2044.
- Martínez Chantada, H., Núñez Pérez, M., Maceira Vidal, X. A., Leiro Lois, A. & Daporta Padín, X. R. (1999) A vide e o viño. (Vigo: A Nosa Terra).
- Martínez-Ferrer, M. T., García-Marí, F. & Ripolles, J. L. (2003) Population dynamics of *Planococcus citri* Risso (Homoptera: Pseudococcidae) in citrus groves in Spain. *IOBC wprs Bulletin*, 26 (6), 149-161.
- McLean, D. L. & Kinsey, M. G. (1964) Technique for electronically recording aphid feeding and salivation. *Nature*, 202 (493), 1358-1359.
- Mullins, M. G., Bouquet, A. & Williams, L. E. (1992) Biology of the grapevine. (New York: Cambridge University Press).
- Nakano, M., Nakaune, R. & Komazi, S. (2003) Mealybug transmission of grapevine viruses in Japan. Extended abstracts 14th Meeting ICSVG. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bari (Italy), 218.
- Petersen, C. L. & Charles, J. G. (1997) Transmission of grapevine leafroll-associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. *Plant Pathology*, 46, 509-515.
- Posnette, A. F. & Strickland, A. H. (1948) Virus diseases of cacao in West Africa .3. Technique of Insect Transmission. *Annals of Applied Biology*, 35 (1), 53-63.
- Posnette, A. F. & Robertson, N. F. (1950) Virus diseases of cacao in West Africa .6. Vector Investigations. *Annals of Applied Biology*, 37 (3), 363-377.
- Prado, E., Ripa, R. & Rodríguez, F. (2000) Insectos y ácaros. (In J. Valenzuela (ed) *Uva de Mesa en Chile* (pp. 234-250). Santiago, Chile: INIA).
- Roivainen, O. (1980) Mealybugs. (In K.F. Harris & K. Maramorosch (eds) *Vectors of plant pathogens* (pp. 15-38). New York: Academic Press).
- Rosciglione, B. & Castellano M. A. (1985) Further evidence that mealybugs can transmit *grapevine virus A* (GVA) to herbaceous host. *Phytopathologia Mediterranea, (Proceedings 8th Meeting ICSVG, Bari, Italy, 1984)* 24, 186-188.

- Rosciglione, B. & Gugerli, P. (1989) Transmission of grapevine leafroll disease and an associated closterovirus to healthy grapevine by the mealybug *Planococcus ficus*. *Phytoparasitica, (Proceedings 9th Meeting ICVG, Kiryat Anavim, Israel, 1987)* 17, 63.
- Rosciglione, B., Castellano, M. A., Martelli, G. P., Savino, V. & Cannizzaro, G. (1983) Mealybug transmission of *grapevine virus A*. *Vitis*, 22, 331-347.
- Ruiz Castro, A. (1965) *Plagas y enfermedades de la vid.* (Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas)
- Sforza, R., Boudon-Padieu, E. & Greif, C. (2003) New mealybug species vectoring *Grapevine leafroll-associated viruses-1* and *-3* (GLRaV-1 and *-3*). *European Journal of Plant Pathology*, 109, 975-981.
- Sim, S. T., Rowhani, A. & Golino, D. A. (2003) Experimental transmission of *grapevine leafroll-associated virus 5* and *9* by longtailed mealybugs. In: U. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, Bari (Italy) (ed), Extended abstracts 14th Meeting ICVG. 211-212.
- Sylvester, E. S. (1958) Aphid transmission of plant viruses. In: E.C. Becker (ed), Vol. 3, Proceedings of the 10th International Congress of Entomology. 195-200.
- Tanne, E., Ben-Dov, Y. & Raccach, B. (1989a) Transmission of closterovirus-like particles by mealybugs (*Pseudococcidae*) in Israel. *Phytoparasitica*, 17, 63-64.
- Tanne, E., Ben-Dov, Y. & Raccach, B. (1989b) Transmission of the corky-bark disease by the mealybug *Planococcus ficus*. *Phytoparasitica*, 17, 55.
- Tanne, E., Ben-Dov, Y. & Raccach, B. (1993) Mealybug transmission of corky bark disease and an associated virus to healthy grapevine. In: P. Gugerli (ed), Extended Abstracts 11th Meeting ICVG. Federal Agricultural Research Station of Changins, CH-1260 Nyon, Switzerland., 59-60.
- Tjallingii, W. F. (1978) Electronic recording of penetration behavior by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24 (3), 721-730.
- Varela, L., Smith, R., Battany, M. & Bentley, W. (2006) Grape, Obscure or Vine - Which mealybug is it; why should you care? *Practical Winery and Vineyard*, XXVII (6), 37-46.
- Walton, V. M. & Pringle, K. L. (2004) A survey of mealybugs and associated natural enemies in vineyards in the Western Cape Province, South Africa. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 25 (1), 23-25.
- Walton, V. M., Daane, K. M. & Pringle, K. L. (2004) Monitoring *Planococcus ficus* in South African vineyards with sex pheromone-baited traps. *Crop Protection*, 23 (11), 1089-1096.
- Zorloni, A., Cinquanta, S., Prati, S. & Bianco, P. A. (2003) Transmission of an italian isolate of *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) by the mealybug *Heliococcus bohemicus* Sulc., Extended abstracts 14th Meeting ICVG. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bari (Italy).
- Zorloni, A., Prati, S., Bianco, P. A. & Belli, G. (2004) Further data on the experimental transmission of *Grapevine leafroll-associated virus 1* and *-3* and of *Grapevine virus A* by mealybugs. *Journal of Plant Pathology*, 86, 339-340.

Obxectivos e xustificación do traballo

O obxectivo que marcou este traballo foi a interese en botar algo de luz sobre parte das incógnitas que permanecen sobre a transmisión do GLRaV-3 polas cochinillas e como ten lugar en campo. Centrémonos nas interaccións menos estudadas, as interaccións planta-vector e as virus-vector. Para iso decidimos achegarnos ó problema dende diferentes perspectivas. Así, o traballo engloba unha parte de estudio en campo de poboacións de *Planococcus citri* nun viñado en plena produción do cultivar Tinta femia conducido en emparrado, outra parte un estudio do mecanismo de transmisión do virus polas cochinillas e unha terceira parte un estudio do comportamento alimentario das cochinillas sobre vide.

Para o estudio en campo realizouse o seguimento da poboación durante un período de tres anos, 2003-2006. Malia a que outros traballos empregaban para as mostraxes trampas con feromonas para a captura de machos nós optamos pola captura con cintas adhesivas situadas nas plantas. Este método nos permitía coñecer o movemento das ninfas e adultas polas plantas, que van ser as transmisoras do virus. O emprego das trampas de feromonas daría información sobre a aparición de machos pero iso non implicaría necesariamente que se correspondese cos movementos das femias. Pretendimos analizar as flutuacións da poboación ó longo dos anos e a influencia que a climatoloxía podía presentar nelas, o movemento das cochinillas na planta e para completar analizar a evolución de cochinillas virulíferas ó longo do ano en plantas xa infectadas.

Para o estudio do mecanismo de transmisión do virus tentouse a localización do virus das cochinillas portadoras. As técnicas baseadas na PCR, pola súa sensibilidade, poder considerar como infectivos insectos que, malia portar o virus, non son quen de o transmitir. Isto fixo plantexármonos que a localización do virus nas cochinillas podía axudar a identificar cales son as cochinillas virulíferas que son realmente infectivas. O enfoque neste caso foi dual: por un lado localización mediante a detección, por técnicas baseadas na PCR, nos diferentes órganos

Obxectivos

trala disección, e polo outro a localización do virus nas cochinillas mediante inmunomarcaxe ligado microscopía electrónica. A fin era saber que órganos do insecto estaban ligados coa transmisión do virus.

Para o estudo do comportamento alimentario empregouse a técnica das gráficas eléctricas de penetración (EPG, *electrical potential graphs*) (Fig. 1). O obxectivo deste apartado era poñer a punto unha ferramenta que permita coñecer en cada momento que actividade está realizando a cochinilla cando se atopa na planta. Dado que o comportamento das cochinillas é críptico ocultando baixo o corpo o labio é practicamente imposible saber cando a cochinilla está comendo. Esta técnica baséase na análise das oscilacións de potencial eléctrico que se producen no circuíto eléctrico composto polo insecto e a planta durante a súa alimentación. As características das ondas rexistradas, a amplitude, a frecuencia, a forma e a súa orixe, permiten coñecer que actividades realiza o insecto durante a súa alimentación e a localización do

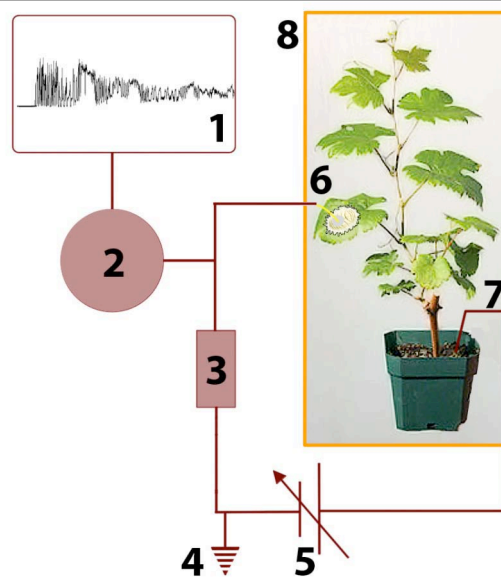


Figura 1: Esquema do sistema de rexistro DC-EPG. 1 Sinal de EPG que na actualidade se obtén directamente na pantalla do ordenador e se almacena. 2 Amplificador que amplifica 50 veces as oscilacións de potencial obtidas. 3 Resistencia interna do equipo ($1G\Omega$). 4 Toma de terra. 5 Subministrador de voltaxe. 6 Electrodo do insecto que está composto por un fino fío de cobre adherido ó seu dorso por pintura condutora con base de prata. 7 Electrodo da planta que vai introducido na terra húmida para que faga contacto. 8 Gaiola de Faraday (en laranxa) na que se atopa metida a planta e que evita a interferencia de ondas electromagnéticas ambientais.

extremo distal dos estiletos. Esta técnica foi empregada para o estudo do comportamento alimentario de diversos tipos de hemípteros (pulgóns, mosca branca, cicadélidos, psílidos) e tamén tisanópteros (trips).

O sistema basease na creación dun circuío eléctrico entre o insecto e a planta mediante a colocación dun electrodo en cada un, conectados entre si polo sistema de amplificación e rexistro. O electrodo da planta introdúcese na maceta que debe ter a terra húmida para que faga contacto. O electrodo do insecto, que é un fino fío de ouro, colócase no insecto adherido con pintura condutora con base de prata. O sistema de amplificación e rexistro posúe unha resistencia interna de $1G\Omega$ e subministra unha diferenza de potencial variable cunha intensidade de corrente desprezable ($<5\text{ pA}$). Debido á sensibilidade do sistema de rexistro a planta e o insecto deben estar pechados, durante o rexistro, nunha gaiola de Faraday que elimine o ruído producido polas ondas electromagnéticas ambientais.

A modo de resume os obxectivos serían:

Coñecer o papel que *Planococcus citri* pode xogar como vector do virus 3 do enrolado da vide (GLRaV-3) mediante o seguimento das súas poboacións naturais nun viñado, vendo a súa distribución nas plantas ó longo do ano, o seu movemento, a proporción de adultas e ninfas e as fluctuacións poboacionais ó longo do ano

Coñecer os órganos de *Planococcus citri* implicados na transmisión do GLRaV-3 e a súa influencia no mecanismo de transmisión.

Coñecer o comportamento alimentario de *Planococcus citri* mediante a técnica de gráficas eléctricas de penetración (EPG). Isto inclúe a descrición dos patróns de onda asociados con cada actividade e a obtención dos parámetros temporais da súa alimentación, con especial interese nos que poidan influír na transmisión do GLRaV-3.

Biología de *Planococcus citri* (Risso) como praga de baixa infestación nun viñado conducido en emparrado

MIGUEL CID

Resume A cochinilla algodonosa dos cítricos, *Planococcus citri*, compórtase en viñado coma unha praga de baixa intensidade que cobra importancia pola súa capacidade vectora de virus. Estudouse a evolución anual das poboacións presentes nun viñado de cv. local Tinta femia. O estudo, levado a cabo entre 2003 e 2006 mediante captura por trampas adhesivas situadas no tronco e nas polas, amosou que as poboacións presentan fortes incrementos entre finais de xullo e primeiros de agosto. Posteriormente as poboacións mantéñense en baixos niveis ate finais de ano, cando a actividade destes insectos é practicamente nula. Só as plantas que presentaron un alto grao de infestación, con femias hibernantes nas polas lignificadas, presentaron individuos nas follas e acios. Isto debe ser produto do tipo de condución en emparrado e á climatoloxía da zona que fai que só se dean 2 ou 3 xeracións consecutivas por ano. Preséntanse ciclos solapados co que en cada momento é posible atopar na planta individuos en distinto grao de desenvolvemento. Os movementos entre plantas parecen ser reducidos debido á irregular infestación das plantas. Dado o escaso movemento das cochinillas entre

plantas polo contacto entre polas do ano, o transporte pode ser debido ás prácticas de cultivo, á actividade das formigas ou ó vento. Propóñense medidas de cara a minimizar o efecto das cochinillas sobre a transmisión do virus 3 do enrolado da vide (GLRaV-3).

Palabras chave: dinámica poboacional, GLRaV-3, cochinilla algodonosa dos cítricos, ácaros, formigas, transmisión

Introdución

Planococcus citri (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae), a cochinilla algodonosa dos cítricos, é un insecto altamente polífago que afecta como praga a un grande número de cultivos ademais de a moitas outras plantas sen interese agronómico. Está descrito como hóspede de 175 xéneros pertencentes a 74 familias diferentes de plantas (Ben-Dov, 2007). O caso de *P. citri* en viñado é diferente ó da maior parte das pragas. A diferenza de *P. ficus* e *Ps. maritimus* non soe ser considerada praga dos viñedos, aínda

que na Península Ibérica se cita repetidas veces (Ruiz Castro, 1965; Lucas Espadas, 2002; Cid *et al.*, 2006a). Porén a súa relevancia non depende tanto do seu efecto directo sobre o cultivo, que en moitos casos é escaso e non repercute nin na produción nin no rendemento económico da colleita, senón da súa capacidade vectora, principalmente do virus 3 do enrolado da vide (*Grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3) (Cabaleiro & Segura, 1997a; Golino *et al.*, 2002), pero tamén do GVA (Roscliglione & Castellano, 1985).

A cochinilla dos cítricos femia é áptera e o seu desenvolvemento pasa por tres estadios ninfais ate chegar a ser adulta. O aspecto da femia adulta é semellante ó das ninfas se ben a diferenza de tamaño é apreciable chegando a adulta a medir 5 mm de longo. Tódolos estadios ninfais, así como as adultas son móbiles e manteñen patas funcionais, se ben as ninfas dos primeiros estadios son máis activas (Bodenheimer, 1951). O macho é alado, de tamaño moito menor que o da femia. O seu aparato bucal aparece substituído por dous ocelos, co que non se alimenta e non pode transmitir o virus (Gullan & Cosztarab, 1997). No seu desenvolvemento pasa por dous estadios ninfais e dous estadios prepupais nos que permanece dentro do capullo de ceras que xera e do que posteriormente emerxe o adulto (Bodenheimer, 1951). A reprodución desta cochinilla é sexual estrita.

Planococcus citri, debido ó seu amplo abano de hospedadores e a que é considerada praga en diferentes cultivos foi obxectivo de diversos estudos da súa bioloxía principalmente en cítricos (Avidov & Harpaz 1969; Berlinger, 1977; Arai, 1996; Martínez-

Ferrer *et al.*, 2003), pero tamén en roseira (Lafin & Parrella, 2004). Estes experimentos establecen só parámetros térmicos de desenvolvemento en laboratorio, umbrais de desenvolvemento e graos-día necesarios para completar as distintas fases, obtidos a temperatura constante. Sen embargo en condicións de campo son poucos os traballos realizados (Martínez-Ferrer *et al.*, 2003). Si que son abundantes os datos, recollidos na bibliografía, sobre o número de xeracións que presentan en campo, que son moi variables en función da climatoloxía, variando dende 8 ate 3 (Martínez-Ferrer *et al.*, 2003).

Ademais da temperatura, parece que outros parámetros ambientais van influír na aparición en campo e no desenvolvemento do insecto. Segundo Lucas Espadas (2002) as chuvias, que incrementan a humidade relativa, son o factor determinante para as explosións de *P. citri* en viñedos de Almería.

Outras cochinillas algodonosas son frecuente praga en viñado, *Planococcus ficus* (Walton *et al.*, 2004) e *Pseudococcus maritimus* (Geiger & Daane, 2001), causando importantes perdas sobre todo en Sudáfrica e California polo que son obxectivo de estudos exhaustivos. Algunhas outras, como no caso de *P. citri*, agás casos puntuais representan un problema unicamente pola súa capacidade transmisora de certos virus: *Pseudococcus longispinus* (Walton & Pringle, 2004a) e *Pseudococcus viburni* (Varela *et al.*, 2006). Sen embargo tódalas cochinillas algodonosas, tanto en viñado como afectando a outros cultivos, presentan a mesma problemática no seu control. As características do seu corpo cuberto de ceras

e o seu comportamento, buscando puntos de alimentación en zonas ben protexidas, en moitos casos debaixo da casca, xunto co efecto que os insecticidas teñen sobre os inimigos naturais (Franco *et al.*, 2004), fai que o control químico sexa pouco efectivo e con importantes contraindicacións. O control integrado convírtese entón na mellor ferramenta fronte estes hemípteros (Franco *et al.*, 2004; Walton & Pringle, 2004b; Anónimo, 2006)

Neste traballo pretendemos facer unha descrición do comportamento de *P. citri* nun viñado conducido en emparrado no que a densidade de poboación é baixa. O estudo dos requirimentos climáticos para o desenvolvemento da praga, así como a predición da aparición en campo e o momento máis adecuado para emprender accións de control son, xunto co estudo dos medios de control naturais (predadores, parasitos e parasitoides e enfermidades que poden afectar á praga) os puntos máis importantes. Toda a información colleitada tentará relacionarse coa posibilidade de que teña lugar a transmisión do GLRaV-3 a outras plantas do redor, e así mesmo de propoñer algún mecanismo de control que minimize as posibles transmisións.

Materiais e métodos

Parcela de estudo

O estudo poboacional foi levado a cabo nunha parcela con plantas do cultivar local Tinta femia, situado nas coordenadas 516838.94 UTMX 29-T, 4685556.97 UTM Y 29-T e que pertence ó concello de Bueu, provincia de Pontevedra. Esta parcela

correspóndese coa parcela F do traballo de Cabaleiro e Segura (2006). A explotación vitivinícola na que se engloba ten unha extensión de 5,4 Ha e está situada nun alto a 200 m sobre o nivel do mar, rodeada completamente por cultivos de *Eucalyptus globulus*. A parcela de 0,34 Ha, dista do mar 1 Km polo norte e 1,8 Km polo oeste e está situada no lindeiro norte da explotación á beira dos eucaliptos. As plantas están conducidas en emparrado, con parras distribuídas en dirección norte-sur. A distancia entre as dúas liñas do emparrado é de 3,5 m e a do corredor é de 2,5; as plantas están separadas por 3 metros dentro da mesma liña. Tódalas plantas están infectadas polo GLRaV-3, trazo que parece común a tódalas explotacións que empregan Tinta femia como cultivar. Ó longo de toda a explotación pódense atopar, na época estival, focos de *Planococcus citri* de maior ou menor intensidade en función da climatoloxía do ano.

Datos climáticos

Os datos climáticos empregados pertencen á estación meteorolóxica de Lourizán, situada nas coordenadas 527749 UTM X 29-T e 4695489 UTM Y 29-T e a unha altitude de 57 m sobre o nivel do mar. A estación dista 15 Km da parcela. Os datos foron obtidos da rede de estacións meteorolóxicas do Sistema de Información Ambiental dependente da Xunta de Galicia.

(<http://www.meteogalicia.es/galego/observacion/estacions/estacions.asp#>)

Análise da evolución do nivel de infestación

Durante o ano 2003 a mostraxe realizouse en dúas plantas nas que se atoparon femias hibernantes situadas no extremo sur da



Figura 1: Disposición das cintas adhesivas empregadas nas mostraxes. A: Vide na que se amosa, con frechas azuis, a colocación das cintas da mostraxe para avaliar a evolución do nivel de infestación. B e C son detalles das cintas colocadas na pola e no tronco, respectivamente. D: Vide na que se amosa, con frechas azuis, a colocación das cintas empregadas na mostraxe da distribución espacio-temporal das cochinillas. E, F e G son detalles das parellas de cintas situadas na base do tronco, no alto do tronco e nunha das polas, respectivamente.

parcela. No ano 2004 seleccionáronse 20 plantas que presentaban indicios, ben algunha femia, ben restos de postas ou fumaxinas de anos anteriores, todas elas situadas no extremo norte da parcela, próximas ó borde da explotación. Destas 20 plantas 2 foron desbotadas contra o final da tempada por non presentar cochinillas. Durante o ano 2005 a mostraxe levouse a cabo sobre as mesmas 18 plantas do ano 2004.

A mostraxe foi levada a cabo mediante a colocación de cintas adhesivas ó redor do

tronco e un sarmento (Fig. 1). Estas funcionaron como trampas para as cochinillas que se desprazaban ó longo da planta. Fixéronse dous grupos de 9 plantas. No grupo A colocouse unha cinta no tronco, a aproximadamente 1,7 m de altura e outra nun sarmento a unha distancia aproximada de 10 cm do seu punto de inserción na planta. No grupo B a cinta do tronco situouse a aproximadamente 0,8 m do chan e a outra nun sarmento a unha distancia aproximada de 10 cm do seu punto de inserción na planta. A distribución das cintas nas plantas estableceuse para obter ademais información espacial sobre o movemento dos insectos ó longo das mesmas.

Antes da colocación da primeira cinta eliminouse a maior parte da casca nesa zona da planta, para mellorar a adherencia da cinta e impedir que as cochinillas se movan polos sucos escapando ás trampas. As cintas colócanse, formando un funil aberto cara a base da planta, ó redor da mesma e as cochinillas quedan adheridas polo lombo ó andar baixo delas ou ben polo ventre ó andar por elas.

As cintas recóllense e anóvanse cunha periodicidade que vai dende mensual ate semanal, en función das condicións meteorolóxicas que afectan tanto á calidade adhesiva da cinta, coma ó nivel de actividade das cochinillas. As cintas recollidas trasládanse ó laboratorio onde se realiza, baixo a lupa, o reconto das cochinillas capturadas, diferenciando ninfas de primeiro e segundo estadio, que denominaremos ninfas, e ninfas de terceiro estadio e adultas, que denominaremos adultas. Así mesmo sobre as cintas, analizouse a presenza de formigas e outros

animais que puidesen gardar relación coas evolucións demográficas das cochinillas.

Influencia de factores abióticos na poboación

En base ó apuntado por Lucas Espadas (2002) analizouse a correlación entre as capturas de cochinillas e varios parámetros climáticos, representativos do tempo que estivo a cinta posta na planta: temperatura media, máxima, media das máximas diarias, mínima, media das mínimas diarias, humidade relativa media, máxima, media das máximas diarias, mínima, media das mínimas diarias, precipitación máxima diaria, media diaria e acumulada durante o período.

Distribución espacio-temporal das cochinillas

Durante o ano 2005 leváronse a cabo dúas mostraxes, de cara a estudar o movemento das cochinillas o longo da planta durante a tempada. Ambas mostraxes foron realizadas coa mesma periodicidade que as anteriores. En cinco plantas, seleccionadas por presentar femias hibernantes, colocáronse cintas adhesivas a tres alturas distintas: a 30-40 cm do chan, a metro e medio do chan, no alto do tronco, e a medio metro da anterior, nunha das polas principais (Fig. 1). En cada un destes puntos colocáronse dúas cintas adhesivas como foron descritas anteriormente pero enfrontadas: a cinta situada máis preto da base estaba colocada a modo de funil aberto cara a base, e a outra cinta moi próxima a anterior, e do mesmo xeito, pero aberta cara o lado contrario. Deste modo as capturas realizadas na cinta inferior amosarían as cochinillas que ascendían polo tronco, mentres que as da cinta superior

amosarían as que descendían por el. Para tentar minimizar o efecto que sobre o desprazamento das cochinillas tiñan as propias cintas levouse a cabo outra mostraxe desta vez visual.

Para a mostraxe visual seleccionáronse de igual modo 5 plantas con femias hibernantes. Cada planta subdividiuse en tres partes: o tronco, as polas lignificadas de anos anteriores, e a parte verde, é dicir os sarmentos do ano, as follas e os acios. A mostraxe realizouse conxuntamente por dúas persoas adicando un tempo de 2 minutos a cada parte da planta. Durante a mostraxe tomouse nota do nivel de infestación por ninfas de primeiro e segundo estadio, por ninfas de terceiro estadio e adultas e por formigas. O nivel de infestación estimouse en tres graos distintos: de 1 a 3 individuos, nivel baixo; de 4 a 10 individuos, nivel medio; e máis de 10 individuos nivel alto.

Procesado dos datos de capturas

Dado que o número de días que as cintas están colocadas nas plantas é variable, á hora de representar os datos calcúlase o número de cochinillas capturadas por día. Este valor obtense de dividir o número de cochinillas capturadas nunha cinta entre o número de días que esta pasou na planta. O que se representa, en todo caso, son as medias de capturas diarias por planta ou cinta. Empregouse o mesmo método para a análise das capturas de formigas.

No caso da mostraxe para o estudo do movemento mediante cintas obtívose o movemento neto relativo. Este valor é o resultado de lle restar ó número cochinillas capturadas na cinta inferior o da cinta superior para cada nivel e dividir o valor

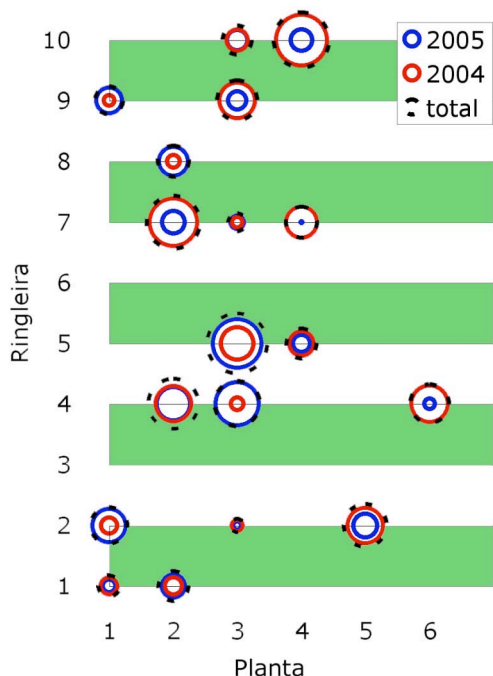


Figura 2 : Esquema de localización das plantas mostreadas na parcela durante o período 2004-2006. As ringleiras correspóndense coas liñas do cultivo. O nivel de capturas de cochinillas en cada planta represéntase mediante a área dos círculos que rodean cada planta mostreada. O círculo vermello representa as capturas durante o ano 2004, o círculo azul as capturas durante o ano 2005 e o círculo negro discontinuo as capturas totais realizadas na planta. Os sectores en verde representan a distribución dos emparados. Así pois o contacto entre as plantas situadas nos bordes dun mesmo sector é elevado e inexistente entre as plantas de dous sectores distintos.

obtido entre o da cinta na que se produciron máis capturas. Os resultados da mostraxe visual representáronse asignando a cada nivel de abundancia de cochinillas os seguintes valores: nivel baixo 1,5, nivel medio 7,5 e nivel alto 15; e facendo a media por planta.

Estima do número de xeracións por ano

O grao-día (°D) é unha unidade que relaciona a temperatura co tempo, e se emprega para medir o desenvolvemento de invertebrados, especialmente artrópodos. Correspóndese co número de °C por riba do umbral de desenvolvemento que se acadan cada día. A suma destes valores diarios vai dar unha idea acerca do tempo no que a temperatura é alta abondo para que se produza o desenvolvemento, tendo en conta ademais que a maiores temperaturas o metabolismo é maior, e se acelera o proceso. Nalgúns casos pode marcarse ademais un umbral superior de desenvolvemento. Se a temperatura excede ese umbral a velocidade de desenvolvemento pode estancarse, reducirse lixeiramente ou ben pararse completamente o desenvolvemento.

Os graos-día para *P. citri* foron calculados a partir dos valores dezminutais dos datos climáticos. Obtivéronse os graos-día correspondentes a cada día restándolle a media das temperaturas dezminutais o umbral mínimo de desenvolvemento. Para o seu cálculo, e o da duración teórica do ciclo (número de días necesario para completar o desenvolvemento e ovipoñer), consideráronse os valores descritos na bibliografía para *P. citri*: un umbral de desenvolvemento de 8,2 °C e unha constante térmica de 698 °D (Avidov & Harpaz, 1969) un umbral de 8,3 °C e unha constante térmica de 562,4 °D (Martínez-Ferrer *et al.*, 2003) e un umbral de 8,4 °C e unha constante térmica de 525 °D (Bodenheimer, 1951).

Para estimar o número de xeracións por ano, e asociar os picos de capturas con cadansúa xeración, empregáronse os valores de duración teórica do ciclo para cada

momento. Tomando como punto de partida o maior pico de capturas do ano, calculouse a duración teórica dos ciclos anteriores e posteriores segundo os parámetros anteriormente descritos, o que nos debería devolver as datas nas que aparecen os picos poboacionais correspondentes ás outras xeracións consecutivas. Estes datos teóricos contrastáronse coa evolución das capturas, de cara a establecer que parámetros biolóxicos de desenvolvemento se adecuaban máis os nosos datos, así como a facer unha estimación do número de xeracións que se suceden ó

longo dun ano.

Calculo da data teórica de comezo dos movementos de cochinillas

Para o cálculo do día máis axeitado para o comezo da conta dos graos-día para establecer o comezo do movemento pola planta das cochinillas empregouse o método proposto por Fatzinger & Dixon (1996). Segundo este método, o mellor día para comezar a acumular graos día que determinen a aparición dun suceso é aquel no que a variación na acumulación de graos-día é

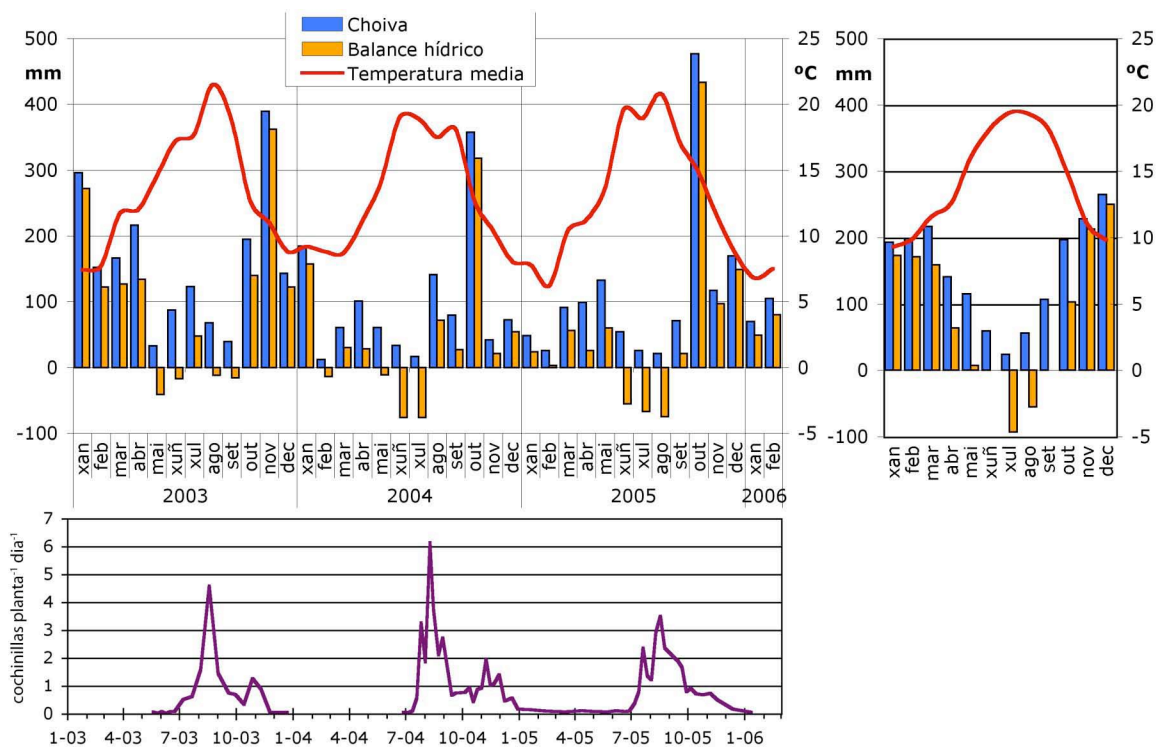


Figura 3: Evolución climática no período de mostraxe e capturas de cochinillas. Na gráfica superior da esquerda amósanse as precipitacións acumuladas por mes, a temperatura media por mes e o balance hídrico mensual rexistrados na estación meteorolóxica de Lourizán que é a máis próxima á parcela de estudo (datos obtidos a partir da web www.meteogalicia.es). Na gráfica superior da dereita amósanse as medias históricas de 16 anos para a mesma estación. (datos obtidos a partir de Carballeira *et al.*, 1983). Na gráfica inferior represéntase a evolución das capturas de cochinillas por planta e día ó longo dos tres anos de mostraxe

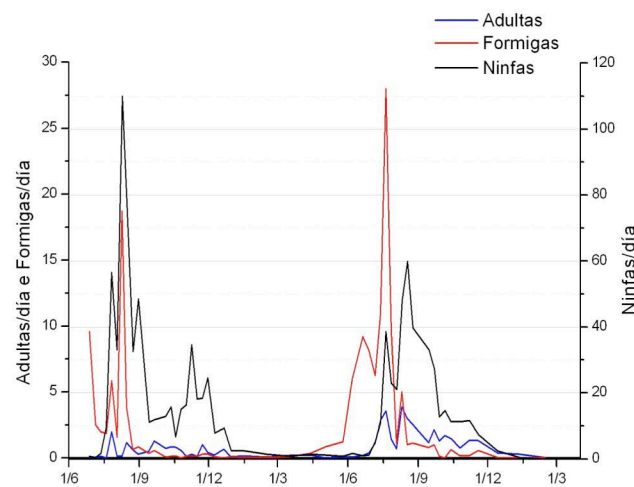


Figura 4: Evolución das capturas de ninfas, adultas e formigas durante os anos 2004 e 2005. No eixo da esquerda represéntanse as capturas de formigas e adultas (ninfas de terceiro estadio e adultas) por día. No eixo da dereita represéntanse as capturas de ninfas (ninfas de primeiro e segundo estadio) por día.

menor para un conxunto de anos. Neste caso empregouse o valor para o que a variación, expresada como desviación estatística, de graos-día acumulados ate a captura de 0,5 cochinillas por planta e día foi menor para os anos 2003, 2004 e 2005.

O resultado obtido polo método descrito comparouse coa eficacia de empregar unha data arbitraria, neste caso o primeiro de ano, como punto a partir da cal comezar a acumular graos-día.

Estudo das cochinillas potencialmente virulíferas

Durante o ano 2004 seleccionáronse 5 plantas cun alto grao de infestación. De cada planta colléronse en cada mostraxe 3 cochinillas, adultas na medida do posible, e foron analizadas para a presenza do virus 3 do enrolado da vide (GLRaV-3) mediante IC-RT-PCR sobre os individuos completos (Cid et al, 2007).

Resultados

Análise da evolución do nivel de infestación

A poboación de cochinillas non se estende uniformemente por tódalas plantas da parcela. Malia que as plantas que forman un emparrado están en estreito contacto, orixinando un continuo, as plantas infestadas non se distribúen homoxeneamente e o nivel de infestación varía moito entre unhas e outras (Fig. 2). Así pois, podemos falar de subpoboación ó nos referir ás cochinillas que viven en cada unha das plantas xa que o fluxo de individuos entre as plantas parece ser escaso.

O nivel de infestación das plantas non se mantén homoxéneo ó longo do tempo. Os valores de cochinillas capturadas durante o ano 2004 non se correlacionan cos valores obtidos para as mesmas plantas durante o ano 2005 (coeficiente de correlación 0,071). Incluso dentro do mesmo ano os diferentes

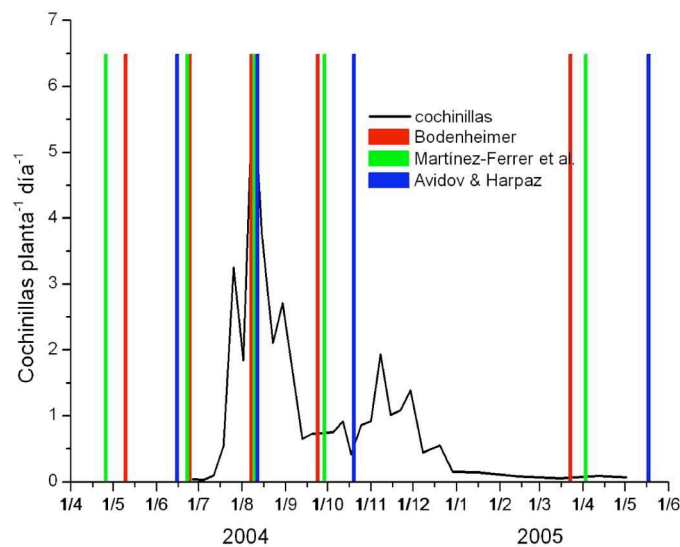


Figura 5: Localización temporal das eclosións segundo a bibliografía. No gráfico representábase a evolución das capturas durante o ano 2004. Superposto a isto amósase a posición que, segundo os datos de umbral de desenvolvemento e de constante térmica determinadas por distintos autores, deberían ocupar as eclosións das xeracións anteriores e posteriores.

comportamentos entre plantas son evidentes. Algunhas presentan picos de crecemento a principios da tempada mentres que outras os presentan cara finais.

O longo do período de estudo, con motivo da concatenación de varios anos de seca (Fig. 3) as poboacións de cochinilla foron incrementándose dende 2003 ate 2005 no conxunto da parcela. Os datos de capturas globais non amosan claramente ese incremento (Fig. 3). Sen embargo os datos de capturas de adultas son moito máis elevados durante o ano 2005 ca no ano anterior. Así pois durante o ano 2004 capturáronse 45 ninfas por cada adulta mentres que no ano 2005 a relación foi de 12 ninfas por adulta capturada (Fig. 4).

O patrón que presentan as medias das capturas por planta e día é bastante homoxéneo nos tres anos (Fig. 3). As cochinillas permanecen entre febreiro e

xullo en case total inactividade, se ben algunhas se moven pola planta. O período de actividade real das cochinillas vai dende finais de xullo ate decembro-xaneiro, en función das características climáticas do ano.

O punto de comezo da actividade, tomado como tal aquel no que se capturan 0,5 cochinillas por planta e día, ten lugar a mediados do mes de xullo. A finais de xullo mediados de agosto ocorren os picos de capturas máis elevados. A maior parte dos individuos capturados foron ninfas de primeiro e segundo estadio, sendo moito máis escasas as capturas de adultas e ninfas de terceiro estadio (Fig. 4). Despois dos picos de agosto as capturas baixan bastante encadeando sucesivos picos de escasa entidade. Durante o mes de decembro ou xaneiro baixan de novo ata situarse nun nivel case testemuñal.

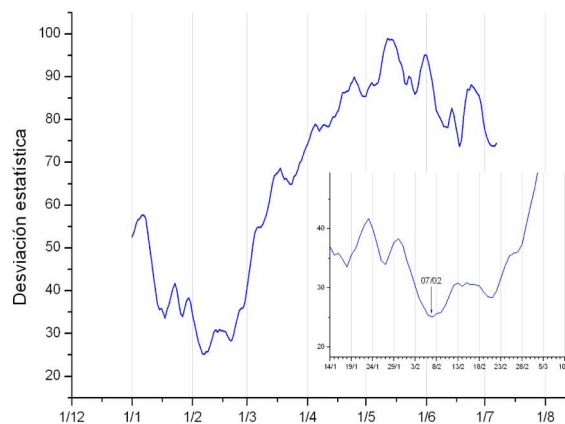


Figura 6: Evolución temporal da desviación estadística dos graos-día acumulados ata o momento no que se acadan niveis de captura de 0,5 cochinillas por planta e día para os anos 2003, 2004 e 2005. Para cada día represéntase a desviación estadística do número de graos-día que separan, para os tres anos, ese día do momento no que se acada o nivel de capturas descrito.

Distribución espacio-temporal das cochinillas

A análise comparativa dos dous grupos de plantas segundo a colocación das cintas amosa certas diferencias se ben non segue unha tendencia clara (Fig. 7). No ano 2004 as capturas das cinta da póla foron superiores no grupo A ca no B pero o perfil do total de capturas foi bastante semellante en ambos grupos. Polo tanto debía haber máis femias na zona alta e horizontal da planta nas do grupo A ca nas do B. No ano 2005, sen embargo, no grupo A prodúcese unha forte baixada nas capturas da zona baixa mentres que as da cinta alta so se reducen un pouco.

A mostraxe de movemento por cintas adherentes no ano 2005 amosou como a outra grandes diferencias entre plantas, segundo o nivel de infestación. Dúas das plantas presentaron un nivel elevado mentres que as outras tres presentaron niveis bastante máis baixos. Como se pode apreciar

na figura 8 o movemento neto relativo de cochinillas, representado como positivo cando é ascendente e como negativo cando é descendente, é basicamente ascendente na totalidade da planta ó longo de toda a tempada. Agás en casos de capturas moi mínimas, o movemento neto é sempre ascendente. Só se poden destacar tres momentos nos que a tendencia é descendente: na zona media a finais de setembro e na zona baixa a finais de xullo e primeiros de agosto. Tendo en conta as capturas medias diarias en cada un dos niveis ó longo do tempo pódese ver que no nivel baixo as capturas son máis constantes ó longo de todo o ano presentando un pico entre finais de xullo primeiros de agosto e outro a finais de setembro primeiros de outubro. No nivel medio as capturas son baixas o comezo de tempada, sendo bastante máis abundantes no período setembro-novembro e no caso do nivel alto as capturas son elevadas entre finais de xullo e primeiros de agosto e no resto da tempada son polo xeral baixas, o

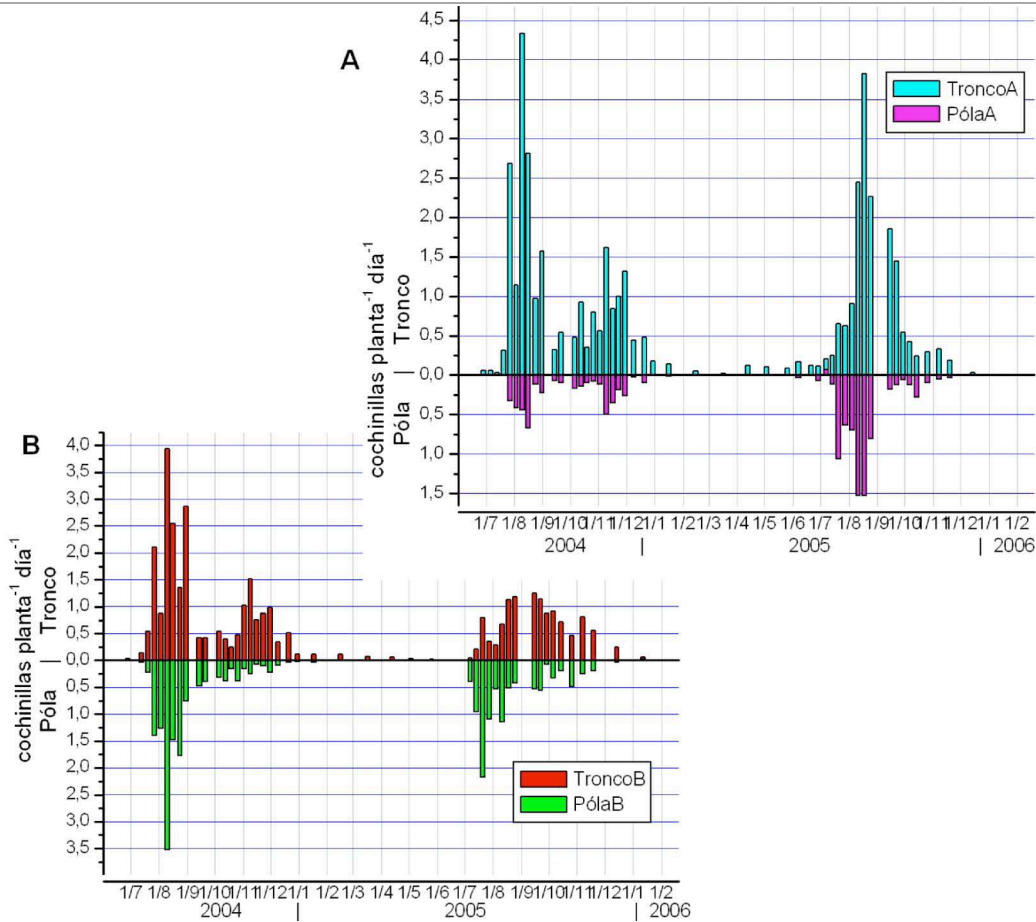


Figura 7: Evolución das capturas segundo a cinta. Represéntanse os valores de capturas diarias medias por planta durante o período 2004-2005; para cada gráfica represéntanse na parte inferior as capturas da cinta colocada na pola e na parte superior as capturas da cinta situada no tronco. Na gráfica A represéntanse os datos das plantas do grupo A nas que a cinta do tronco está situada a 1,5 m do chan. Na gráfica B represéntanse os datos das plantas do grupo B nas que a cinta do tronco está situada a 0,8 m do chan.

que parece indicar dúas zonas de hibernación, unha na base do tronco e outra na parte alta da planta, nas ramificacións.

A mostraxe visual realizada durante o 2005 amosou que só en 2 das 5 plantas as cochinillas foron detectadas recurrentemente na parte verde e noutra máis atopáronse algunhas de modo puntual. Nestes casos os individuos apareceron localizados preto das zonas leñosas. En dúas das plantas só foron detectadas no tronco e das outras tres en

dúas foron máis abundantes as cochinillas no tronco ca nas polas e nunha, na que apareceron nos acios, a poboación foi máis abundante nas polas que no tronco. A figura 9 que representa as medias por planta amosa unha prevalencia clara no tronco durante todo o ano agás xusto á fin da tempada cando a baixada xeral das poboacións e o mantemento das poboacións nas polas dunha das plantas fan que as cochinillas nas polas sexan superiores. Na parte verde o

nivel é baixo durante toda a tempada agás dende mediados de setembro a mediados de outubro. A presenza nos sarmentos de varios anos é evidente ó longo de toda a tempada pero é maior entre mediados de outubro e mediados de novembro.

Estima do número de xeracións por ano

A partir do maior pico de capturas do ano pretendeuse comprobar que umbrais de temperatura e que constantes térmicas, dos propostos para *P. citri*, predirían con maior fiabilidade os picos rexistrados nas mostraxes. Sen embargo, ningún deles permitiu

explicar claramente a distribución de picos ó longo do ano como se pode apreciar para o caso do ano 2004 (Fig. 5).

O número de xeracións por ano en base ás duracións teóricas dos ciclos debe ser de 3 para os ovos que eclosionan máis tempramente. Sen embargo a aparición de picos que non se corresponden con esas 3 xeracións pon de manifesto o solapamento de distintas xeracións. Eses outros picos deben corresponderse cos ovos que eclosionan algo máis tarde e que tendo en conta o número de graos-día totais do ano só poderán completar dúas xeracións durante o ano.

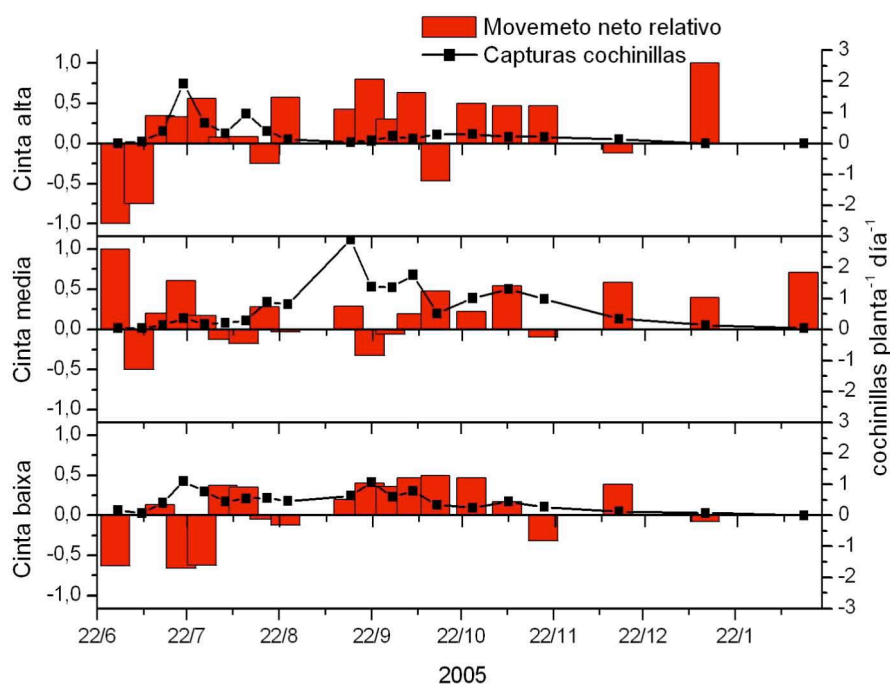


Figura 8: Movemento neto relativo para o ano 2005. Na gráfica representáanse en columnas o movemento neto relativo ((nº de capturas na cinta inferior – nº de capturas na cinta superior) / nº de capturas maior das dúas cintas), no eixo da esquerda e no eixo da dereita a media de capturas entre as dúas cintas que nos aporta un dato sobre a robustez do dato de movemento relativo neto. Representanse tres gráficas que, de abaixo a arriba se corresponden cos datos obtidos nas cintas enfrontadas situadas a 0,3-0,4 m e 1,5 m do chan e nunha póla principal a aproximadamente 0,5 m da cinta anterior respectivamente.

Cálculo da data teórica de comezo dos movementos de cochinillas

Malia que non houbo ningún valor de umbral de desenvolvemento que resultase claramente máis axeitado para explicar os nosos datos, para a predición do comezo da actividade das cochinillas empregáronse os parámetros de Martínez-Ferrer e colaboradores (2003), pois aínda que non foron obtidos para vide si que foron calculados a partir de datos de campo. O punto a partir do cal é máis axeitado comezar a acumular graos día para a predición das primeiras migracións de cochinillas ó longo da planta é o 7 de febreiro (Fig. 6). Partindo de ese día o número de °D a acumular para acadar capturas de 0,5 cochinillas por planta e día sería de $1044,3 \pm 25,1$, o que tendo en conta as temperaturas medias para o mes de xullo nos marca un abano de ± 2 días. Se se empregase unha data arbitraria para comezar a acumular graos día, práctica habitual pois fai que sexan máis sinxelos os cálculos, a utilización do día primeiro de ano faría que fosen necesarios $1132,9 \pm 52,6$ °D, o que marca un abano de ± 4 días.

Influencia de factores abióticos na poboación

Ningunha das variables analizadas amosaron unha forte correlación coa captura de cochinillas (Táboa 1). Foron as variables térmicas as que presentaron unha maior correlación, con valores en torno a 0,5, ligado co efecto que as temperaturas teñen na aceleración do desenvolvemento. Así pois os picos de capturas, maiores que 2 cochinillas por planta e día, aparecen asociados con temperaturas medias maiores que 19°C e mínimas maiores que 11°C. A humidade

	Cochinillas
Cochinillas	1,000
Temperatura media	0,439
Temperatura máxima	0,309
Temperatura media das máximas	0,413
Temperatura mínima	0,487
Temperatura media das mínimas	0,470
Humidade relativa media	-0,057
Humidade relativa máxima	-0,085
Humidade relativa media das máximas	0,020
Humidade relativa mínima	0,126
Humidade relativa media das mínimas	-0,077
Precipitación acumulada	-0,198
Precipitación media diaria	-0,078
Precipitación máxima diaria	-0,169

Táboa 1: Coeficientes de correlacións entre as capturas medias por planta e día obtidas durante os tres anos de mostraxe 2003-2006 e as variables climáticas.

relativa que resultou ser un factor determinante para aparición de cochinillas nos viñedos de Almería (Ruiz Castro, 1965; Lucas Espadas, 2002) non o é neste caso

Relacións bióticas

Durante as mostraxes atopáronse mostras do establecemento de relacións bióticas de *P. citri* con outros organismos. Estas relacións foron de tipo simbiótico, de predación e de parasitación. As relacións simbióticas establecéronse coas formigas, que foron tamén recontadas nas cintas (Fig. 4). O nivel de capturas de formigas incrementábase antes da aparición das cochinillas e durante os primeiros picos de captura das cochinillas sendo baixas o resto da tempada. Malia non ser capturados nas cintas predadores xa descritos como tales na bibliografía foi moi abundante a captura dun ácaro, *Tyrophagus putrescentiae*. Se ben as capturas deste ácaro non foron cuantificadas durante a mostraxe se apreciou un incremento no outono do ano 2004 e durante o ano 2005 as capturas foron altas durante todo o ano. O nivel de

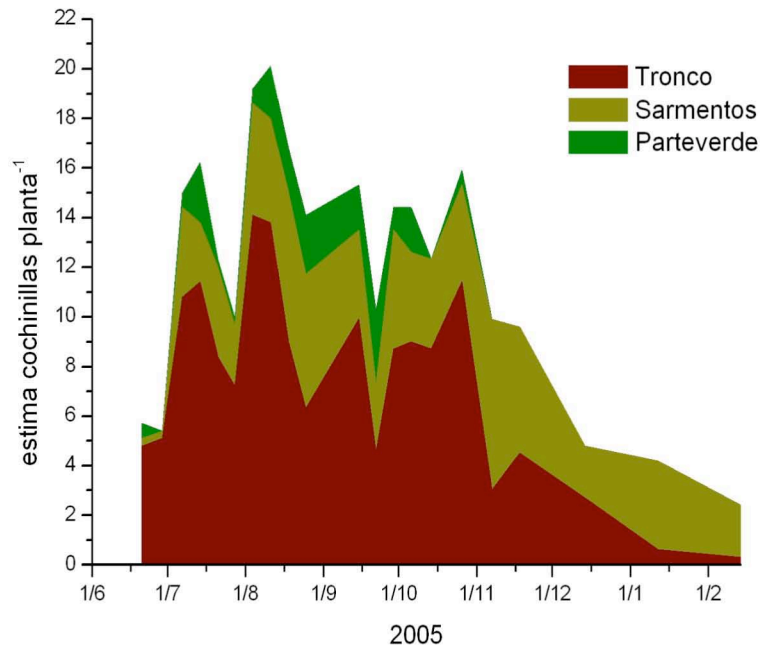


Figura 9: Mostraxe visual, ano 2005. Representábase a evolución temporal da observación de cochinillas durante 4 minutos en cada órgano. No eixo vertical represéntase a media por planta do nivel de infestación por cochinillas para cada unha das partes en que se dividiu: tronco, sarmentos e parte verde, que inclúe polas verdes, acios e follas. Os cálculos fixéronse asignando os valores: 1,5 para o nivel baixo de infestación, entre 1 e 3 cochinillas; 7 para o nivel intermedio de infestación, entre 4 e 10 cochinillas; e 15 para o nivel alto, máis de 10 cochinillas.

parasitismo foi baixo durante os tres anos. Sen embargo durante o ano 2005 apareceron nas cintas moitas máis momias ca en anos anteriores. Polo xeral, as momias adheridas ás cintas estaban xa baleiras, e das poucas que contiñan o parasito ningunha chegou a eclosionar, polo que non foi posible a identificación.

Análise das cochinillas potencialmente infectivas

A análise das cochinillas capturadas ó longo de todo o ano (Fig. 10) amosou que un 72,3% dos individuos eran portadores do virus e polo tanto potencialmente infecti-

vos. Non se presentaron importantes diferencias ó longo do ano mentres o número de individuos capturados para a análise se mantivo en 15, oscilando entre 13/15 e 10/15 o que representa un 87-67 %.

Discusión

A vide é quen de acumular grandes capas de casca co que se converte no acubillo perfecto para as cochinillas, que prefiren os lugares agochados e pouco accesibles (Berlinger, 1977). Isto fai destes insectos un obxectivo complexo para o emprego de métodos de control baseados en químicos non sistémi-

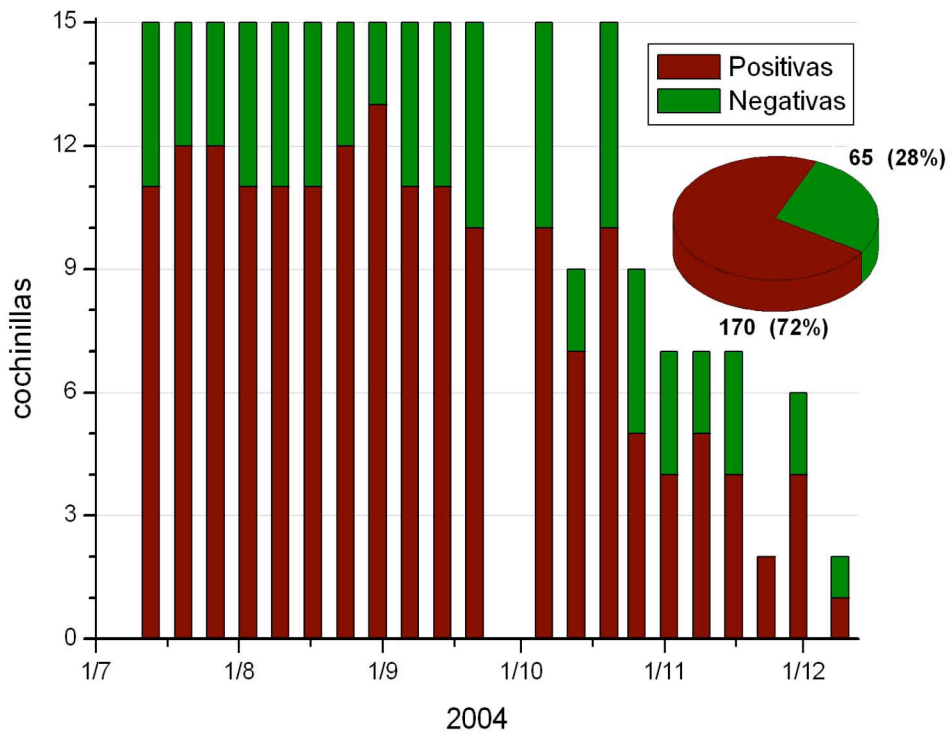


Figura 10: Cochinillas potencialmente infectivas. Na gráfica de barras representábase a evolución, segundo a data de mostraxe, na detección do GLRaV-3 mediante IC-RT-PCR en 15 cochinillas collidas en 5 plantas infectadas polo virus (3 cochinillas por planta). O gráfico de sectores representa o total de cochinillas analizadas o longo de toda a tempada.

cos. O feito de que desenvolvan boa parte do seu ciclo anual baixo da casca dificulta chegar a coñecer cal é o seu comportamento. Debido a isto neste traballo se empregaron dous mecanismos de mostraxe: un mediante cintas adhesivas (Geiger & Daane, 2001; Lucas Espadas, 2002) que, colocadas sobre un segmento no que foi retirada a casca, vai cuantificar os movementos das cochinillas ó longo da planta; e o outro mediante a mostraxe visual tentando alterar o mínimo posible os lugares de agocho das cochinillas (Geiger & Daane, 2001). Sen embargo ámbolos dous métodos presentan efectos negativos sobre o obxectivo do

estudo: as cintas ó evitar a dispersión das cochinillas ó longo da planta, sendo un método substractivo de mostraxe, van influír na habitual evolución dos *Planococcus* na planta; por outro lado a mostraxe visual implica sempre un certo grao de alteración dos agochos empregados polas cochinillas co que a medida que transcorren as semanas as plantas están cada vez máis alteradas e ofrecen menor protección.

Durante o período invernal as cochinillas permanecen baixo a casca das partes leñosas e a súa actividade é moi baixa, aínda que non inexistente. Este período de baixa actividade pode ter dous compoñentes ligados entre si.

Un deles son as baixas temperaturas do inverno por baixo ou preto do umbral de desenvolvemento das cochinillas e o outro o feito de que ó ser a vide unha planta caducifolia durante o período invernal a súa actividade está moi mermada (Nassar & Kliever, 1966; Kliever, 1967) e polo tanto tamén os recursos que poden obter os comedores de floema.

Malia a que no levante español a entrada en actividade das cochinillas está ligada ás chuvias que incrementan a humidade relativa (Lucas Espadas, 2002) na nosa zona de estudo isto non é así. O clima da costa atlántica do noroeste da Península Ibérica presenta durante todo o ano humidades relativas altas abondo durante todo o ano que, agás casos puntuais, permiten a súa multiplicación sen que os ovos se volvan inviables ou se produza a morte das ninfas, que son máis sensibles ó ambiente seco (Bodenheimer, 1951).

Durante o período de estudo (2003-2005) o nivel de infestación xeral da parcela, e de toda a explotación, aumenta. Vese un maior número de femias hibernantes que continúan o seu desenvolvemento en primavera, que se reflicte no alto nivel de capturas de adultas a primeiros de agosto de 2005 (Fig. 4). Isto estará probablemente ligado á climatoloxía dos tres anos que foron anormalmente secos (Fig. 3), o que soe dar lugar a explosións poboacionais dos comedores de floema que deixarían máis femias hibernantes, e con outonos e invernos de escasa pluviometría o que reducirá a mortandade durante o período de inactividade. Malia isto, durante o ano 2005 as capturas de ninfas son máis baixas do que se esperaba, pois a porcentaxe de parasitación se viu

incrementada e un bo número de cochinillas, xa adultas non chegaron a ovipoñer malia non parecer estar parasitadas, sen coñecer a causa dese comportamento.

O momento no que a actividade se incrementa sensiblemente, acadando as 0,5 capturas por planta e día, pode ser calculado seguindo o método de Fatzinger & Dixon (1996). Ese nivel de actividade se producirá cando se acumulen 1044,3 °D dende o 7 de febreiro. A desviación estatística do cálculo é 25,1 °D, o que se corresponde cun abano de ± 2 días. Sen embargo, tamén podería ser empregado o primeiro de ano para comezar a acumular os graos-día (chegando a 0,5 cochinillas por día e planta cando se acumulasen os $1132,9 \pm 52,6$ °D). Esta segunda estima do comezo da actividade, máis sinxela de calcular, aínda que é menos precisa podería ser perfectamente válida. O rango de nove días que establece, dentro do cal vai estar situado o punto de inicio da actividade, non supón neste caso unha diferenza substancial sobre o estado da poboación. Polo tanto podería ser usado como método para estimar o comezo da actividade das cochinillas.

O comezo de actividade preséntase atrasado con respecto ó que cabería esperar tendo en conta os parámetros térmicos propostos na bibliografía. Isto pode ser debido a dous factores, o primeiro deles que a escasa actividade da vide durante o inverno atrasa o seu desenvolvemento e o segundo que os ovos presenten un umbral de desenvolvemento maior que o resto dos estadios. Segundo Laflin & Parrella (2004) o umbral de desenvolvemento para ovos é de 10,9 °C, sensiblemente máis alto que o resto de umbrais propostos. Isto podería dar un

atraso na eclosión xa que, unha vez completado o desenvolvemento e a ovoposición, serían necesarios niveis de temperatura máis elevados para que emerxesen as ninfas de primeiro estadio.

O feito de que as constantes térmicas descritas na bibliografía non consigan explicar a aparición dos picos detectados en campo (Fig. 5) indícanos a presenza de diferentes xeracións solapadas. A distancia entre picos, expresada como graos-día, é excesivamente reducida como para poder completar as cochinillas o seu ciclo. A multiplicidade de picos que aparecen a partir de finais de agosto poden estar motivados, ademais de polo solapamento de xeracións, porque, segundo describe Bodenheimer (1951), entre cochinillas irmás o tempo necesario para acadar estas a ovoposición varía en función do momento do ano no que se produza a eclosión. Así na tempada quente chegan a oviposición nun abano de 14 días mentres que na tempada fría poden acadar o abano de 52 días. Dese modo é normal que a partir de finais de agosto non sexa posible diferenciar picos poboacionais.

O número de xeracións consecutivas que teñen lugar nun ano variará entre as 2 e as 3 en función de cando eclosionen os ovos de principio de verán. Os ovos que eclosionen a principios-mediados de xuño poderán acumular graos-día abondos como para poder completar 3 xeracións. Sen embargo os ovos que eclosionen a finais de xullo non van poder máis que completar dúas xeracións no ano e probablemente parte da segunda xeración serán as femias que, estando máis desenvolvidas, farán a posta a primeiros de xullo do ano seguinte. As diferencias no número de xeracións por ano

veñen derivadas do baixo número de graos-día acumulados ó longo do ano. Así no sueste da Península Ibérica descríbense 6 xeracións (Ruiz Castro, 1965) acumulando de media case o dobre de graos-día que na localidade de estudo.

O feito de, por mor da climatoloxía, poder completar tan poucas xeracións ó ano é unha das causas de que non acaden niveis de poboación importantes. É por isto que en contra do observado no surleste da Península Ibérica (Ruiz Castro, 1965) para *P. citri* e para outras cochinillas algodonosas que afectan a vide (Berlinger, 1977; Geiger & Daane, 2001) a chegada das cochinillas as follas e froitos se produce nas plantas onde o nivel de infestación é alto, como sucede tamén para o pulgón *Eriosoma lanigerum* infestando maceiras (Asante *et al.*, 1993). Na parcela de estudo só as plantas que presentaban un nivel importante de infestación nas polas de varios anos de idade chegaron a presentar insectos en follas e froitos. É probable que o sistema de conducción en emparrado inflúa tamén na chegada de insectos á parte verde. As plantas con este sistema son moito máis altas, con máis tronco e máis posibles sitios para se agachar, sen ter que estenderse polas follas, que son localizacións moito máis expostas. Deste modo, aínda que a poboación sexa semellante á doutra planta cunha conducción distinta, o nivel de infestación aparente é moito menor e as perdas relacionadas coa presenza de insectos nos acios case inexistente.

A maior parte dos autores (Bodenheimer, 1951; Ruiz Castro, 1965; Berlinger, 1977; Geiger & Daane, 2001) falan de movementos a finais de tempada dende as follas e partes verdes cara o tronco, e especifica-

mente cara a base do tronco. A nosa análise do movemento das cochinillas non amosa isto. O movemento é basicamente ascendente durante todo o ano, se ben unha certa porcentaxe dos desprazamentos son tamén descendentes e a finais de setembro se producen descensos dende a parte alta do tronco á baixa. Isto indicaría que os individuos hibernantes, que quedan baixo a casca das zonas baixas do tronco, non serían na súa maior parte individuos que descenderon dende as partes verdes senón os establecidos dende un principio nesa zona e algúns dos que baixaron dende a zona alta do tronco.

Aínda que o réxime térmico da zona vai marcar fortemente o desenvolvemento da praga hai outros factores que poden ter moito que ver na súa evolución: o réxime pluviométrico e a disponibilidad de auga, a oscilación estacional de aminoácidos libres na vide e as relacións bióticas ben de simbiose, coas formigas, ben de parasitismo ou predación.

O réxime pluviométrico pode ter dous modos de acción, un deles afectando ó estado fisiolóxico do hospedador e outro afectando directamente ás cochinillas, principalmente durante o inverno. A seca está xeralmente asociada con picos nas poboacións de fitófagos (White, 1984; Mattson & Haack, 1987; Jones & Coleman, 1991) e aínda que, se ben isto non é así para a totalidade de binomios planta-insecto, si que soe ser habitual para os comedores de floema (Koricheva *et al.*, 1998). A causa do aumento das poboacións de fitófagos en seca está ligado a que a planta se atope nun estado que resulta nutritivamente máis axeitado para os insectos, co nivel de aminoácidos libres anormalmente alto para

actuar como protectores osmóticos e cos metabolitos secundarios de defensa baixos (Jones & Coleman, 1991). Ó estado fisiolóxico da planta hai que lle sumar o efecto que sobre os insectos ten directamente o clima e outros organismos que afectan ós insectos: patóxenos, parasitos ou predadores (Mattson & Haack, 1987). En calquera caso o efecto vai estar en función do nivel de seca xa que en moitos casos unha seca suave pode aumentar os niveis de comedores de floema, mentres unha seca severa afecta no sentido contrario reducíndoo (Mattson & Haack, 1987; Koricheva *et al.*, 1998). Ata o momento non existe ningún traballo sobre a influencia da seca en cochinillas infestando vides. Calatayud e colaboradores (1994, 2002) estudaron o efecto da seca en *Phenacoccus manihoti* e *Ph. herreni*, outras cochinillas algodonosas, sobre mandioca. Os seus resultados amosaron que en seca as poboacións se incrementan ó tempo que se incrementa o contido en aminoácidos libres no floema. Ademais as variacións de metabolitos secundarios, glicósidos cianoxénicos que actúan como fagoestimuladores e a rutina que actúa na resposta de antibiose, están ligados tamén coas variacións poboacionais. Os únicos traballos que analizan o efecto da seca sobre fitófagos alimentándose en vide (Trichilo *et al.*, 1990; Daane & Williams, 2003) foron realizados cun cicadélido que se alimenta das células do mesófilo e que ovipón no interior da folla. Parece que isto é o que fai que a seca diminúa a capacidade reprodutiva do insecto, xa que o nivel de aminoácidos libres en vides sometidas a estrés hídrico se ve claramente incrementado (Bertamini *et al.*, 2006).

O estado fisiolóxico da vide ó longo do ano varía como lles sucede ó resto de especies leñosas caducifolias. A chegada do outono supón a translocación de nutrientes á parte leñosa antes da caída da folla mentres que a primavera supón a mobilización de nutrientes almacenados nas raíces e a madeira para favorecer a formación das pólas novas, follas, flores e froitos; grande parte deses nutrientes son formas nitroxenadas solubles (Nassar & Kliwer, 1966; Kliwer, 1967) que están relacionadas cun aumento da eficacia biolóxica dos floemófagos (White, 1984).

As formigas establecen coas cochinillas, así como con outros insectos floemófagos, unha relación simbiótica importante (Buckley, 1987). Mentres os hemípteros xeran a melaza, que rica en azucres e aminoácidos, é unha parte importante da dieta das formigas (Helms & Vinson, 2002), estas defenden ós hemípteros do ataque de predadores e parasitos (Itioka & Inoue, 1996a,b,c), crean refuxios que os protexen das condicións ambientais (Helms & Vinson, 2002) e incluso favorecen o movemento de cochinillas (Rohrbach *et al.*, 1988) e outros hemípteros (Helms & Vinson, 2002) entre plantas, aumentando así o número de colonias. A protección por parte das formigas, sen embargo, soe estar en función da densidade de hemípteros pastoreados, cando a colonia crece por riba das posibilidades de protección os inimigos naturais son quen de exercer o control da poboación (Breton & Addicott, 1992). Ademais tamén os parasitos e predadores teñen un comportamento ligado á densidade dos hemípteros: a ovoposición en moitos casos só se produce en

individuos de colonias relativamente grandes ou preto delas (Sagarra *et al.*, 2000).

Nun primeiro momento, durante o mes de xullo eclosionan os ovos das femias hibernantes que se alimentaron co floema cargado de aminoácidos, mobilizados das reservas das raíces para o crecemento das xemas (Nassar & Kliwer, 1966; Kliwer, 1967). Esa carga adicional de aminoácidos e as temperaturas entre os 15-20 °C (Bodenheimer, 1951; Arai, 1996) mellora a súa capacidade reproductiva que orixina a explosión poboacional. Como nese momento se producen picos de capturas tanto de ninfas como de adultas é probable que haxa algún acontecemento, seguramente climático, que estimule a actividade das cochinillas e a súa migración. Ó mesmo tempo o nivel de capturas de formigas se eleva fortemente, o que se podería corresponder con rutas exploratorias para a localización de colonias e incluso movemento de individuos para a formación doutras novas. Estas formigas actuarán, así mesmo, coma protección fronte inimigos naturais tanto activamente, repelendo a predadores e parasitoides, como pasivamente, mediante a creación de refuxios nas zonas expostas dos troncos. No ano 2005, no que o número de femias hibernantes foi maior, o nivel de parasitismo foi máis elevado pois unha colonia maior está menos protexida e representa un maior reclamo para os parasitoides (Breton & Addicott, 1992).

Posteriormente redúcense os niveis de capturas tanto de cochinillas como de formigas. A baixada pode ser debida tanto ó descenso das temperaturas medias, o que incrementa o número de días necesarios para acumular os graos-día que completan

unha xeración, distribuíndo as eclosións nun maior rango de días, como ó menor valor nutricional do floema da vide que, menos cargado en aminoácidos libres, diminúe a fecundidade das femias.

A primeiros de outono soe haber un aumento secundario nas capturas, que pode estar ligado ó repunte de aminoácidos libres que ten lugar pola translocación durante a senescencia das follas (Nassar & Kliwer, 1966; Kliwer, 1967). Este patrón de evolución anual é semellante ó que presenta *Eriosoma lanigerum* en maceira. A dinámica poboacional deste áfido presenta fortes picos a principio de tempada, unha importante baixada durante finais de verán e un pequeno repunte ó comezo do outono (Sood & Gupta, 2005).

Nas cintas de captura de cochinillas foi común a captura de individuos de *Tyrophagus putrescentiae*, que nós consideramos como predador, e que Pandey & Johnson (2006) consideran perxudicial para a cría de *Dysmicoccus brevipes*, outra cochinilla algodonosa, pero sen determinar cal é o seu efecto. Estes ácaros, descritos como altamente polífagos, comen nemátodos (Bilgrami & Tahseen, 1992), fungos (Hubert *et al.*, 2004) e ovos (Brust & House, 1988) e adultos (Serpa *et al.* 2004) de diversos insectos. En catividade foron responsables da destrución de postas de ovos en laboratorio e nas cintas gardadas a 4°C ate o seu reconto alimentáronse das cochinillas capturadas. Na cría de *P. citri* en laboratorio as explosións destes ácaros estiveron asociadas con caídas bruscas das poboacións de cochinillas e en moitos casos deron coa desaparición total da poboación. Dado que na cría, mentres as poboacións de ácaros

non foron altas, non se detectaron ataques directos dos ácaros a cochinillas vivas, é probable que o aumento nos ácaros se produza coa alimentación das melazas e cando estas se esgotan se convertan en predadores.

En vista do exposto ate o momento, o mosaicismo na distribución por plantas e a escasa chegada de individuos á parte verde, que é onde se establece contacto entre plantas, indica que o desprazamento activo de cochinillas entre plantas durante o estudo foi baixo. Sen embargo a expansión de *P. citri* na explotación na que se desenvolveu o estudo (Cabaleiro & Segura, 1997, 2006) indica que estas son quen de pasar de planta a planta. Tres mecanismos de movemento pasivo entre plantas aparecen descritos na bibliografía: paso planta-planta mediado polo vento ou por prácticas de cultivo (Sforza *et al.*, 2003; Martínez-Ferrer *et al.*, 2006), paso dende restos de poda ós pés doutras plantas (Bodenheimer, 1951) e dispersión mediada por formigas (Rohrbach *et al.*, 1988).

A transmisión do GLRaV-3 en campo en presenza de *P. citri* tense demostrado bastante máis veloz que na súa ausencia, malia que o nivel de infestación sexa baixo, tanto en cultivo en arxóns coma en emparrado (Cabaleiro & Segura, 1997a; Cabaleiro, comunicación personal). Malia iso, si que se presentan diferencias na velocidade de dispersión en función da condución, sendo máis veloz nos arxóns (Cabaleiro & Segura, 2006). Isto concorda cos nosos datos de chegada de individuos á parte verde, xa que no emparrado é maior a distancia entre as partes lignificadas e o contacto entre plantas se establece mediante as polas do ano.

As baixas taxas de transmisión en laboratorio (Cabaleiro & Segura, 1997b; Golino *et al.*, 2002) contrastan coa alta velocidade de dispersión do virus (Cabaleiro & Segura, 2006) e o baixo grao de infestación dos viñedos (Cabaleiro & Segura, 1997a, 2006; Cid *et al.*, 2006b). Esta diverxencia pode ser debida a subestima da eficiencia transmisora no laboratorio, á subestima do movemento entre plantas ou á presenza mecanismos de transmisión alternativos. As diferencias entre a idade das plantas empregadas, así como as condicións de cría e a manipulación durante os ensaios inflúen na eficacia dos ensaios de transmisión con estes vectores (Posnette & Strickland, 1948). O movemento entre plantas, analizado en este traballo, foi baixo tendo en conta a compoñente activa durante os anos de estudo. O paso entre plantas das cochinillas pode ser maior do revelado polas nosas mostraxes se a compoñente de movemento pasivo é elevada, ou ben se se dan anos de moi altos niveis de infestación. Isto, xunto con algún mecanismo de transmisión aínda non descrito e do que hai máis evidencias (Habibi *et al.*, 1995; Habibi & Nutter, 1997; Cabaleiro & Segura 1997a), podería explicar o importante aumento da incidencia do virus malia que segundo os nosos datos as cochinillas non se movan habitualmente entre plantas.

As accións a realizar para minimizar o paso de cochinillas entre plantas, e en consecuencia minimizar a expansión do GLRaV-3, deberán ir encamiñadas a reducir as poboacións e a evitar os mecanismos propostos para o movemento entre plantas. A redución dos agochos mediante a retirada da casca, sobre todo nas plantas vellas, a

aplicación de auga que parece de grande importancia para aumentar a mortandade das femias hibernantes (Koplow Wies, 2004), así como o emprego de cintas adhesivas, que se propoñen tamén para o control de formigas (Tollerup *et al.*, 2004), entre mediados de xullo e mediados de agosto, cando as migracións de cochinillas son maiores, que dificulten o seu movemento ó longo da planta poden ser de grande utilidade para diminuír a poboación. Por outro lado a recollida dos restos no momento da poda e o establecemento de estratexias de control sobre as formigas deberían reducir o movemento entre plantas e a transmisión do virus.

Bibliografía

- Anónimo (2006) Integrated production of wine in South Africa: Guidelines for farms. In S.A.W.S. Board (ed).
- Arai, T. (1996) Temperature-dependent developmental rate of three mealybug species, *Pseudococcus citriculus* Green, *Planococcus citri* (Risso), and *Planococcus kraunhiae* (Kuwana) (Homoptera: Pseudococcidae) on citrus. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 40 (1), 25-34.
- Asante, S. K., Danthanarayana, W. & Cairns, S. C. (1993) Spatial and temporal distribution patterns of *Eriosoma lanigerum* (Homoptera, Aphididae) on apple. *Environmental Entomology*, 22 (5), 1060-1065.
- Avidov, Z. & Harpaz, I. (1969) Plant pests of Israel. (Jerusalem: Israel University press)
- Ben-Dov, Y. (2007) ScaleNet. Pseudococcidae. Retrieved 17 August 2007 from <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>
- Berlinger, M. J. (1977) The Mediterranean vine mealybug and its natural enemies in Southern Israel. *Pyhytoparasítica*, 5, 3-14.
- Bertamini, M., Zulini, L., Muthuchelian, K. & Nedunchezian, N. (2006) Effect of water defi-

Capítulo 1

- cit on photosynthetic and other physiological responses in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) plants. *Photosynthetica*, 44 (1), 151-154.
- Bilgrami, A. L. & Tahseen, Q. (1992) A Nematode Feeding Mite, Tyrophagus-Putrescentiae (Sarcoptiformis, Acaridae). *Fundamental and Applied Nematology*, 15 (5), 477-478.
- Bodenheimer, F. S. (1951) Citrus entomology in the Middle East. ('s-Gravenhage,: Junk)
- Breton, L. M. & Addicott, J. F. (1992) Density-Dependent Mutualism in an Aphid-Ant Interaction. *Ecology*, 73 (6), 2175-2180.
- Brust, G. E. & House, G. J. (1988) A Study of Tyrophagus-Putrescentiae (Acari, Acaridae) as a Facultative Predator of Southern Corn-Rootworm Eggs. *Experimental & Applied Acarology*, 4 (4), 335-344.
- Buckley, R. C. (1987) Interactions involving plants, homoptera, and ants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 111-135.
- Cabaleiro, C. & Segura, A. (1997a) Field transmission of grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. *Plant Disease*, 81, 283-287.
- Cabaleiro, C. & Segura, A. (1997b) Some characteristics of the transmission of grapevine leafroll associated virus 3 by *Planococcus citri* Risso. *European Journal of Plant Pathology*, 103 (4), 373-378.
- Cabaleiro, C. & Segura, A. (2006) Temporal analysis of grapevine leafroll associated virus 3 epidemics. *European Journal of Plant Pathology*, 114 (4), 441-446.
- Calatayud, P. A., Tertuliano, M. & Leru, B. (1994) Seasonal-changes in secondary compounds in the phloem sap of cassava in relation to plant genotype and infestation by *Phenacoccus manihoti* (Homoptera: Pseudococcidae). *Bulletin of Entomological Research*, 84 (4), 453-459.
- Calatayud, P. A., Polania, M. A., Seligmann, C. D. & Bellotti, A. C. (2002) Influence of water-stressed cassava on *Phenacoccus herreni* and three associated parasitoids. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 102 (2), 163-175.
- Carballeira, A., Devesa, C., Retuerto, R., Santillán, E. & Uceda, F. (1983) Bioclimatología de Galicia. (La Coruña: Fundación Pedro Barrié de La Maza)
- Cid, M., Pereira, S., Segura, A. & Cabaleiro, C. (2006a) Seguimiento de la población de *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae) en un viñedo de las Rías Baixas (Galicia). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 32 (3), 339-344.
- Cid, M., Pereira, S., Gago, P., Couceiro, C., Cabaleiro, C. & Segura, A. (2006b) *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae) as GLRaV-3 vector. Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3 - 7 April 2006. South African Society for Enology and Viticulture, 252-253.
- Cid, M., Pereira, S., Cabaleiro, C., Faoro, F. & Segura, A. (2007) Presence of *Grapevine leafroll-associated virus 3* in primary salivary glands of the mealybug vector *Planococcus citri* suggests a circulative transmission mechanism. *European Journal of Plant Pathology*, 118 (1), 23-30.
- Daane, K. M. & Williams, L. E. (2003) Manipulating vineyard irrigation amounts to reduce insect pest damage. *Ecological Applications*, 13 (6), 1650-1666.
- Fatzinger, C. W. & Dixon, W. N. (1996) Degree-day models for predicting levels of attack by slash pine flower thrips (Thysanoptera: Phlaeothripidae) and the phenology of female strobilus development on slash pine. *Environmental Entomology*, 25 (4), 727-735.
- Franco, J. C., Suma, P., da Silva, E. B., Blumberg, D. & Mendel, Z. (2004) Management strategies of mealybug pests of citrus in Mediterranean countries. *Phytoparasitica*, 32 (5), 507-522.
- Geiger, C. A. & Daane, K. M. (2001) Seasonal movement and distribution of the grape mealybug (Homoptera : Pseudococcidae): Developing a sampling program for San Joaquin Valley vineyards. *Journal of Economic Entomology*, 94 (1), 291-301.
- Golino, D. A., Sim, S. T., Gill, R. & Rowhani, A. (2002) California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. *California Agriculture*, 56, 196-201.
- Gullan, P. J. & Kosztarab, M. (1997) Adaptations in scale insects. *Annual Review of Entomology*, 42, 23-50.
- Habili, N. & Nutter, F. W. (1997) Temporal and spatial analysis of *grapevine leafroll-associated virus 3* in Pinot Noir grapevines in Australia. *Plant Disease*, 81 (6), 625-628.

- Habili, N., Fazeli, C. F., Ewart, A., Hamilton, R., Cirami, R., Saldarelli, P., Minafra, A. & Rezaian, M. A. (1995) Natural spread and molecular analysis of *Grapevine Leafroll-Associated Virus-3* in Australia. *Phytopathology*, 85 (11), 1418-1422.
- Helms, K. R. & Vinson, S. B. (2002) Widespread association of the invasive ant *Solenopsis invicta* with an invasive mealybug. *Ecology*, 83 (9), 2425-2438.
- Hubert, J., Jarosik, V., Mourek, J., Kubatova, A. & Zdarkova, E. (2004) Astigmatid mite growth and fungi preference (Acari: Acaridida): Comparisons in laboratory experiments. *Pedobiologia*, 48, 205-214.
- Itioka, T. & Inoue, T. (1996) Density-dependent ant attendance and its effects on the parasitism of a honeydew-producing scale insect, *Ceroplastes rubens*. *Oecologia*, 106 (4), 448-454.
- Itioka, T. & Inoue, T. (1996) The consequences of ant-attendance to the biological control of the red wax scale insect *Ceroplastes rubens* by *Anicetus beneficus*. *Journal of Applied Ecology*, 33 (3), 609-618.
- Itioka, T. & Inoue, T. (1996) The role of predators and attendant ants in the regulation and persistence of a population of the citrus mealybug *Pseudococcus citriculus* in a Satsuma orange orchard. *Applied Entomology and Zoology*, 31 (2), 195-202.
- Jones, C. G. & Coleman, J. S. (1991) Plant stress and insect herbivory: toward an integrated perspective. (In W.E.W. H. A. Mooney, and E. J. Pell (ed) *Response of Plants to Multiple Stresses* (pp. 249-280). San Diego, California: Academic Press, Inc.)
- Kliewer, W. M. (1967) Annual cyclic changes in the concentration of free amino acids in grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 18 (3), 126-137.
- Koplow Wies, C. E. (2004) Monitoreo y control físico de chanchitos blancos (*Pseudococcus viburni* (Signoret)) en vid. Antecedentes para el manejo integrado *Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal*. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile, pp. 58.
- Koricheva, J., Larsson, S. & Haukioja, E. (1998) Insect performance on experimentally stressed woody plants: A meta-analysis. *Annual Review of Entomology*, 43, 195-216.
- Laflin, H. M. & Parrella, M. P. (2004) Developmental biology of citrus mealybug under conditions typical of California rose production. *Annals of the Entomological Society of America*, 97 (5), 982-988.
- Lucas Espadas, A. (2002) Comportamiento de melazo (*Pseudococcus citri* Risso) en uva de mesa en la Región de Murcia. Alternativas de control biológico. *Phytoma-España*, 138, 28-36.
- Martelli, G. P. & Boudon-Padieu, E. (2006) Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine: Bibliographic report 1998-2004. (Bari: CIHEAM)
- Martinez-Ferrer, M. T., Ripolles, J. L. & Garcia-Mari, F. (2006) Enumerative and binomial sampling plans for citrus mealybug (Homoptera : Pseudococcidae) in citrus groves. *Journal of Economic Entomology*, 99 (3), 993-1001.
- Martínez-Ferrer, M. T., García-Marí, F. & Ripolles, J. L. (2003) Population dynamics of *Planococcus citri* Risso (Homoptera: Pseudococcidae) in citrus groves in Spain. *IOBC wprs Bulletin*, 26 (6), 149-161.
- Mattson, W. & Haack, R. (1987) The role of drought in the outbreak of the plant-eating insects. *Bioscience*, 37, 110-118.
- Nassar, A. R. & Kliewer, W. M. (1966) Free amino acids in various parts of *Vitis vinifera* at different stages of development. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 89, 281-294.
- Pandey, R. R. & Johnson, M. W. (2006) Enhanced production of pink pineapple mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Homoptera : Pseudococcidae). *Biocontrol Science and Technology*, 16 (4), 389-401.
- Posnette, A. F. & Strickland, A. H. (1948) Virus Diseases of Cacao in West Africa .3. Technique of Insect Transmission. *Annals of Applied Biology*, 35 (1), 53-63.
- Rohrbach, K. G., Beardsley, J. W., German, T. L., Reimer, N. J. & Sanford, W. G. (1988) Mealybug wilt, mealybugs, and ants on pineapple. *Plant Disease*, 72 (7), 558-565.
- Rosciglione, B. & Castellano, M. A. (1985) Further evidence that mealybugs can transmit *grapevine virus A* (GVA) to herbaceous host. *Phytopathologia Mediterranea, (Proceedings 8th Meeting ICVG, Bari, Italy, 1984)* 24, 186-188.

Capítulo 1

- Ruiz Castro, A. (1965) Plagas y enfermedades de la vid. (Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agronomicas)
- Sagarra, L. A., Vincent, C., Peters, N. F. & Stewart, R. K. (2000) Effect of host density, temperature, and photoperiod on the fitness of *Anagyrus kamali*, a parasitoid of the hibiscus mealybug *Maconellicoccus hirsutus*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 96 (2), 141-147.
- Serpa, L. L. N., Franzolin, M. R., Barros-Battesti, D. M. & Kakitani, I. (2004) *Tyrophagus putrescentiae* predando insetos adultos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em laboratório. *Revista De Saude Publica*, 38 (5), 735-737.
- Sforza, R., Boudon-Padieu, E. & Greif, C. (2003) New mealybug species vectoring Grapevine leafroll-associated viruses-1 and -3 (GLRaV-1 and -3). *European Journal of Plant Pathology*, 109, 975-981.
- Sood, A. & Gupta, P. R. (2005) Studies on seasonal abundance of woolly apple aphid and its natural enemies in the mid hills of Himachal Pradesh. *ISHS Acta Horticulturae*, 696 (Part Two), 395-398.
- Tollerup, K. E., Rust, M. K., Dorschner, K. W., Phillips, P. A. & Klotz, J. H. (2004) Low-toxicity baits control ants in citrus orchards and grape vineyards. *California Agriculture*, (October-December), 213-217.
- Trichilo, P. J., Wilson, L. T. & Grimes, D. W. (1990) Influence of irrigation management on the abundance of leafhoppers (Homoptera, Cicadellidae) on grapes. *Environmental Entomology*, 19 (6), 1803-1809.
- Varela, L., Smith, R., Battany, M. & Bentley, W. (2006) Grape, Obscure or Vine - Which mealybug is it; why should you care? *Practical Winery and Vineyard*, XXVII (6), 37-46.
- Walton, V. M. & Pringle, K. L. (2004a) A survey of mealybugs and associated natural enemies in vineyards in the Western Cape province, South Africa. *South african journal for enology and viticulture*, 25 (1), 23-25.
- Walton, V. M. & Pringle, K. L. (2004b) Vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera:Pseudococcidae), a key pest in south african vineyards. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 25 (2), 54-62.
- Walton, V. M., Daane, K. M. & Pringle, K. L. (2004) Monitoring *Planococcus ficus* in South African vineyards with sex pheromone-baited traps. *Crop Protection*, 23 (11), 1089-1096.
- White, T. C. R. (1984) The abundance of invertebrate herbivores in relation to the availability of nitrogen in stressed food plants. *Oecologia*, 63 (1), 90-105.

Presence of *Grapevine leafroll-associated virus 3* in primary salivary glands of the mealybug vector *Planococcus citri* suggests a circulative transmission mechanism

Miguel Cid · Sonia Pereira · Cristina Cabaleiro · Franco Faoro · Antonio Segura

Received: 17 July 2006 / Accepted: 18 December 2006
© KNPV 2007

Abstract *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) is a mealybug-transmissible ampelovirus. Though the transmission mechanism has been described as semipersistent on the basis of temporal parameters, definitive proof of this mechanism has never been provided. In the present study, we carried out preliminary assays to establish the location of the virus in its vector, *Planococcus citri*. After dissecting the insects, GLRaV-3 was detected by means of IC-RT-PCR in the salivary glands, intestine and Malpighian tubes, but not in the sucking apparatus. Immunogold labelling of the capsid protein revealed the presence of the virus in some cells of the primary salivary glands, but not in the alimentary channel of the stylet, or in the accessory salivary glands. The strong labelling of the electron-dense secretion vesicles in some cells of the primary

salivary glands, together with the non-detection of the virus in the sucking apparatus suggests that the transmission mechanism may be different from that previously described. We propose a circulative transmission mechanism based on a specific transportation route for the viral particles from the midgut or hindgut to the salivary glands. As the transmission mechanism is generally a common feature of a viral genus, the existence of a circulative transmission mechanism for other mealybug-transmitted ampeloviruses is expected. Organ by organ analysis of GLRaV-1, another ampelovirus not transmissible by *P. citri*, showed the absence of the virus in the salivary glands, thus providing further, though indirect, evidence in favour of circulative transmission for this virus genus.

Keywords Ampelovirus · Citrus mealybug · GLRaV-3 · *Grapevine leafroll* · Semipersistent transmission

M. Cid (✉) · S. Pereira · A. Segura
Dpto. de Fisiología Vexetal. Facultade de Biología,
Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de
Compostela 15782, Spain
e-mail: ghuises@usc.es

C. Cabaleiro
Dpto. de Producción Vexetal. Escola Politécnica
Superior, Universidade de Santiago de Compostela,
Lugo 27002, Spain

F. Faoro
Istituto di Virologia Vegetale, Sezione di Milano,
Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Celoria 2,
Milano 20133, Italy

Introduction

The order Hemiptera includes most insect vectors of plant viruses. Whiteflies (Family Aleyrodidae), leafhoppers (F. Cicadellidae), planthoppers (Superfamily Fulgoroidea that includes eight families), aphids (F. Aphididae), mealybugs (F. Pseudococcidae) and scale insects

(F. Coccidae) are the most important in terms of number of vector species and number of viruses transmitted (Nault, 1997). At least 21 species of mealybugs transmit plant viruses belonging to three genera of viruses: *Badnaviruses*, *Ampeloviruses* and *Vitivirus* (Lockhart & Olszewski, 1999; Martelli et al., 2002; Adams et al., 2004).

Among grapevine virus diseases, leafroll is the most widespread throughout the world, and the economic importance of one of its associated viruses, *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), has been reported for many cultivars in different countries. GLRaV-3 is a phloem-limited virus which occurs in companion cells and in sieve tube elements of diseased plants, in which it typically induces vesiculations in mitochondria (Faoro, Tornaghi, Cinquanta, & Belli, 1992). The known hosts are all woody plants that are members of the genus *Vitis*. As regards other leafroll associated viruses, the main method of transmission is via grafting of infected material. Several species of mealybugs—*Heliococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris*, *Planococcus citri*, *Planococcus ficus*, *Pseudococcus calceolariae*, *Pseudococcus comstocki*, *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus maritimus*, *Pseudococcus viburni* (Rosciglione & Gugerli, 1986; Engelbrecht & Kasdorf, 1990; Cabaleiro & Segura, 1997b; Petersen & Charles, 1997; Golino, Sim, Gill, & Rowani, 2002; Nakano, Nakaune, & Komazaki, 2003; Sforza, Boudon-Padieu, & Greif, 2003)—and one scale insect—*Pulvinaria vitis* (Belli et al., 1994)—are vectors of this virus. In all cases, the transmission mechanism remains unclear. Nevertheless, studies carried out to date to characterize transmission of ampeloviruses indicate a semipersistent transmission mechanism, on the basis of loss of infectivity and the acquisition times involved (Cabaleiro & Segura, 1997a; Krüger, Saccaggi, & Douglas, 2006). In spite of the lack of conclusive experimental evidence it was then generally assumed that transmission of GLRaV-3 and other members of the *Ampelovirus* genus is semipersistent (Martelli et al., 2002). Although GLRaV-1 is phylogenetically close to GLRaV-3 (Martelli et al., 2002), it has different vectors. Only the mealybugs *Phenacoccus aceris* and *Heliococcus bohemicus* (Sforza et al., 2003) can transmit both ampeloviruses. Golino et al. (2002) demonstrated that this virus species is not transmitted by *P. citri*.

The most widely used method for determining the presence of virions in vectors is by analysis of whole individuals. However, the increased sensitivity provided by PCR-based techniques has made possible the detection of virus in non-vector insects (Olmos, Bertolini, Gil, & Cambra, 2005). Assays of loss and acquisition of potential infectivity with entire insects are no longer considered reliable. In the present study, we attempted to detect GLRaV-3 and GLRaV-1 in different organs of *P. citri* to elucidate the mechanisms of transmission of leafroll by mealybugs.

Materials and methods

Plants and mealybugs

The plant material used was adult leaves from potted plants of known virus status, clones of plants maintained in the *Escola Politécnica Superior de Lugo*. Depending on the assay, the clones used were: C1 (cv. Albariño infected with GLRaV-3); CF+C1 (cv. Cabernet franc graft-infected with GLRaV-3); and A1, (cv. Albariño infected with GLRaV-1). The plants were maintained in a growth chamber at 25°C with a photoperiod of 16 h light, 8 h darkness. Specimens of *P. citri*, obtained from a vineyard where leafroll transmission has been demonstrated (Cabaleiro & Segura, 1997b), were reared on potato sprouts or pumpkins for several generations at 25°C in darkness.

Virus acquisition

The mealybugs were fed on leaves from clones C1, CF+C1 or A1 maintained in humid chambers at room temperature with the petiole inserted in a tube containing liquid culture medium (MS 1/2, Murashige & Skoog, 1962). In the first assay the mealybugs were maintained on leaves of CF+C1 or C1 for 10 or more days. In the second assay, immature adult mealybugs were maintained on clone CF+C1 or C1 for 7 days and only mealybugs that were still feeding after seven days were selected for analysis. For GLRaV-1, immature adult mealybugs were allowed to feed on clone

A1 for 7 days. The negative control consisted of mealybugs feeding on potato sprouts. In the immunogold labelling assays to determine virus location, the immature adult mealybugs were allowed to feed for five days on the leaves of CF+C1 plants.

Mealybug dissection and organ analysis

Mealybugs with the stylet clearly inserted were carefully removed from the leaves where they were feeding. After waiting until the stylet was retracted, the insects were fixed and maintained in FAE (ethanol 50%, formaldehyde 35%, acetic acid, 18:1:1) until dissection. Immediately before dissection, the mealybugs were dried and fixed onto slides with nail varnish. The mealybugs were then dissected, under a stereo microscope, in a drop of distilled water, with two entomological needles. The following parts were separated: intestine (midgut and hindgut), Malpighian tubes, mouth apparatus (comprising labium, stylet, and the alimentary channel from the stylet to the end of the oesophagus), reproductive system, suboesophageal ganglion, salivary glands and bacteriome. The body remains of each insect dissected were kept for later analysis. Analysis for the presence of the virus was performed by IC-CT-PCR. Microtubes for PCR (0.2 ml) were coated with 50 µl of commercial antibodies specific for GLRaV-3 or GLRaV-1 (Bioreba AC, Switzerland) diluted at 1:500 in coating buffer for 4 h at 37°C or overnight at 4°C. The tubes were washed three times for 3 min, and incubated with 50 µl of organ extract for 4 h at 37°C or overnight at 4°C. The extracts were obtained by grinding each organ with 75 µl of commercial grapevine extraction buffer (Bioreba, AG). The tubes were washed in the same way and kept for 15 min at 65°C to release the nucleic acids (Moury, Cardin, Onesto, Candresse, & Poupet, 2000). The reagents for one-step RT-PCR (cMasterTM RTplusPCR System, Eppendorf) were then added, using the primers proposed by Minafra & Hadidi (1994) for GLRaV-3 (C547 and H229), or those proposed by Good & Monis (2001) for GLRaV-1 (GSP3 and GSP4). The established cycles, performed in a Biorad iCycler, were: for GLRaV-1, one cycle at 50°C for 30 min and 94°C for 2 min, 40 cycles at 94°C for 30 s,

60°C for 30 s and 68°C for 20 s, and one final extension cycle at 68°C for 10 min; for GLRaV-3, one cycle at 50°C for 30 min and 94°C for 2 min, 40 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 30 s, and one final extension cycle at 72°C for 10 min. Aliquots of the PCR products were stained with SYBR Green and analysed by electrophoresis in 1% agarose gels.

Transmission electron microscopy (TEM) and immunogold labelling

Immature adult mealybugs were carefully removed from leaves of CF+C1 while they had the stylet still inserted. After waiting for the stylet to be retracted, the insects were washed with commercial dishwashing liquid (Mistol, Henkel Iberica) at 50% in distilled water and then rinsed in distilled water and dried. While keeping the mealybugs in a drop of fixative (paraformaldehyde 4%, glutaraldehyde 0.3% in phosphate buffer 0.1M, pH 7.4) and, with the aid of a stereo microscope, some cuts were made on the lateral part of the body to favour penetration of the fixative. The mealybugs were then kept in the same fixative for 2 h at 4°C and later dehydrated by immersion in a series of ethanol solutions (25, 50, 75, 90 and 100%). Finally the insects were embedded in London Resin White (LRW), as previously described (Faoro, Tornaghi, & Belli, 1991). Ultra-thin sections were labelled with a primary polyclonal serum anti-GLRaV-3 (1:100 and 1:1000) or a pre-immune serum as the negative control, and post-labelled with a goat anti-rabbit colloidal gold conjugate of 20 nm (BioCell, UK), as detailed in Faoro et al. (1991). Sections were then stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Jeol 100SX (Japan) transmission electron microscope.

Results

GLRaV-3 and GLRaV-1 detection in *Planococcus citri* organs

After a minimum of 10 days of AAT (acquisition access time), GLRaV-3 was detected, in the first assay, in all salivary glands analysed and also in all

the midguts, hindguts and Malpighian tubes tested all together. The virus was also detected in the bacteriome (3/3), in the reproductive apparatus (2/3), in the suboesophageal ganglion (2/5), in the mouth apparatus (1/5) and always in the body remains of the mealybugs (4/4). In the second assay, GLRaV-3 was always detected in the midgut and hindgut (5/5), in all but one case in the salivary glands and in the Malpighian tubes (4/5) and, in 2 out of 5 cases, in the body remains. The virus was not detected in the ganglion, sucking apparatus, reproductive system or bacteriome. All organs originating from the three mealybugs feeding on potato sprouts were negative for GLRaV-3. Analysis results of the organs from mealybugs allowed to feed on leaves infected with GLRaV-1, were very different from those that had fed on GLRaV-3 infected ones. In fact, GLRaV-1 was detected only in the midgut and hindgut and in the Malpighian tubes and never in the salivary glands of all the examined insects. In

2 out of 5 mealybugs the virus was detected in the reproductive system and in one mealybug in the body parts remaining after dissection. GLRaV-1 was never detected in any organ of the three mealybugs feeding on potato sprouts.

Localization of GLRaV-3 in mealybugs by immunogold labelling and TEM

After applying antibody against GLRaV-3, diluted 1:100, intense specific gold labelling was observed only in part of the primary salivary gland cells, but not in the accessory glands. No labelling was detected in the nearby muscle fibres or in the haemocoel. The negative control, incubated in pre-immune serum, showed only a light background of unspecific labelling, uniformly distributed over all of the different organs (Fig. 1a), including both primary and accessory salivary glands. No labelling was detected in the alimentary channel of the stylet, although the

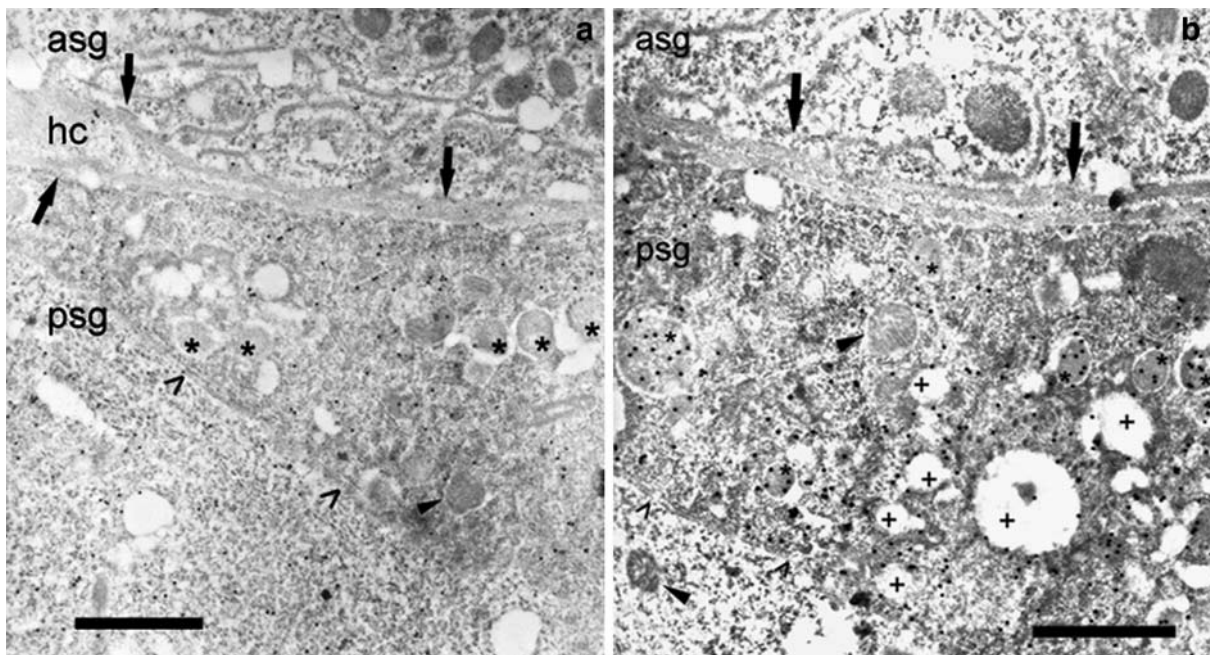


Fig. 1 Immunogold labelling of the coat protein of GLRaV-3 in *Planococcus citri*. (a) Negative control with preimmune serum of the accessory (asg) and primary (psg) salivary glands. The labelling is light and unspecific (bar = 1 µm); (b) Accessory and primary salivary glands. The accessory gland, unlabelled, is separated by the two basal lamina (arrow) from the primary gland. In the

primary salivary gland a labelled cell (at the centrum) and a clearly unlabelled cell (at the bottom separated by the cytoplasmic membrane (>) are recognizable. The central cell has strongly labelled electrondense vesicles (*), electrolucent vesicles (+) few labelled and non-vesiculated mitochondria (arrowhead) (bar = 1 µm); hc = hemocoel

stylet walls and the mealybug cuticle showed labelling, possibly due to the affinity of chitin fibrils for antibodies, as observed in many other cases (F. Faoro, Istituto di Virologia Vegetale, CNR, Italy, pers. comm.). The accessory salivary glands (Fig. 1b) showed numerous large electron-dense secretion vesicles inside the cytoplasm. These corresponded to the description by Ponsen (1972) for *Myzus persicae* accessory glands. No labelling was observed in these glands when the antibody against GLRaV-3 was used.

In the primary salivary glands two cell types were observed: one with electron-dense cytoplasm and another with electron-transparent cytoplasm (Fig. 1b). The former showed large nuclei, and numerous electron-dense vesicles possibly containing proteinaceous material. These vesicles were heavily labelled by the anti-GLRaV-3 serum, although some labelling was also present in the cytoplasm but not in the nucleus or in the mitochondria. Another type of vesicle, usually larger than the above and almost completely electron transparent, was unlabelled (Fig. 1b). The cells with electron transparent cytoplasm contained both types of the above vesicles. However neither these vesicles or the surrounding cytoplasm were labelled (Fig. 1b).

We did not observe the typical viral bundles, or the mitochondrial vesiculations present in infected grapevine plants and where virus replication takes place (Faoro & Carzaniga, 1995).

Discussion

In the case of semipersistent transmission, the virus would specifically bind to the stylet alimentary channel or the foregut epicuticle (Ammar, Järlfors, & Pirone, 1994). However, we did not detect the virus, by IC-RT-PCR, in samples formed by the stylet and foregut and did not find any immunogold labelling in the stylet alimentary channel. Taken all together, these results provide evidence refuting the hypothesis of semipersistent transmission.

Detection of virus in the different organs may be explained in different ways. In the suboesophageal ganglion, separated by the perineural space, the presence of virus particles is explained

only by the existence of an active entry mechanism or by contamination during the dissection process, which appears to be the most likely explanation. Detection of virus inside the bacteriome, the sucking apparatus or the body remains, can be attributed to the presence of virus from the haemolymph, as these organs are entirely suffused in the haemolymph, or to the contamination during the dissection process. Finally, the presence of virions in the reproductive system could be explained by the permanence of the haemolymph between the follicles, or by contamination with part of the hindgut during dissection, or because both organs share a common outlet.

Detection of virus by IC-RT-PCR in the salivary glands implies the presence of the whole virion, as the technique allows the detection of protein-bound RNA. Transportation of the virion from the gut (where it is also found) to the salivary glands via the haemolymph should have then taken place. This type of transport in other hemiptera is possible because of the protection against the attack of the haemolymph by chaperonin GroEL homologues, synthesized by insect endosymbionts (Van Der Heuvel et al., 1997; Morin et al., 1999). Binding between virus and GroEL homologues occurs in many plant viruses (mainly luteoviruses and begomoviruses) and GroEL is synthesized both by endosymbionts of vector and non-vector insects as well as by *Escherichia coli* (Van Der Heuvel et al., 1997; Akad, Dotan, & Czosnek, 2004). Like other filamentous plant viruses, GLRaV-3 does not bind the GroEL homologue of *E. coli* (Akad et al., 2004). The assumed lack of protection of GroEL synthesized by the β -endosymbionts (Baumann, Thao, Hess, Johnson, & Baumann, 2002) means that the virus cannot escape destruction in the mealybug haemolymph. Thus, the amount of virus in the haemolymph will decline rapidly.

The route from the gut to the salivary glands includes three barriers that ensure the specificity of the transportation. The first is the gut epithelium and the second and third are the basal lamina and the plasmalemma of the salivary glands. (Peiffer, Gildow, & Gray, 1997). The likelihood of the IC-RT-PCR detected virions being absorbed in the basal lamina of the salivary

glands without penetrating can be discounted for two main reasons: (i) the coat protein is located specifically inside one part of the primary salivary gland cells; (ii) intense labelling of the basal layer of the salivary glands was never detected. Rather, the strong labelling in the salivary gland, in comparison with other insect organs, suggests specific transportation of virus to the gland. Furthermore, the specific presence of the virus in a certain part of the salivary glands indicates that these organs function differently, depending on the compartment considered. When present, labelling in a gland cell was quite uniformly distributed inside the cytoplasm and in the electrodense vesicles. However, the highest intensity of labelling was observed in the electrodense vesicles that form the saliva. Thus, the virions would be ready to be secreted and injected inside the plant during feeding.

In contrast, GLRaV-1 was not detected by IC-RT-PCR in the salivary glands or in other organs but only in the intestine and inside the Malpighian tubes, which are directly connected to the intestine. Detection of the virus in the reproductive system and body remains is probably due to contamination during dissection because of the rupture of the hindgut, which is extremely fragile. These results are consistent with those obtained in previous acquisition assays (Cabaleiro, unpublished data) and with unsuccessful transmission assays (Golino et al., 2002) of GLRaV-1 by *P. citri*. It therefore appears that a specific recognition and translocation mechanism, such as that described for GLRaV-3, does not exist for GLRaV-1, at least in *P. citri*. Considered all together, the present results indicate that transmission of GLRaV-3 by *P. citri* is circulative, although further studies are required to prove this.

The temporal parameters used to distinguish semipersistent and circulative transmissions are the existence or otherwise of a latency period and the duration of the infectivity retention period. However, the latency period is impossible to measure if the exact moment when feeding starts in the phloem is not established. Previous analysis of the feeding behaviour of *P. citri* on plants of cv. Cabernet franc, with the Electrical Penetration Graph (EPG) technique, indicated that

feeding in the phloem started after more than 15 h (unpublished data), although it is not unusual for mealybugs to spend many hours with the stylet inserted into the xylem. Thus, if it is not known exactly when suction from the phloem starts, it is impossible to determine the time between acquisition and inoculation of the virus. The study of infectivity retention is also impaired by the alimentary behaviour of the mealybugs. It is difficult to determine how long mealybugs have fed without acquiring the virus at the time they are removed from the infected leaves. In previous studies, one involving *P. citri* feeding for 3–4 days on healthy leaves (Cid et al., 2006) and another involving *Planococcus ficus* feeding for 8 days on a non-host (Krüger et al., 2006), the virus was not detected by RT-PCR in whole mealybugs. These retention periods are shorter than those described for luteovirus circulative transmission by aphids (Gray & Gildow, 2003). This discrepancy may be due to the inability of GLRaV-3 to bind to GroEL, as the retention of non-binding mutants of luteovirus is shorter than wild-type and binding mutant virus, and 120 h post-injection the total amount of virus present was still 10% and 67% respectively (Van Der Heuvel et al., 1997). Thus the short retention period, evidence of non-circulative transmission, would correspond with a circulative non-GroEL-binding transmission.

Finally, virus bundles or replication sites were not detected in the mealybugs, and therefore it is likely that virus does not replicate in the insects (non-propagative transmission). This is consistent with the retention time because after 96 h feeding on healthy leaves the virus is not detected by IC-RT-PCR inside mealybugs (Cid et al., 2006). Since the transmission mechanism is usually a genera-distinctive characteristic (Nault, 1997), the transmission of other ampeloviruses may be similar to that proposed here for GLRaV-3.

Acknowledgements This study was partially funded by the European Regional Development Fund and the *Ministerio de Ciencia y Tecnología* through project AGL2002-02438 and *Xunta de Galicia* through project PGIDIT 2003/PX112. Some of the assays were carried out at the *CNR, Istituto di Virologia Vegetale, Sezione di Milano* thanks to a grant from the *Universidade de Santiago de Compostela* and the European Social Fund.

References

- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Martelli, G. P., Milne, R. G., & Fauquet, C. M. (2004). The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*, *149*, 1045–1060.
- Akad, F., Dotan, N., & Czosnek, H. (2004). Trapping of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and other plant viruses with a GroEL homologue from the whitefly *Bemisia tabaci*. *Archives of Virology*, *149*, 1481–1497.
- Ammar, E. D., Järlfors, U., & Pirone, T. P. (1994). Association of potyvirus helper component protein with virions and the cuticle lining the maxillary food canal and foregut of an aphid vector. *Phytopathology*, *84*, 1054–1060.
- Baumann, L., Thao, M. L., Hess, J. M., Johnson, M. W., & Baumann, P. (2002). The genetic properties of the primary endosymbionts of mealybugs differ from those of other endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 3198–3205.
- Belli, G., Fortusini, A., Casati, P., Belli, L., Bianco, P. A., & Prati, S. (1994). Transmission of a grapevine leafroll associated closterovirus by the scale insect *Pulvinaria vitis* L. *Rivista di Patologia Vegetale*, *4*, 105–108.
- Cabaleiro, C., & Segura, A. (1997a). Some characteristics of the transmission of *Grapevine leafroll associated virus 3* by *Planococcus citri* Risso. *European Journal of Plant Pathology*, *103*, 373–378.
- Cabaleiro, C., & Segura, A. (1997b). Field transmission of *Grapevine leafroll associated virus 3* (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. *Plant Disease*, *81*, 283–287.
- Cid, M., Pereira, S., Gago, P., Couceiro, C., Cabaleiro, C., & Segura, A. (2006). *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae) as GLRaV-3 vector. Extended abstracts 15th Meeting International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine, 2006. Stellenbosch, South Africa, 253–254.
- Engelbrecht, D. J., & Kasdorf, G. G. F. (1990). Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the mealybug *Planococcus ficus*. *Phytophylactica*, *22*, 341–346.
- Faoro, F., & Carzaniga, R. (1995). Cytochemistry and immunocytochemistry of the inclusion bodies induced by grapevine leafroll-associated closteroviruses GLRaV-1 and GLRaV-3. *Rivista di Patologia Vegetale*, *5*, 85–94.
- Faoro, F., Tornaghi, R., & Belli, G. (1991). Localization of closteroviruses on grapevine thin sections and their identification by immunogold labelling. *Journal of Phytopathology*, *133*, 297–306.
- Faoro, F., Tornaghi, R., Cinquanta, S., & Belli, G. (1992). Cytopathology of grapevine leafroll associated virus III (GLRaV-III). *Rivista di Patologia Vegetale*, *2*, 67–83.
- Golino, D. A., Sim, S. T., Gill, R., & Rowani, A. (2002). California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. *California Agriculture*, *56*(6), 196–201.
- Good, X., & Monis, J. (2001). Partial genome organization, identification of the coat protein gene, and detection of *Grapevine leafroll-associated virus-5*. *Phytopathology*, *91*, 274–281.
- Gray, S., & Gildow, F. E. (2003). Luteovirus-aphid interactions. *Annual Review of Phytopathology*, *41*, 539–566.
- Krüger, K., Saccaggi, D., & Douglas, N. (2006). *Grapevine leafroll-associated virus 3*-vector interactions: Transmission by the mealybugs *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudococcidae). Extended abstracts 15th Meeting International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine, 2006. Stellenbosch, South Africa, 130–131.
- Lockhart, B. E., & Olszewski, N. E. (1999). Badnaviruses. In Granoff A., & Webster R.G. (Eds.), *Encyclopedia of virology*. 2nd edn. (1296–1299) San Diego, Academic Press.
- Martelli, G. P., Agranovsky, A. A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R. H. A., Dolja, V. V., Falk, B. W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A. V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H. J., Wisler, G. C., & Yoshikawa, N. (2002). The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology*, *147*(10), 2039–2044.
- Minafra, A., & Hadidi, A. (1994). Sensitive detection of *Grapevine virus A*, *B* or *Leafroll associated III* from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of Virological Methods*, *47*, 175–188.
- Morin, S., Ghanim, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Verbeek, M., & van den Heuvel, F. J. M. (1999). A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology*, *25*, 75–84.
- Moury, B., Cardin, L., Onesto, J. -P., Candresse, T., & Poupet, A. (2000). Enzyme-linked immunosorbent assay testing of shoots grown *in vitro* and the use of immunocapture-reverse transcription-polymerase chain reaction improve the detection of *Prunus necrotic ringspot virus*. *Phytopathology*, *90*, 522–528.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*, 473–497.
- Nakano, M., Nakaune, R., & Komazaki, S. (2003). Mealybug transmission of grapevine viruses in Japan. Extended abstracts 14th Meeting International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine, 2003. Locorotondo, Bari, Italy, 218.
- Nault, L. R. (1997). Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America*, *90*(5), 521–541.
- Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M., & Cambra, M. (2005). Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, *128*, 151–155.
- Peiffer, M. L., Gildow, F. E., & Gray, S. M. (1997). Two distinct mechanisms regulate luteovirus transmission efficiencies and specificity at the aphid salivary gland. *Journal of General Virology*, *78*, 495–503.

- Petersen, C. L., & Charles, J. G. (1997). Transmission of grapevine leafroll-associated closterovirus by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. *Plant Pathology*, 46, 509–515.
- Ponsen, M. B. (1972). The site of *Potato leafroll virus* multiplication in its vector, *Myzus persicae*. Mededelingen Landbouwhogeschool 72–16. Wageningen, The Netherlands.
- Rosciglione, B., & Gugerli, P. (1986). Maladies de l'enroulement et du bois strié de la vigne: analyse microscopique et sérologique. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture*, 18(4), 207–211.
- Sforza, R., Boudon-Padiou, E., & Greif, C. (2003). New mealybug species vectoring *Grapevine leafroll-associated viruses-1* and *-3* (GLRaV-1 and -3). *European Journal of Plant Pathology*, 109, 975–981.
- Van Der Heuvel, J. F. J. M., Bruyère, A., Hogenhout, S. A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., Van Der Wilk, F., Richards, K. (1997). The N-terminal region of the luteovirus read through domain determines virus binding to *Buchnera* GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *Journal of Virology*, 71(10), 7258–7265.

Caracterización mediante EPG dos patróns de onda e o comportamento alimentar de *Planococcus citri* (Risso) en folla de vide cv. Cabernet franc e en membrana

MIGUEL CID

Resume A cochinilla algodonosa dos cítricos, *Planococcus citri* (Risso), é vector dun certo número de virus vexetais. Os ensaios de transmisión vense entorpecidos polo seu comportamento pausado e críptico. Neste traballo analízase o seu comportamento alimentar mediante a técnica de gráficas eléctricas de penetración (*electrical penetration graphs*) (DC-EPG) tanto alimentándose en folla de vide cv. Cabernet franc infectada co virus 3 do enrolado da vide, GLRaV-3, coma en dieta artificial a través de membrana de Parafilm®. Descríbense os patróns de onda que se correlacionan co comezo de proba e establecemento do contacto eléctrico (A); co avance intercelular (C); coa alimentación en floema (E) que presenta 4 subpatróns (E1, E2I, E2II e E3) dos que E3 está asociado á excreción de melaza; coa alimentación en xilema (G) e coas puncións celulares (pds) que presentan dúas subfases diferenciadas (pd1 e pd2). Outros dous patróns detectados poderían corresponderse cos patróns N descrito para *Planococcus minor* e co patrón H descrito para *Phenacoccus*. Descríbense dous acontecementos que aparecen recorrentemente nos rexistros aínda que non foi posible establecer ningunha correlación con actividades do insecto

e que non foron descritos para outros insectos picador-zugadores; un deles podería corresponderse cun atasco da canle estiletar e o outro foi denominado pseudo-punción celular, polo seu parecido con estas. As puncións celulares son as máis longas das descritas ate o momento de 32,6 segundos de media con dúas fases e que poden presentar longas fases de ruptura de contacto eléctrico, que poden estar relacionadas co contacto con membranas. A análise temporal dos 20 rexistros amosou grande variabilidade entre insectos. Só 11 chegaron a realizar puncións en floema tardando entre 1,3 e 17 horas en facela e permanecendo nel 9,5 horas de media. A maioría (16/20) fixeron algunha punción en xilema onde botaron de media 8,7 horas. Os parámetros temporais descritos van influenciar a capacidade transmisora de virus, tendo en conta que tódolos virus transmitidos por cochinillas están restrinxidos ó floema. É probable que sexa pois o condicionante da baixa taxa de efectividade en ensaios de transmisión.

Palabras chave: GLRaV-3, transmisión, DC-EPG, patróns, comportamento alimentar

Introdución

A cochinillas algodonosa dos cítricos, *Planococcus citri* (Risso), é un insecto altamente polífago, descrito como hospede de 175 xéneros de plantas distintos pertencentes a 74 familias (Ben-Dov, 2007). É praga en diversas froiteiras arbóreas: cítricos (Bodeneheimer, 1951), cacao (Ackonor, 2002); arbustos como o cafeto (Staver *et al.* 2001); lianas como a vide (Ruiz Castro, 1965; Lucas Espadas, 2002; Cid *et al.*, 2006); e un grande número de ornamentais e hortícolas, principalmente cultivadas en invernadoiro (Brødsgaard & Albajes, 2000; Laflin & Parrilla, 2004). Como o resto de cochinillas algodonosas son insectos de difícil control debido ó seu comportamento e ó seu corpo cuberto de ceras (Daane *et al.*, 2006; Walton & Pringle, 2004).

Aínda que o seu comportamento é moito máis pausado que o dos áfidos, os principios vectores de virus vexetais (Nault, 1997), as cochinillas algodonosas están descritas como vectores de tres xéneros distintos de virus: Badnavirus (Lockhart & Olszewski, 1994), Vitivirus (Adams *et al.*, 2004) e Ampelovirus (Martelli *et al.*, 2002). Son numerosas as especies vectoras destes virus e unhas cantas entre as que se atopa *Planococcus citri* son quen de transmitirlos case todos (Roivainen, 1980; Cabaleiro *et al.*, 1997a; Lockhart *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 1999; Kubiriba *et al.*, 2001). O mecanismo de transmisión destes virus é complexo para o seu estudio. O feito de afectaren maioritariamente a plantas leñosas, seren virus cunha velocidade de replicación bastante baixa e dado que as

cochinillas son uns vectores pouco eficaces fai dos ensaios de transmisión tarefas longas e complicadas. Se a isto sumamos a incerteza sobre a actividade realizada polos insectos durante a súa alimentación chegar a coñecer mellor o mecanismo de transmisión é case imposible.

Os estudos sobre a transmisión de virus vexetais con outros insectos empregan as gráficas eléctricas de penetración, EPG – *Electrical penetration graphs*– para a descrición do comportamento alimentario dos vectores así como para o estudio do proceso de transmisión mesmo. Este método publicado primeiramente por McLean & Kinsey (1964) presenta dúas variantes, AC-EPG e DC-EPG, que se diferencian polo tipo de corrente empregada, alterna e continua respectivamente, que evolucionaron con sucesivas melloras ate a actualidade (Walker, 2000). O sistema AC-EPG recolle só as flutuacións da resistencia do circuíto mentres que o DC-EPG rexistra as variación de voltaxe debidas tanto as oscilacións na resistencia (R) como ás variación da forza electromotriz (emf). Esta ferramenta permite coñecer a localización do extremo distal dos estiletos dos insectos picador-zugadores, así como saber que actividade están realizando. Debido á dificultade de traballar con cochinillas (Posnette & Strickland, 1948) e a que os virus transmitidos por estas non causa os mesmos perxuizos que os transmitidos mediante pulgóns, o seu comportamento alimentar foi ata o momento pouco estudado. Os únicos traballos publicados ate o momento (Calatayud *et al.*, 1994, 2001) de caracterización do comportamento alimentario de cochinillas foron realizados con dous *Phenacoccus*: *Ph. herreni* e *Ph. manihoti*. Neles

empregouse o sistema DC-EPG para a comparación dos niveis de resistencia entre cultivares de mandioca e para estudar o efecto que o parasitismo ten sobre o comportamento alimentario das cochinillas. Existe outro estudio realizado de caracterización dos patróns alimentares de *Planococcus minor* en cafeto e ananá que conformou a tese de doutoramento de Santa-Cecilia (2003).

Este traballo pretende caracterizar os patróns de onda asociados coa alimentación de *P. citri*, unha boa ferramenta de cara ós traballos de transmisións de virus por cochinillas algodonosas xa que a maior parte dos virus transmisibles por cochinilla poden ser transmitidos por *P. citri*. O outro obxectivo é estudar os parámetros temporais da alimentación de *P. citri* en vide infectada polo virus 3 enrolado da vide (*Grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3) para entender as diferencias entre a adquisición do GLRaV-3 (Cid *et al.*, 2007) e a súa transmisión (Cabaleiro & Segura 1997b).

Materiais e métodos

Insectos e plantas

Os insectos empregados no estudio forman parte dunha colonia de *Planococcus citri* (Risso) fundada a partir de individuos de poboacións naturais atopadas nun viñado de Bueu, Galicia no noroeste da Península Ibérica, para as que se demostrou a transmisión do virus (Cabaleiro & Segura, 1997a,b). A cría mantívose en laboratorio, sobre patacas brotadas e cabaza sobre unha cama de vermiculita en caixas de plástico con ventilación. Estas foron conservadas en semiescuridade a temperatura ambiente.

Nos rexistros empregáronse follas completamente estendidas e maduras de vide de plantas cv. Cabernet franc infectadas polo virus do enrolado da vide tipo 3 (GLRaV-3), clons obtidos a partir dos exemplares da colección da Escola Politécnica Superior de Lugo. As plantas foron mantidas en invernadoiro con fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuridade.

EPG

Grupos de femias adultas inmaturas foron collidas nas caixas de cría de entre os individuos que non estaban alimentándose. Isto fíxose así debido á dificultade que supón a retirada dos individuos da cría que se atopan alimentándose. Baixo a lupa binocular e sobre unha plataforma forrada con papel selles retiraron as ceras de parte do dorso cun pincel humedecido nunha solución de etanol ó 25% e Triton-X100 ó 1% en auga destilada. Posteriormente deixouse que se secasen completamente nunha caixa de plástico.

As follas de vide foron recollidas e mantidas co pecíolo en auga destilada no interior dunha bolsa de plástico para aclimatar a súa transpiración tralo cambio invernadoiro-laboratorio. Posteriormente introduciuse o pecíolo nun bote completamente cheo de auga por un burato practicado na tapa ó que se axustou con Parafilm®. Na tapa practicouse outro burato polo que se introduciu o electrodo da planta. As follas foron mantidas ate os primeiros indicios de senescencia, aproximadamente unha semana, suspendidas co bote invertido para asegurar a inmersión do pecíolo na auga e co envés da folla cara arriba para permitir un maior control das cochinillas ó se alimentaren nel.

Patrón	Subpatrón	Elemento	Características				Actividades asignadas ós pulgóns para os mesmos patróns de onda
			Nivel eléctrico	Compoñente	Frecuencia	Duración	
				(emf/R)	(elementos/s)		
A			extra	R	variada	≈15 s	Establecemento de contacto eléctrico
C			extra	R/emf	variada	variable	Avance extracelular incluíndo creación da vaíña de saliva
pd	pd1	pico	intra	nd	1-2	6,5-120 s	Curta punción celular 5-15 s en pulgóns
		onda		emf	16-5		
	pd2	onda		emf	7,5-2	1-24 s	
G		pico	extra	emf	4,5-0,7	variable	Inxestión activa en xilema
		onda		R/emf	9,5-1,4		
E	E1	pico	intra	nd	2,5-0,4	10-35 s	Punción nun tubo criboso e salivación
		onda			13-7,5		
	E2I	pico		nd	4-0,5	2-65 min	
		onda		10-3			
	E2II	onda		nd	9,5-3		
E3	pico	R	4,5-1	variable	Inxestión sostida nun elemento criboso		
	onda	emf	7-1,8				
H		pico	extra	nd	irregular	variable	Posible correlación coa inxestión extracelular (E(c))
		onda			10-12		
N		pico	extra	nd	3-4,5	variable	Posible correlación co descabalgamento elti-letar (F)
		onda			14-16		

Táboa 1: Características dos patróns de EPG rexistrados para *P. citri* alimentándose en folla de vide e comparación coas actividades estiletas dos áfidos (intra: nivel intracelular; extra: nivel extracelular; nd: non determinado; R: resistencia; emf; forza electromotriz)

Grupos de 10-15 cochinillas parcialmente libres de ceras no seu dorso foron situados sobre o envés da folla. A aqueles individuos que se posicionaban e paraban nos laterais dos nervios principais e paralelos a eles lles foi colocado o electrodo. Para iso una gota de pintura de prata de base acuosa (cedida polo Dr. Tjallingii) foi depositada sobre o dorso coa axuda dun fío de cobre. Inmediatamente o extremo do fío de ouro do electrodo –que está composto por un fío de ou-

ro de 10 µm de grosor unido por pintura de prata ó extremo terminal dun fío de cobre e este soldado á cabeza dun cravo de latón–que foi previamente colocado na sonda de rexistro, se introduciu na pinga de pintura. Descartáronse os rexistros nos que a alimentación comezara antes de que lle fose colocado o electrodo.

As gravacións de EPG foron realizadas no interior dunha gaiola de Faraday adquirindo a 100 Hz cun equipo DC-EPG (Tja-

llingii, 1988) de catro canles cun xigaohmio de resistencia interna, Giga-’99 DC (Wageningen Agric. Univ., Entomology Dept.), conectado a un PC e controlado polo programa Stylet 3.0 corrido sobre MS-DOS. Os rexistros realizados foron de máis de 20 horas.

Realizouse un rexistro cun equipo AC-DC-EPG (Wageningen Agric. Univ., Entomology Dept.) que permite o rexistro simultáneo en AC e DC co obxectivo de poder comparar as puncións celulares e establecer así a súa estrutura interna (Kindt *et al.*, 2006). A parte AC do equipo emprega un oscilador de voltaxe de 891 Hz e 0,8 V de amplitude. O subministro de voltaxe para planta da parte DC do equipo superponse a este oscilador e precisa de axustes para cada novo rexistro, como sucede con calquera rexistro DC.

Os rexistros foron envorcados a Macintosh e procesados mediante MacStylet v2.0 β 10 (Febvay *et al.*, 1996) para a colocación das marcas nas 20 primeiras horas de alimentación. Posteriormente foron transformados e analizados mediante Probe 3.0 (Wageningen Agric. Univ., Entomology Dept.) para a obtención dos perfís de frecuencia de cada patrón. Estes foron obtidos no caso de patróns continuos a partir dos valores máximos e mínimos por hora e no caso das pds a partir da primeira pd de cada hora.

O procesado das marcas para a súa interpretación foi realizado mediante a creación dun libro en Microsoft® Excel® 2004 para Mac (Microsoft Corporation) que permitiu o cálculo de 147 parámetros de caracterización do comportamento alimentario.

Rexistro da excreción de melaza

Para a correlación de patróns coa excreción de melaza fíxose un rexistro de deposición de melaza cun reloxo de 24 horas ó que se lle axustou unha cinta de papel Wathman® previamente pulverizado con ninhidrina 2mg/ml en etanol de 96° o que permitiu coñecer a frecuencia de excreción (Lei *et al.*, 1995).

Alimentación en membrana

A alimentación en membrana realizouse sobre membranas de Parafilm® finamente estirado. As membranas situáronse na boca de eppendorfs recheos parcialmente de dieta líquida a base de auga destilada con sacarosa ó 30 %. O electrodo, un fino fío de latón foi introducido por un burato no lateral do tubo que foi posteriormente selado mediante pegamento. Resultou útil o emprego dunha banda de Parafilm® sobre a boca do tubo que foi empregada como agocho polas cochini-las, xa que se observou que, sentíndose resgardadas, inician antes a alimentación.

Resultados e discusión

Patróns de onda

Os patróns de onda rexistrados para *P. citri* (Táboa 1) foron bastante semellantes ós obtidos por Calatayud e colaboradores (1994, 2001) para os *phenacoccus* se ben se detectaron diferencias nas súas frecuencias (Táboa 1). Ademais dos xa descritos para *Phenacoccus* caracterizáronse patróns novos que se corresponden coa alimentación en xilema, que foi xa detectada para *Planococcus minor*, e con longos períodos de inxestión de fluído

floemático, un terceiro que pode corresponderse co patrón H dos *phenacoccus* aínda que é sensiblemente diferente e un cuarto que pode corresponderse co patrón N descrito por Santa-Cecilia (2003).

As probas alimentarias no caso das cochinillas son máis longas ca no caso dos pulgóns e o seu número é máis reducido. Case a metade das cochinillas realizan unha única proba durante as 20 horas que dura o rexistro. Os momentos iniciais da proba caracterízanse, do mesmo xeito que ocorre cos pulgóns, por ondas de grande amplitude e frecuencia (patrón A) (Fig. 1A e A1). A amplitude mantense alta durante un certo período ata que acada o que poderíamos considerar como o patrón típico de avance intercelular, que denominaremos C de acordo con Calatayud e colaboradores (1994) e pola súa similitude co seu análogo en áfidos. Nalgúns casos aparece un patrón de transición entre o A e o C que se asemella bastante ó B descrito para pulgóns (Fig. 1A1). Durante o patrón A e os primeiros minutos de C non é infrecuente atopar oscilacións bruscas de potencial que poderían estar relacionadas coa inserción dos estiletos nas células vexetais, aínda que debido á escasa regularidade do patrón, sobre todo no seu inicio é imposible identificalas como auténticas puncións celulares.

O avance dos estiletos é basicamente intercelular realizando pequenas puncións celulares, *potential drop* (pd) (Tjallingii, 1985), así denominadas pola característica caída de potencial que se produce, ó penetrar o extremo distal dos estiletos dentro da membrana celular que se comporta coma un condensador (Fig. 1A e A2 e 2). Estas teñen unha duración media de 32,6 segundos, ain-

da que poden acadar os dous minutos. Son, polo tanto, moito máis longas que as que realizan os pulgóns, de 5-15 segundos (Tjallingii, 1985), e tamén máis longas que as descritas para as outras cochinillas, tanto *Phenacoccus* coma *Planococcus minor*, de \approx 20 segundos (Calatayud *et al.*, 1994, 2001; Santa-Cecilia, 2003).

Ademais das puncións celulares detectouse a aparición de caídas de potencial que non se viron seguidas polos patróns de onda propios das pds. Non veñen precedidas das ondas típicas previas a pd e dan paso ó mantemento do patrón de onda propio de C, con maior amplitude de onda. Durante un tempo variable a voltaxe se mantén baixa pero se vai incrementando ata acadar de novo o nivel de voltaxe usual durante o patrón C. Este comportamento parece corresponderse con esporádicos avances intracelulares. O número destes eventos, que son máis habituais durante a primeira hora de rexistro, varía en función do insecto, podendo non chegar a se dar.

O patrón que se corresponde co avance dos estiletos é un patrón complexo, probablemente formado pola superposición de distintos tipos de ondas e pola variación rítmica das actividades do insecto (Fig. 1A2, A2b). O rexistro presenta repeticións dunha secuencia cíclica de patróns cunha periodicidade que soe roldar os 20 segundos. Calatayud e colaboradores (1994) diferencian dous subpatróns principais CI e CII de disposición alterna, e un terceiro, CIII, de presenza máis errática que se caracteriza por presentar fortes caídas de voltaxe. Tamén para o patrón C de mosca branca (Janssen *et al.*, 1989; Jiang *et al.*, 1999) están descritos diferentes subpatróns. Sen embargo, como

apuntan Jiang & Walker (2003), o feito de non poder asociar os subpatróns con actividades concretas réstalle significado a tales subdivisións. É moi probable que se correspondan con solapamentos parciais ou totais das accións que realiza o insecto durante o avance dos estiletos –secreción da saliva xelificante e movemento dos estiletos para atravesar a gota de saliva e probablemente outras como catas de apoplasto e poida que secreción de saliva acuosa– en conxunción coa particularidade eléctrica do punto da planta no que se sitúa o extremo dos estiletos. No caso das cochinillas a maioría das ondas presentan unha compoñente R maioritaria, mentres que só unha pequena parte manteñen a súa amplitude e signo cando se realizan axustes de voltaxe (Fig. 3C). As distintas ondas que se poden atopar durante un ciclo de C gardan unha certa similitude cos subpatróns descritos para mosca branca (Janssen *et al.*, 1989; Jiang *et al.*, 1999) pero a constante variación das mesmas –tanto en forma coma duración e número– así como a escasa duración de cada unha delas dificulta o establecemento de correlacións precisas, así como o estudo do efecto da variación da voltaxe en cada unha delas (Fig. 3C). O terceiro subpatrón de C descrito, CIII (Fig. 1B, B1 e B2), correspóndese cunha variación dalgúns das fases do CII no que as baixadas de potencial se fan especialmente profundas ate acadar case o nivel 0 de voltaxe pero sen chegar a se tornar negativo. Estas baixadas fondas de potencial, que Calatayud e colaboradores (1994) consideraban probablemente debidas a incrementos da resistencia, comprobouse que teñen esa orixe pois cambian de intensidade e sentido cos axustes na voltaxe. Este tipo de onda soe ser máis frecuente nas proximidades de se

te nas proximidades de se producir unha punción celular (Fig. 1B2) e podería estar relacionado co avance intramural, de modo que as fortes caídas de potencial se corresponderían con fortes aproximacións á membrana plasmática.

Antes de se producir unha punción celular soe darse un tipo de C que, ademais de poder presentar fortes as caídas do potencial anteriormente descritas (Fig. 1A2b), amosa longos períodos nos que se suceden elevacións de potencial cunha lixeira semellanza co patrón de alimentación en xilema aínda que con menor frecuencia e máis irregulares. Este tipo de C xa foi descrito por Jiang & Walker (2003, Fig. 2.E) para a última fase de C antes de se producir unha pd en mosca branca. Xusto antes da caída de potencial desaparecen as flutuacións de potencial e xéranse ondas de baixa amplitude e de alta frecuencia (Fig. 2A1), análogas ás do patrón da 1ª fase da pd (Fig. 2A2), entre as que comezan a aparecer breves caídas de potencial que se van intensificando ate acadar o nivel cero de voltaxe e finalmente penetrar na célula (Fig. 2A1), producíndose unha caída moito máis severa que representa a punción celular (Tjallingii, 1985). As breves caídas de potencial da fase previa á pd, que se detectan tamén en mosca branca (Johnson & Walker, 1999) son orixinadas por cambios na resistencia, mentres que a fonda caída do comezo da pd ten unha orixe emf (Tjallingii, 1985) (Fig. 3A). Tamén en mosca branca (Jiang *et al.*, 1999) a onda do interior da pd comeza a xerarse antes de que se dea a caída de potencial. Ás veces a rotura da membrana vai precedida por relativamente longos períodos de voltaxe 0 (Fig. 2B), que se corresponden coa ruptura do circuíto eléctrico

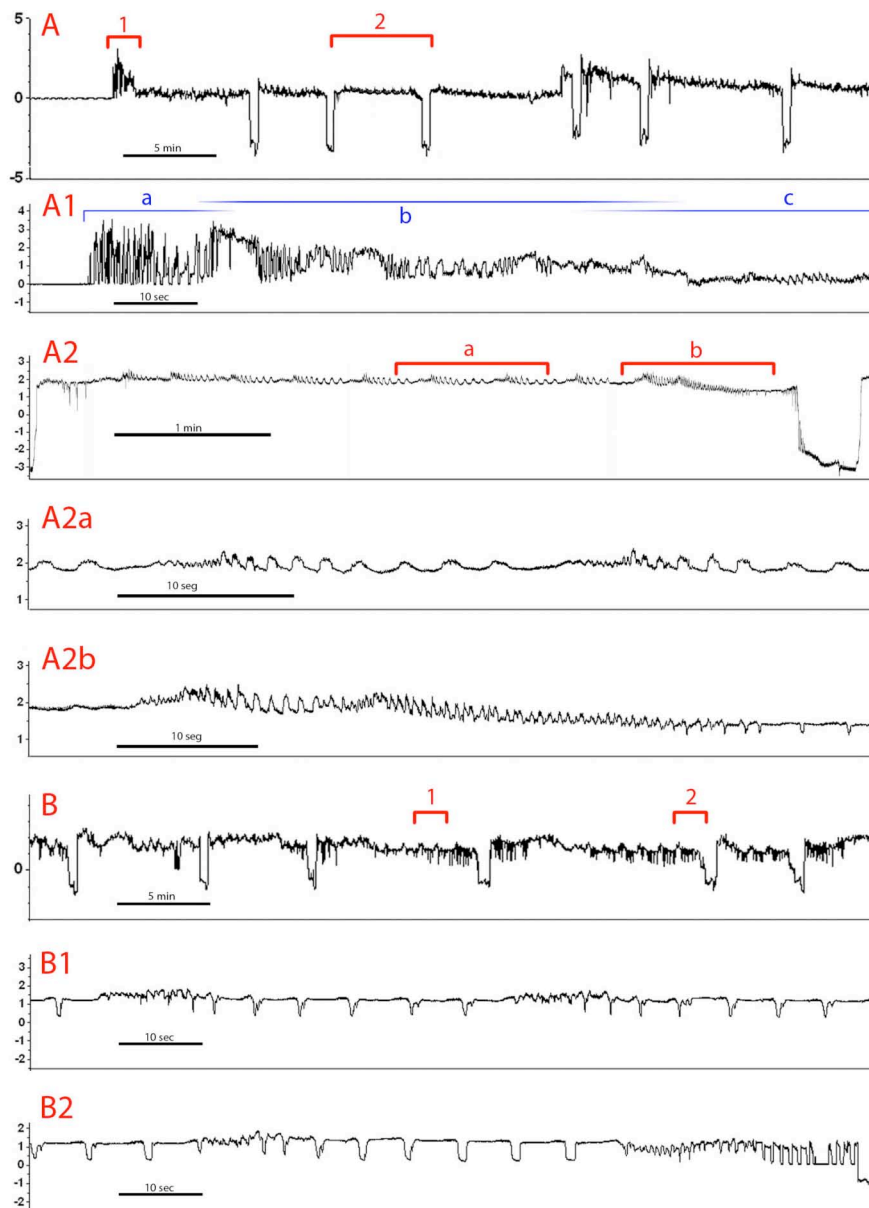


Figura 1: Padróns A e C. A: Comezo de proba con avance intercelular e puncións celulares. A1: Detalle do comezo da proba onde se ve o patrón A (a), o período de transición que se asemella ó B de pulgóns (b) e o patrón C (c). A2: Detalle do avance intercelular entre dúas puncións celulares. A2a: 2 ciclos do patrón C máis habitual. A2b: tipo de patrón C previo a unha punción celular. B: Hora de rexistro con avance intercelular e puncións celulares. Os detalles 1 e 2 resaltan zonas de C de alta amplitude denominados por Calatayud CIII; 1 no medio dun avance e 2 antes de se producir unha pd.

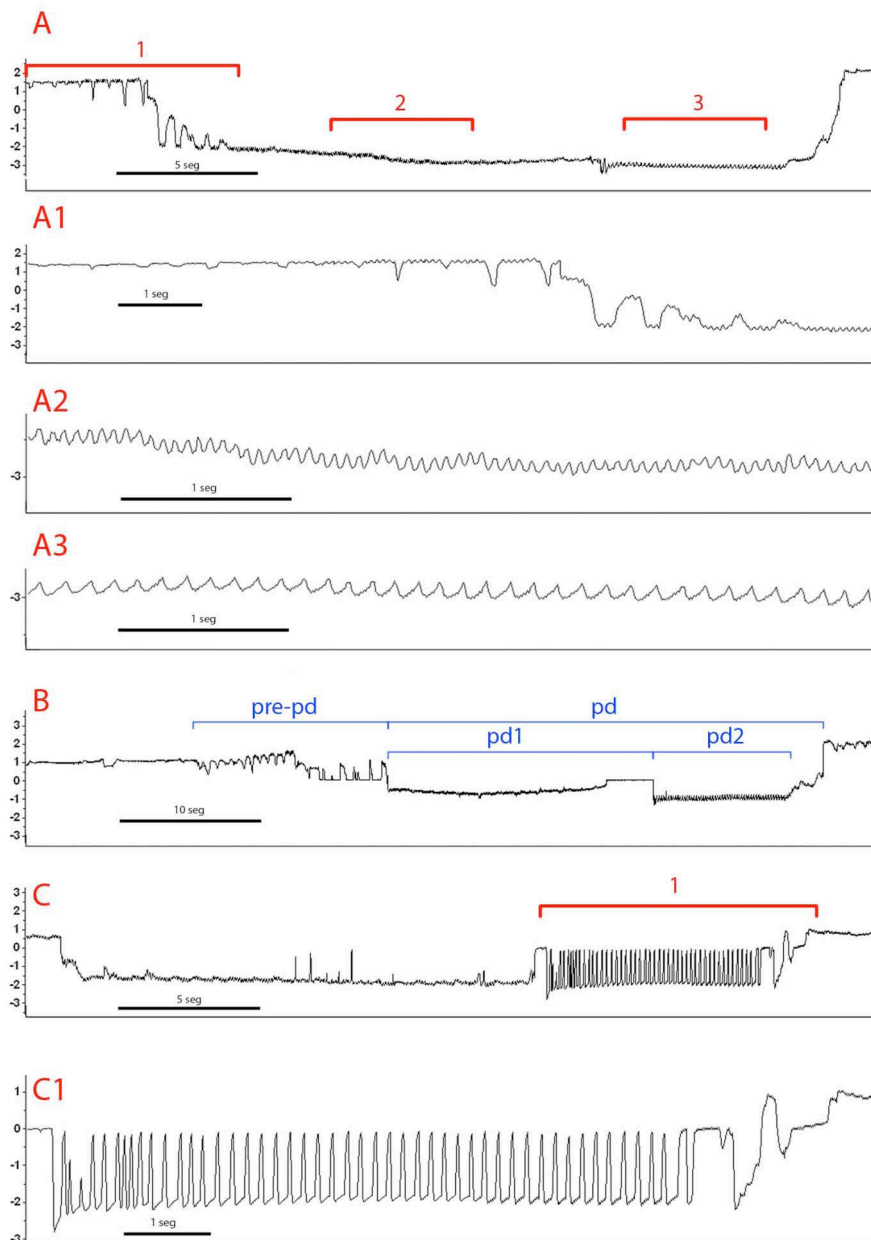


Figura 2: Puncións celulares. A: pd típica de cochinilla. Os detalles amosan a pre-pd e a caída de potencial (A1) e os patróns de onda da 1ª fase (A2) e da segunda (A3). B: pd con fases de voltaxe 0 na entrada e no cambio de fases. Aparecen resaltadas a *pre-pd*, a *pd*, e as dúas fases a 1 (*pd1*) e 2 (*pd2*). Entre a fin da fase 2 e a recuperación do nivel extracelular pode apreciarse un período que varía en duración segundo a *pd*, podendo ser case inexistente. C: pd coa fase 2 en peite e fases de nivel 0 de voltaxe antes e despois da fase 2. C1: detalle do patrón da fase 2 en peite.

formado polo equipo de rexistro, a planta e o insecto, xa que non responde á variación de voltaxe subministrado. Segundo a teoría do Dr. Tjallingii (comunicación persoal) eses períodos de voltaxe cero deben corresponderse coa inmersión ou contacto do extremo dos estiletos na membrana plasmática. O feito de estar a membrana celular composta principalmente por lípidos non condutores faría que ó se producir o contacto coa membrana esta actuase como illante rachando co circuíto, que se restablece en canto se produce a penetración na célula. En certos casos e aínda que os patróns previos son análogos ós que se producen antes dunha pd o insecto non consegue penetrar no interior da célula, e despois dun período que soe roldar os 15 segundos nos que se mantén nun nivel 0 de voltaxe, continuo ou alternando con breves períodos positivos, prosegue o avance intercelular sen realizar a punción da célula. A variable aparición das fases de voltaxe 0 poden estar relacionadas co ángulo de incidencia dos estiletos sobre a membrana celular. A aproximación perpendicular á superficie daría lugar a penetracións rápidas nas que o extremo distal dos estiletos permanecería pouco tempo inmerso na membrana. O achegamento tanxencial dos estiletos, pola contra, favorecería longos contactos do seu extremo coa membrana e a aparición das fases de voltaxe 0.

Nalgúns casos, nas pds, o paso da voltaxe positiva do extracelular á voltaxe negativa do intracelular faise dun modo directo manténdose no nivel intracelular sen case oscilacións. Noutros, pola contra, despois da caída ó potencial intracelular, na primeira fase da pd pódense ver rítmicos incrementos da voltaxe ate case acadar o nivel 0, análogos ás

caídas de potencial previas á pd pero de sentido contrario, xa que a compoñente principal destas caídas é a R. A medida que transcorre a pd eses incrementos se reducen ate desaparecer (Fig. 2A e A1).

Dentro da pd de cochinillas pódense diferenciar dúas fases (Fig. 2B), sendo moi semellantes ás pds longas descritas para mosca branca (Jiang *et al.*, 1999). A primeira fase, pd1, presenta un patrón de onda de baixa amplitude e alta frecuencia (Fig. 2A2), que soe ser de 11-12 ondas por segundo ó comezo da proba e vai diminuindo a medida que se prolonga esta ate acadar as 6-7 ondas por segundo. Esta onda non se ve influída polos axustes de potencial polo que a súa orixe é basicamente a compoñente emf. Ademais do patrón de ondas non é infrecuente que apareza un pico superposto cunha frecuencia de 1-1,5 como poden apreciarse na figura 2C. Nalgúns casos é case imposible apreciar o patrón de onda propio e a voltaxe rexistrada é moi irregular. A duración media é de 23,7 segundos, cun rango que vai dos 6 ós 127 s. A segunda fase, pd2, é moito máis regular cá anterior (Fig. 2A3). Soe presentar un nivel base completamente plano con ondas de forma característica, o que as fai sinxelas de recoñecer, semellantes ás da subfase II das pds longas de mosca branca (Jiang *et al.*, 1999) e ás da subfase II-2 das pds repetitivas de *Acyrtosiphon pisum* (Tjallingii & Gabyrys, 1999) cunha frecuencia que varía dende as 6 ondas por segundo do principio da proba e vai diminuindo ate acadar 4 ondas por segundo. Estas ondas, como as da pd1, non se ven alteradas durante os axustes de potencial, polo que a súa orixe é emf. A duración media da segunda fase é de 8,8 segundos, nun rango que vai dende 0,8 a 30

s., se ben non é estraño que se detecten pds nas que a segunda fase non está presente – un 19% de media aínda que varía moito entre rexistros–. A función das dúas fases da pd é descoñecida aínda que Calatayud e colaboradores (1994) apuntan, de xeito parale-

lo ó que sucede cos pulgóns, a que nun primeiro momento, pd1, o insecto está salivando e posteriormente realiza unha inxestión, pd2. Sen embargo como ata o momento non está descrito ningún virus de transmisión non persistente que teña coma vec-

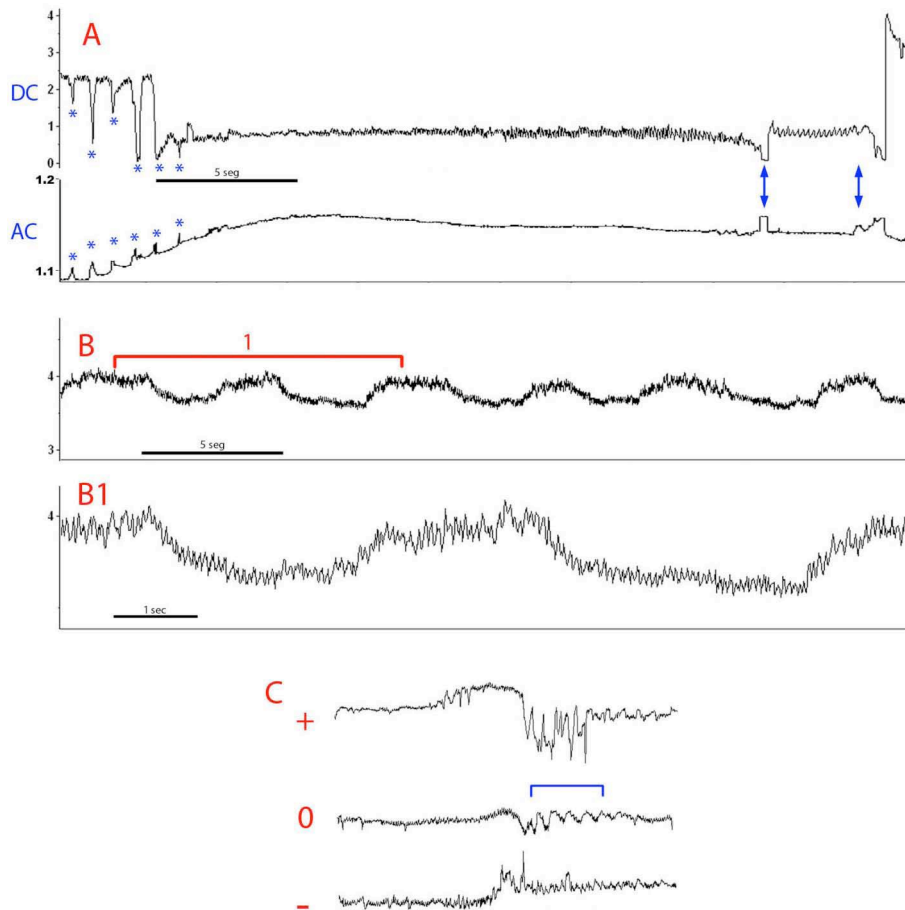


Figura 3: A: pd rexistrada simultaneamente co sistema DC e AC. Pode apreciarse como as caídas de potencial (*) da pre-pd e do principio da pd (ó ter toda ela voltaxe positivo) do rexistro DC se corresponden con subidas no rexistro AC pola súa compoñente R. Pode verse ademais como o comezo e remate da pd2 (DC) se corresponden con incrementos de resistencia no rexistro AC (\Leftrightarrow). B: Patrón de onda N análogo ó detectado por Santa-Cecilia (2003) para *P. minor* pero sen actividade asociada coñecida. B1 amosa un detalle do patrón N. C: Axustes de voltaxe para un ciclo de patrón C. Pode apreciarse como os picos destacados na voltaxe 0 se manteñen froito da súa orixe emf. O resto do relevo do patrón débese pois á compoñente R xa que cambian de amplitude e sentido nos axustes. Nótese que debido á continua variación do patrón C non existe unha correspondencia exacta das ondas dos tres axustes.

tor unha cochinilla é complicado chegar a probar este punto.

Entre as dúas fases da pd é habitual que apareza unha lixeira baixada no nivel de potencial (Fig. 2A e B) aínda que nalgúns casos non se produce e noutros, moito máis escasos, é un aumento (Fig. 3A). Á fin da pd2 soe producirse un cambio de voltaxe ate recuperar o nivel de voltaxe propio da pd1 (Fig. 2A e B), pero este normalmente se confunde coa recuperación da voltaxe extracelular do remate da pd. O rexistro en paralelo nun rexistrador AC/DC-EPG amosa que tanto no comezo coma na fin da pd2, correspondéndose coa baixada e subida de potencial rexistradas polo sistema DC (Fig. 3A, \Leftrightarrow), se produce un aumento na resistencia. Nalgúns casos entre a pd1 e a pd2, e en menor medida á fin da pd2, se produce un período de nivel de voltaxe 0 análogo ó que se produce no comezo da pd (Fig. 2B). Danse casos tamén nos que a onda característica da pd2 se alonga rapidamente ate chegar a nivel de voltaxe 0 para volver baixar o nivel base da pd2 no val seguinte, conferíndolle o aspecto dun peite (Fig. 2C e C1). Isto parece indicar, de acordo coa teoría do Dr. Tjallingii (comunicación persoal), o contacto do extremo do estilete cunha membrana. Dúas posibles situacións poderían dar lugar a estes fenómenos: que o extremo dos estiletos se sitúe entre dúas membranas ou ben que se sitúe no interior dunha segunda membrana, sendo a máis probable en ambos casos a membrana da vacuola. No primeiro caso o contacto dos estiletos coa membrana tería lugar na cara externa do tonoplasto. Un lixeiro avance dos estiletos faríaos entrar en contacto coa vacuola, e nas pd2 en peite as alternancias no fluxo de suc-

ción ou exestión –succión/non-succión; succión/exestión; exestión/non-exestión– influirían sobre o contacto do extremo do estilete coa membrana da vacuola. Neste caso o aumento de resistencia na entrada e saída da pd2 sería debido ás actividades internas da cochinilla. No segundo caso a penetración na vacuola explicaría o aumento da resistencia no comezo e final da pd2 que sería debido á inmersión na membrana da vacuola, tanto na entrada coma na saída. Neste caso as pd2 en peite poderían vir da introdución do estilete noutro orgánulo membranoso coma un plasto ou unha mitocondria que situase outra membrana moi próxima e que se vise influída polos fluxos xerados pola cochinilla ou ben de que a variación nos fluxos fixese que o extremo dos estiletos oscilase entre estar inmerso na membrana e asomar pola cara interior da mesma, probablemente determinado polo ángulo de incidencia dos estiletos na membrana.

Ademais das pds e dos avances intracelulares, detectáronse durante C outros eventos de xustificación descoñecida. Un deles, que denominaremos pseudo-pd (Fig. 4A e A2), aseméllase a unha pd duns 25 segundos de duración que comeza cunha caída de potencial pero de menor importancia, quedando sempre nun nivel positivo. As ondas que aparecen despois da caída de potencial gardan unha certa semellanza coas da pd2 (Fig. 4A2c) pero presentan unha frecuencia irregular. Á fin o potencial se recupera ascendendo en forma de parábola. Se ben algunhas veces este evento aparece illado no medio do avance intercelular, as máis das veces aparece repetido polo xeral un número reducido de veces, 2 ou 3, pero nun dos rexis-

tros se repite 18 veces seguidas. Cando aparece repetido a separación entre os eventos é de tan só uns poucos segundos.

Outras veces a voltaxe baixa bruscamente ate o nivel 0 (Fig. 4A e A1) e a partir dese momento se suceden unha serie de ciclos de picos, xerados principalmente pola compoñente R (Fig. 4A1a), que van diminuindo de amplitude ate quedar case reducidos ó nivel 0 de voltaxe. Os picos que compoñen cada un dos ciclos aumentan de amplitude ate acadar un máximo e posteriormente volven baixar. Unha vez os picos se extinguen totalmente o potencial se mantén en torno a 0, aínda que sen rachar o circuíto, por un tempo variable que vai duns poucos segundos a 15 minutos. Non se apreciou que a este tipo de eventos o sucedese un tipo concreto de patrón, pero frecuentemente despois del ou finaliza a proba ou entra nun período de alimentación activa en xilema. Non existen na bibliografía antecedentes semellantes, pero o feito de que a corrente se anule pode ser debido ben a que se produza un atasco no extremo da canle dos estiletos por algunha partícula, ou ben a introdución do extremo do estilete nunha burbulla de aire existente no interior da folla, se ben isto parece pouco probable.

En case tódolos rexistros se detectou un patrón moi semellante ó de inxestión en xilema de pulgóns (Fig. 5) (Spiller *et al.*, 1990) que xa fóra detectado en *Planococcus minor* (Santa-Cecilia, 2003), e que denominaremos G coma en pulgóns. Este patrón caracterízase por picos de amplitude polo xeral grande, por veces igual á do patrón A. Nalgúns casos, sen embargo, a amplitude é moi reducida. A frecuencia é menor ca no caso dos pulgóns oscilando entre 1 e 4,5

unha media de 2 picos por segundo. A orixe das oscilacións da voltaxe deste patrón é maioritariamente a compoñente emf dado que non se detectan variacións evidentes cando se varía o nivel de voltaxe entre positivo e negativo (Fig. 6C). Sen embargo as ondas que acompañan á secuencia de picos, dependendo do insecto e do momento en cuestión, poden presentar grandes variacións cos axustes de voltaxe, como sucede tamén durante a alimentación en membrana (Fig. 6D). Este patrón foi detectado de xeito mantido na alimentación en membrana polo que debe estar asociado á inxestión activa de fluídos (Fig. 6A2). Por isto cando ten lugar durante a alimentación en planta debe estar asociado á alimentación en xilema. A duración dos períodos de patrón G en planta é moi variable podendo manterse durante máis de 15 horas ou ser duns poucos segundos. Este patrón soe ser bastante homoxéneo aínda que non é estraño que se produzan oscilacións na súa amplitude. Non é infrecuente que entre períodos de alta amplitude se intercalen curtos períodos de moi baixa amplitude. Nestes casos os picos desaparecen case por completo dando lugar a un patrón que garda certa semellanza co patrón de inxestión pasiva en floema de pulgóns pola aparición de picos de signo negativo (Fig. 5A3). En certos casos o patrón perde a súa forma típica, aínda que mantén a súa frecuencia, o que pode ser debido a desaxustes das actividades realizadas pola cochinilla durante a inxestión (Fig. 5B).

A alimentación en floema caracterízase polo seu potencial negativo dado que é unha actividade intracelular, e o seu mantemento durante longos períodos de tempo (Fig. 7A). Despois da caída de potencial, que ten lugar

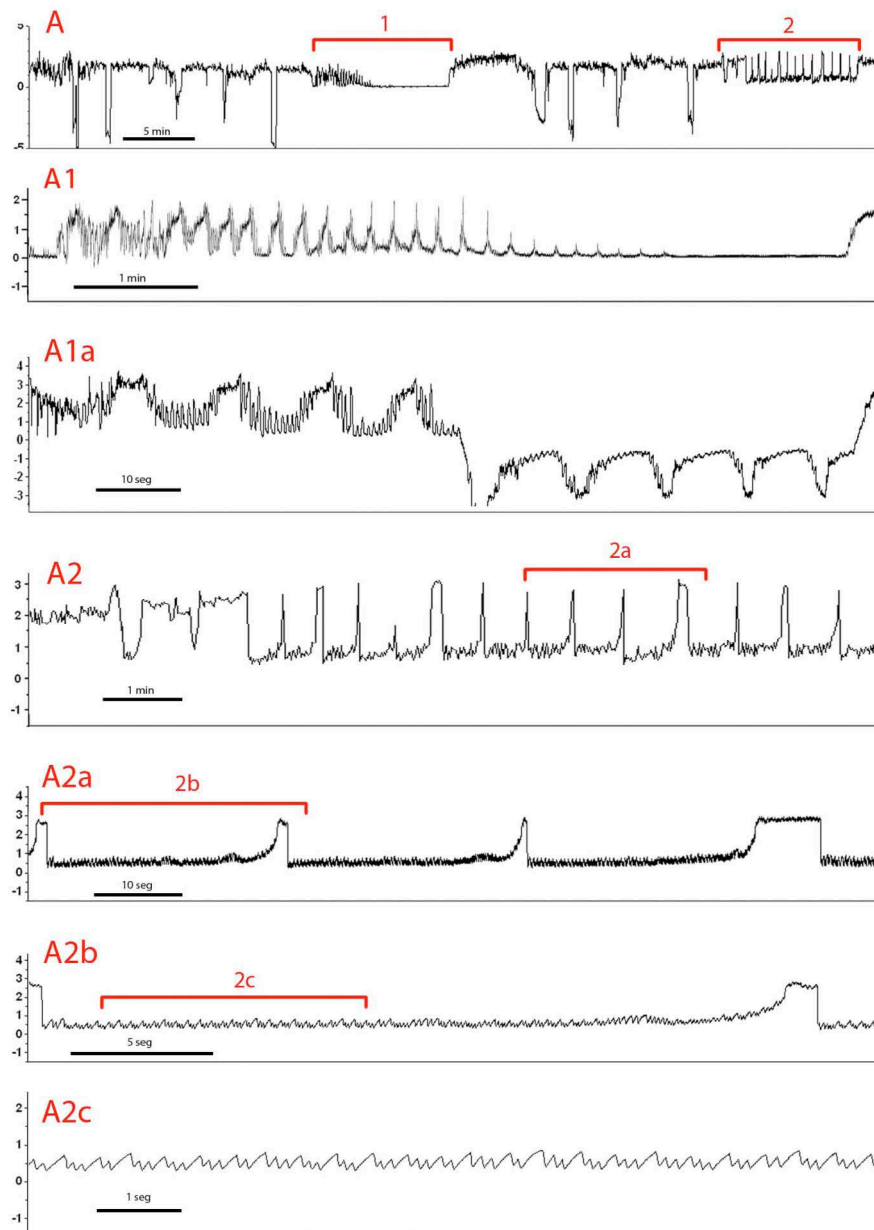


Figura 4: Posible atasco e pseudo-pds. A: Hora de rexistro de avance intercelular no que aparecen resaltados un posible atasco (1) e unha secuencia de pseudo-pds (2). A1: detalle do que consideramos un posible atasco do orificio dos estiletos. A1a: axustes de voltaxe sobre un posible atasco que sinalan R como principal compoñente das ondas. A2: Secuencia de pseudo-pds con detalles (A2a e A2b) e patrón de onda da pseudo-pd (A2c). Nótese que a regularidade apreciada no detalle do patrón de onda non se mantén ó longo de toda a pseudo-pd.

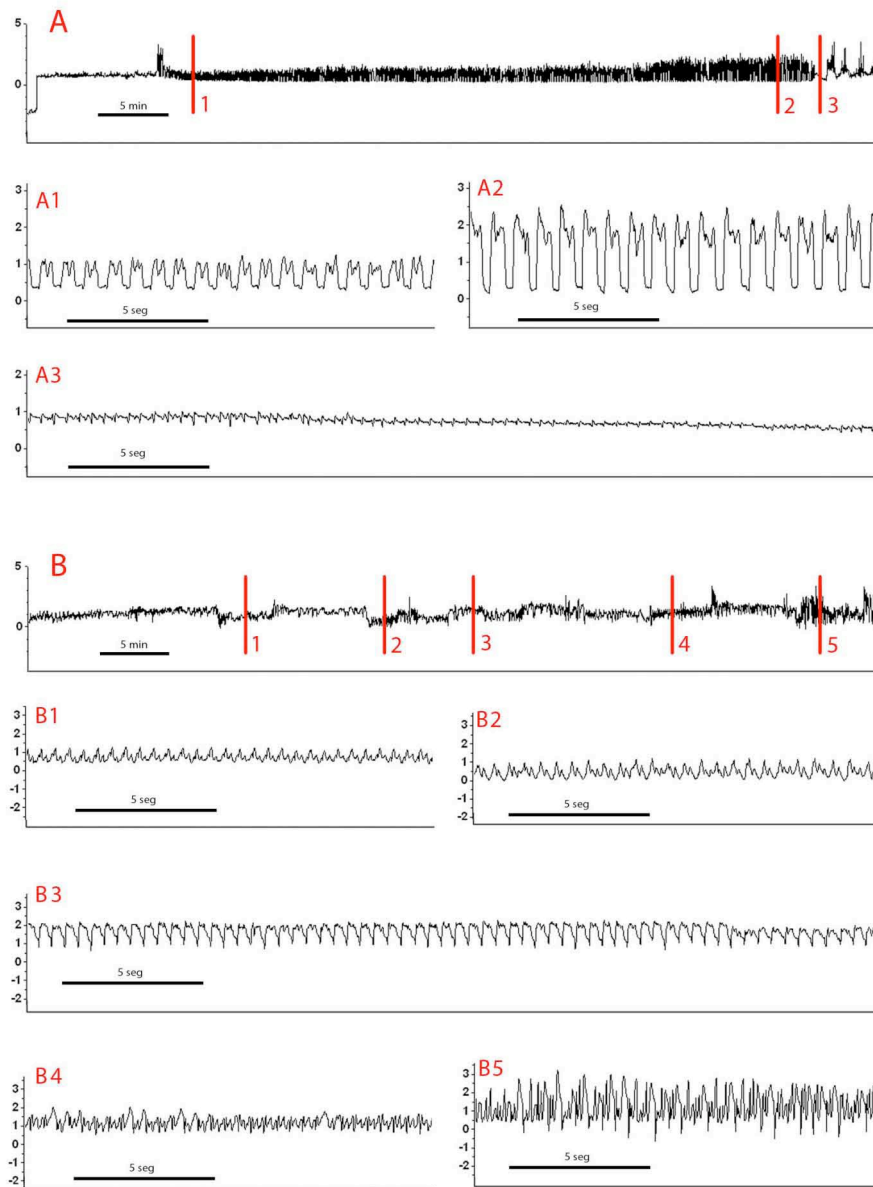


Figura 5: Xilema. A: Alimentación continuada no xilema durante preto dunha hora amosando un patrón homoxéneo. Aparecen marcados os detalles do patrón con baixa amplitude (A1), con alta amplitude (A2) e unha secuencia de amplitude mínima onde se pode apreciar un patrón de onda semellante ó de alimentación en floema que aparece entre secuencias de alimentación en xilema ou á fin destas. B: Alimentación continuada en xilema amosando un patrón pouco homoxéneo. Os detalles seguintes (B1-5) amosan os distintos tipos de onda que se poden atopar ó longo da hora de rexistro.

cando os estiletos penetran no interior da membrana, sucédense distintos tipos de patróns, que no caso de se tratar dunha alimentación completa comprendería as seguintes fases: a inicial sería semellante á fase 1 da pd, a segunda estaría composta por dous patróns alternos semellantes ós descritos por Calatayud e colaboradores (1994) como alimentación en floema, e a terceira, que só se presenta cando é unha alimentación mantida, e que é semellante ó patrón E2 descrito para pulgóns (Prado & Tjallingii, 1994) e ó E2 de *P. minor* (Santa-Cecilia, 2003) e se prolonga ate a retirada dos estiletos do floema.

A primeira fase floemática, inmediatamente despois da caída de potencial, presenta un patrón de onda moi semellante ó da pd1. Isto fai que sexa complicado, cando non se presenta a segunda fase da pd, distinguir as pds longas, de máis dun minuto, de curtas insercións nos elementos cribosos. Este patrón floemático (E1) (Fig. 7A1) ten unha duración media de 35 segundos e por analoxía ó comportamento dos pulgóns (Prado & Tjallingii, 1994) e pola súa semellanza ó patrón de pd1 se supón que debe estar asociado con salivación. Tras eses breves segundos a frecuencia das ondas diminúe e dá paso a un período durante o cal se alternan dous subpatróns: E2I e E2II (Fig. 7A2). O subpatrón E2I presenta picos claros de signo positivo superpostos sobre unha base composta por ondas (Fig. 7A2a). O subpatrón E2II está composto unicamente por esas ondas (Fig. 7A2b). Calatayud describiu a sucesión destes subpatróns coma unha alternancia rítmica. Para *P. citri*, sen embargo, non soe ser así. O patrón E2I pode estar ou non presente e as alternancias

entre ambos non se producen ritmicamente. É probable que o patrón E2, coa alternancia de ambos subpatróns, represente alternancia de actividades principalmente salivadoras e principalmente inxestiva. Esta segunda fase floemática ten unha duración media de 18 minutos, se ben é moi variable, e a máis curta rexistrada non acadou os 3 minutos. Non hai datos que permitan establecer con que tipo de actividade se corresponden estes dous subpatróns. Podería tratarse de fases alternantes con predominio de salivación e con predominio da inxestión. A terceira fase floemática presenta un patrón de onda (E3) (Fig. 7A3 e A4) non detectado para *Phenacoccus* e moi semellante ó patrón asociado á inxestión pasiva realizada polos pulgóns durante a súa alimentación no floema. O patrón componse principalmente de picos de sentido negativo, con R coma compoñente principal e unha frecuencia que varía pero sen presentar dúas fases diferenciadas como no caso da mosca branca (Jiang & Walker, 2003). Ademais dos picos, que varían de frecuencia e de amplitude, as ondas que os acompañan varían tamén nas dúas características ata o punto de, nalgúns momentos, non ser perceptibles. Este patrón mantense durante períodos moi longos de tempo, incluso varios días, e se correlacionou coa excreción de melaza que deu positivo á reacción con ninhidrina, co que se corresponde coa inxestión do contido floemático. A frecuencia de excreción foi moi variable, tanto dentro do mesmo individuo (8,8-4,8 pingas por hora) coma entre individuos (5,8-3,8 pingas por hora) detectándose nalgúns casos a presenza de excreción de dúas pingas case seguidas.

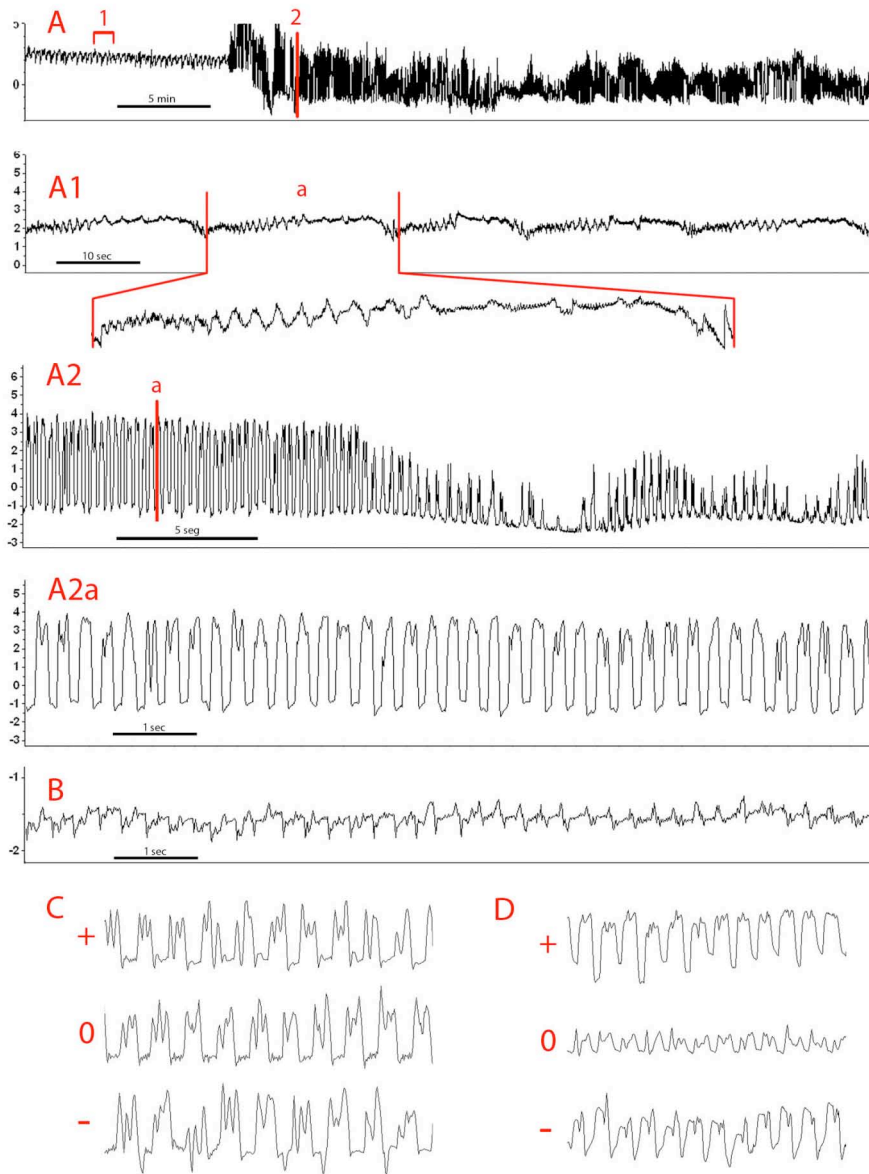


Figura 6: Padróns de alimentación en membrana. A: Rexistro de EPG de *P. citri* alimentándose en dieta de sacarosa a través de membrana de Parafilm®. Os detalles amosan o patrón de salivación e avance estiletar (A1) e unha ampliación do mesmo (A1a) e o patrón de inxestión activa, análogo ó de pulgóns cun detalle (A2) e unha ampliación do mesmo (A2a). B: Patrón de inxestión sen case amplitude análogo ó obtido en plantas e que garda certa semellanza co patrón de inxestión pasiva de contido floemático durante a alimentación en planta. C e D representan axustes de voltaxe para o patrón de inxestión activa. En C vese unha moi pequena participación da compoñente R e poucos cambios cos axustes mentres que en D se poden ver importantes modificacións segundo a voltaxe subministrada.

Nun dos rexistros foi detectado outro patrón (Fig. 7B). Este caracterízase por presentar unha base de ondas de alta frecuencia (10-12) con picos irregularmente distribuídos. Este patrón presenta unha certa analogía co patrón H descrito por Calatayud que atopou asociado á alimentación en puntos afastados dos nervios principais e a alimentación de cochinillas parasitadas. Este estímulo probable a correlación desta onda co E(c) descrito para pulgóns. Malia presentar unha certa semellanza co patrón H de Calatayud os picos presentan unha distribución moito máis irregular e non garda semellanza cos patróns de floema atopados para *P. citri*.

Noutros rexistros realizados á marxe do experimento, pero coa mesma metodoloxía, recolleuse outro patrón (Fig. 3B) que se pode corresponder co descrito por Santa-Cecilia (2003) coma patrón N. Ela asocia este patrón ó patrón F descrito para pulgóns e que se demostrou estar asociado a un descarrilamento dos estiletos que impide o seu avance organizado (Alvarez *et al.*, 2006). Podería tratarse tamén dalgún tipo de variación do patrón C. É un patrón de onda de tipo extracelular onde se alternan fases de dous niveis de potencial eléctrico distintos. As fases de potencial eléctrico alto presentan picos dunha frecuencia entre 3 e 4,5 mentres que as fases de potencial baixo non presentan picos estando compostas basicamente por ondas de menor amplitude e frecuencia moito maior (14-16 ondas por segundo) o que podería corresponderse co patrón F dos pulgóns. En ambas as dúas fases tanto picos coma ondas non presentan unha distribución uniforme.

Detectouse tamén un tipo de onda que se atopa recorrentemente asociado á fin das probas, e que pode corresponderse cos movementos de retracción dos estiletos, ou coa salivación para encher a luz das vaíñas empregadas durante o avance. Esta onda é de pouca amplitude e forma constante aínda que de duración variable e de orixe eléctrica descoñecida. É probable que a aparición de períodos con este tipo de onda, situados no medio dun rexistro, estea asociada coa retracción do estilete antes de emprender unha nova ruta nunha bifurcación.

Os patróns de onda recollidos durante a alimentación en membrana (Fig. 6) gardan bastante similitude cos obtidos na alimentación en planta. O patrón C, de avance dos estiletos, está composto por unha secuencia cíclica de actividades (Fig. 6A1 e A1a), o que nos indica un comportamento semellante tanto nun medio sólido como é a folla coma nun medio líquido como pode ser a dieta. O avance pode ser de duración bastante longa, sen a aparición das caídas de potencial propias das probas celulares, interrompéndose só pola aparición de períodos de alimentación activa. O patrón destes períodos (Fig. 6A2) é igual ó rexistrado durante a alimentación en planta, presentando do mesmo xeito períodos de patrón moi claro e outras de patrón máis variable. Nestas zonas máis variables, como sucede tamén cando teñen lugar coa alimentación en planta, vólvense máis relevantes certos elementos que presentan unha maior compoñente de R na súa orixe (Fig. 6C e D), polo que ó ser sometidos a cambios na voltaxe se producen cambios de amplitude e incluso de sentido. Ó igual que na planta as zonas de menor amplitude

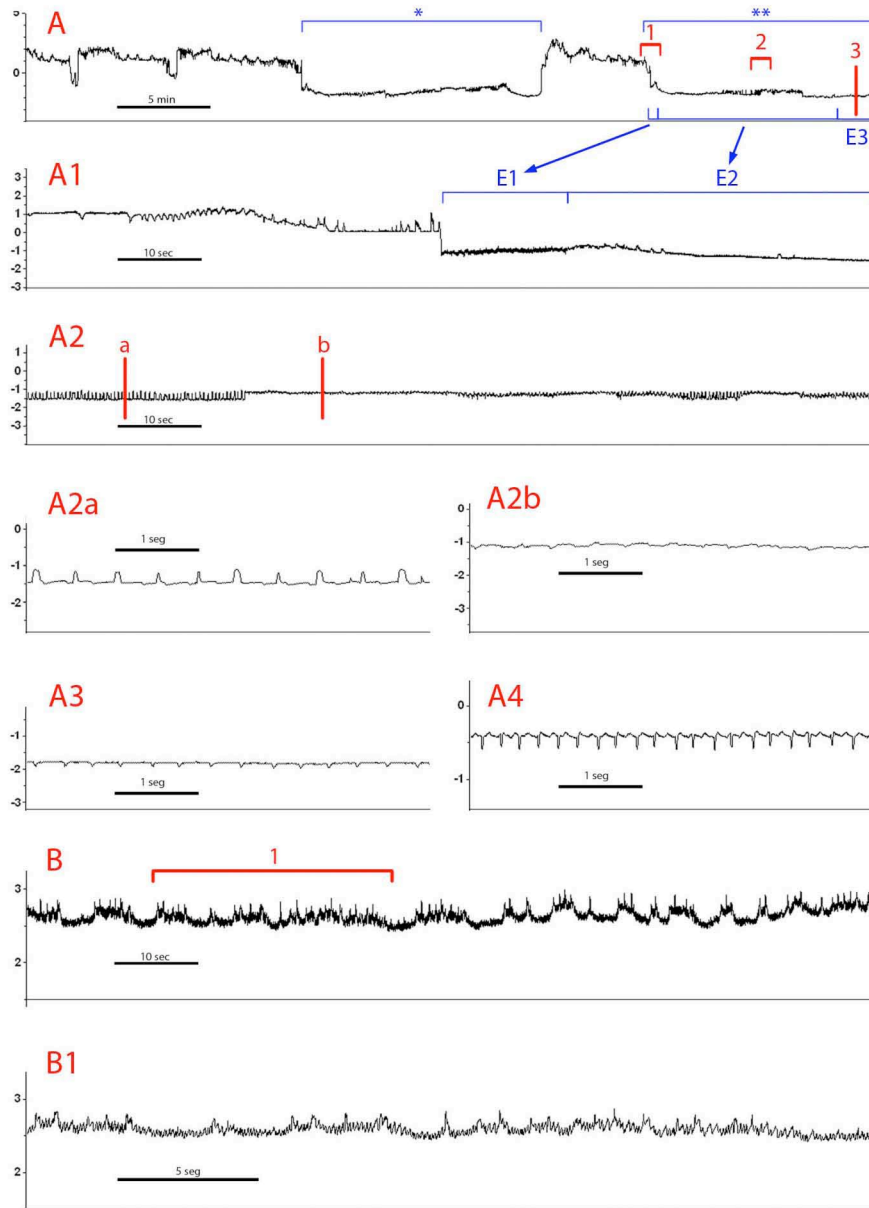


Figura 7: Floema (E) e patrón H. A: Avance celular cunha punción floemática de aprox. 15 min (*) e posterior punción floemática con alimentación (**), que se mantivo durante horas cos tres subpatróns de alimentación en floema: E1, E2 e E3. Os detalles amosan o momento da punción (A1) coa situación do patrón E1 e E2, un anaco de E2 (A2) onde se aprecia a alternancia entre os patróns E2I (A2a) e E2II (A2b) e o patrón E3 (A3) que representa a alimentación sostida. A4 representa unha variación do patrón E3 que se obtivo transcorridas un par de horas dende o comezo do patrón e que presenta unha maior amplitude nos picos e nas ondas. B: patrón H para o que non se describiu correlación con ningunha actividade concreta, pero que garda semellanza co patrón H descrito para *Phenacoccus* que está asociado a alimentación en zonas afastadas dos nervios e a comportamento alimentario de cochinillas parasitadas. B1 amosa un detalle do patrón H.

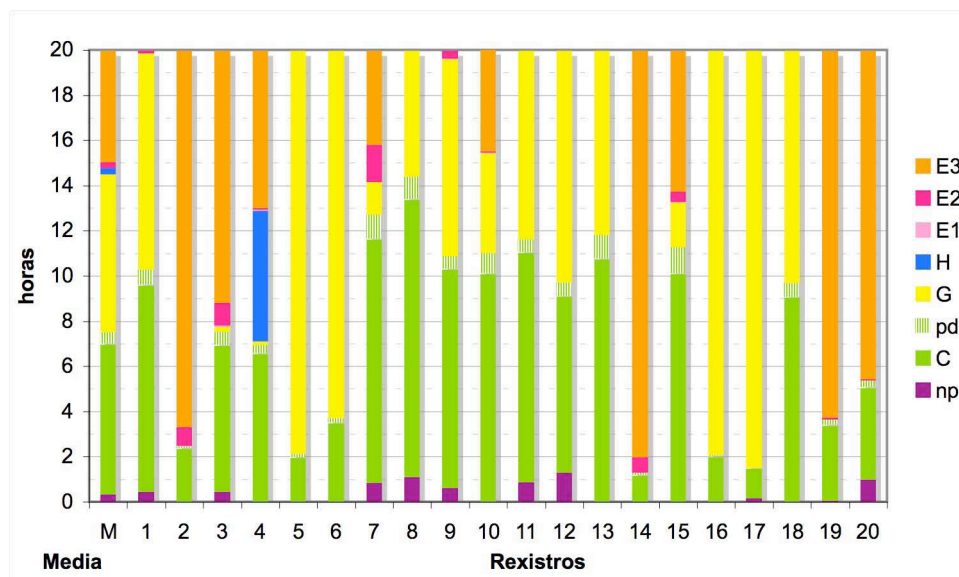


Figura 8: Tempo adicado ás actividades representadas por cada un dos patróns de onda. A 1ª columna representa a media de duración de cada patrón para os 20 rexistros. O resto de columnas numeradas do 1 ó 20 representan cada un dos rexistros co reparto de tempo realizado por cada insecto para as diferentes actividades. Nótese que a disposición das distintas actividades non implican que esa sexa a secuencia realizada para cada caso

de picos se asemellan ó patrón de inxestión en floema (Fig. 6B).

Comportamento alimentario

As cochinillas, malia seren comedores de floema como son os pulgóns, presentan un comportamento máis sedentario e unha menor avidez. O método empregado para a colocación do electrodo, unha vez que atopaban un sitio adecuado para a alimentación, permitiu acelerar o traballo, xa que grande parte das cochinillas postas na planta non inserían o estilete en longos períodos de tempo.

A maior parte das cochinillas (11/20) realizan unha única proba que dura as 20 horas de rexistro aínda que o número medio de probas por rexistro é de 1,8. As diferencias de comportamento entre individuos son moi grandes. A maioría dos insectos (11/20) acadaron o floema durante o rexistro, se ben só 9 foron quen de manter unha ali-

mentación sostida, con aparición do patrón de onda E3 e 6 permanecían no floema á fin do rexistro. Só se detectou un período de E3 por rexistro cunha duración media de 10,9 horas. O tempo medio ate acadar o floema é moi variable, dende as 1,3 h que tardou a máis veloz ate as 17 h que tardou a última e sen ter en conta ás cochinillas que non acadaron o floema á fin do rexistro. Así o tempo medio para acadar o floema é de media de 6,24 h (4,83 d.e.). A ampla maioría das cochinillas (16/20) adicaron parte do tempo a se alimentar de xilema, e destas 4 adicaron menos de 2 h e 6 máis de 10 h (Fig. 8). O tempo medio da alimentación en xilema é de 8,73 h (6,32 d.e.) distribuído en 3,65 (3,79 d.e.) períodos de 3,73 h (4,99 d.e.) de duración media. O tempo destinado á alimentación en xilema é moi longo, o que concorda cos datos aportados por Santa-Cecilia (2003). Suponse que a inxestión de xilema nos pulgóns é un mecanismo de re-

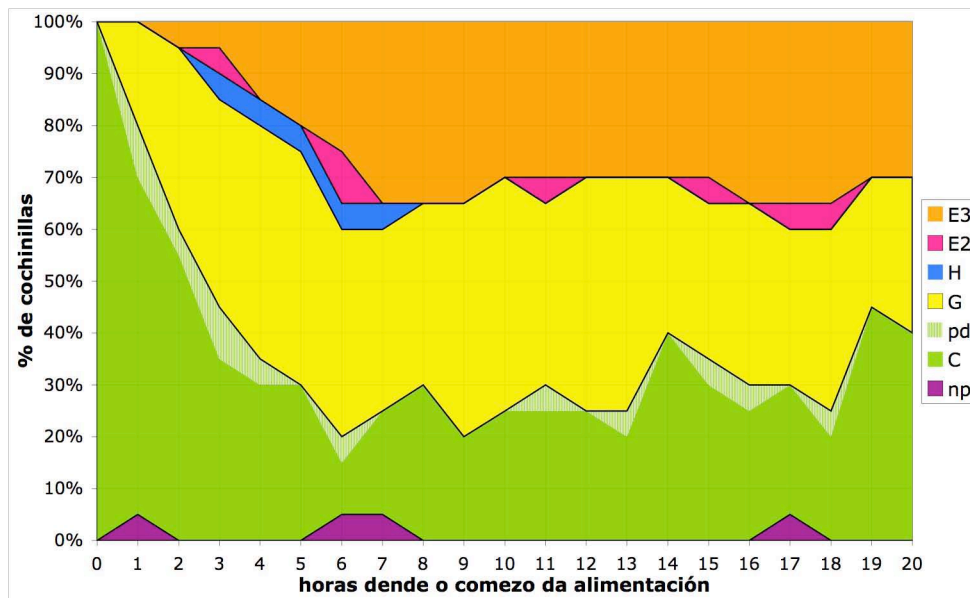


Figura 9: Evolución temporal das actividades realizadas por *P. citri*. Representase a porcentaxe de cochinillas que se atopan realizando cada unha das actividades alimentarias á fin de cada unha das 20 horas que duraron os rexistros

hidratación (Spiller *et al.*, 1990). É posible que nas cochinillas estes longos períodos estean ligados a procesos de rehidratación motivados en parte pola retirada das ceras da súa cobertura para a fixación do electrodo. Sen embargo estas poden soportar fortes variacións no contido corporal debidas tanto a procesos de desecación e a ausencia de inxestión coma a expulsión de gotas de hemolinfa polos ostíolos que presentan na rexión cefálica e caudal (Gullan & Coszta-rab, 1997). Dos tres individuos que remataron a alimentación en floema antes da fin do rexistro 2 se alimentaron posteriormente de xilema, un por só 14 min e o outro durante 4,4 h.

Analizando hora a hora (Fig. 9) que tipo de actividade desenvolven as cochinillas durante os rexistros podemos apreciar que nun

principio a actividade claramente maioritaria é o avance intercelular, pero diminúe rapidamente ate quedar reducida na sexta hora a só un 15%. Posteriormente oscila entre un 20 e un 40% sendo frecuente que polo menos unha das cochinillas que se atopan en C estea facendo unha pd á fin de cada hora. A partir da segunda hora xa a terceira parte das cochinillas se atopan alimentándose de xilema e ata a fin das 20 horas a porcentaxe de cochinillas que realiza esta actividade oscilará entre o 45 e o 25%. As actividades floemáticas son realizadas dende a sexta hora entre un 25 e un 35% e dende a segunda ate a sexta hora aumenta progresivamente do 0 ó 25%. Delas a actividade principal é o patrón E3 mentres que non é infrecuente que algunha se atope en E2. Tanto os períodos de non proba coma o pa-

trón H se presentaron coma actividades secundarias durante o ensaio.

Por ser C o patrón de avance do estilete os patróns das outras actividades se intercalan nel. Só no caso dos subpatróns estes se presentan un detrás de outro e non intercalados en C. O evento que se repite un maior número de veces, 1169 no total dos 20 rexistros, son as pds. A maior parte delas, un 81%, presenta as dúas fases. A duración media de C entre 2 pds é de 5,3 minutos, o que, tendo en conta a duración media das pds, nos daría un valor medio de 8,7 pd/h. Sen ter en conta as pds cando unha cochinilla está en C o máis probable é que pase a se alimentar de xilema cun 67,3% de probabilidade; é igualmente probable que faga unha punción no floema e comece unha E1 e que remate a proba, 15,9%; e só cun 0,9% de probabilidade comezará a facer o patrón H.

Cando comeza a facer E1 con total seguridade pasará a facer E2I-E2II e de aí nun 43,8% das ocasión volverá ó patrón C en nun 56,2 % ó patrón E3.

Na táboa 2 recóllense os parámetros descritivos da actividade alimentaria de *P. citri* elaborados. Para cada un deles amósase a media para os 20 rexistros e a desviación típica. Os parámetros que analicen número ou porcentaxe de eventos non presentan unidade, mentres que os temporais indican a unidade na que se expresan.

As cochinillas algodonosas están descritas como transmisoras de virus que, en condicións naturais, están restrinxidos ó floema. Isto fai que tanto para a súa inoculación, como para a adquisición, deban chegar á se alimentar nos elementos cribosos, aínda que poida que nalgún caso a punción nas células

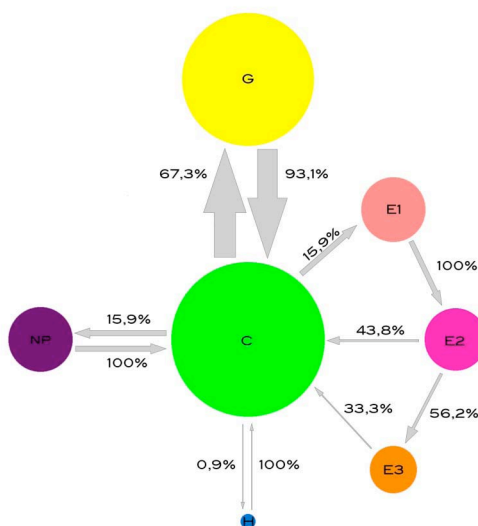


Figura 10: Diagrama de fluotación entre os distintos patróns. No diagrama cada círculo representa o número de veces que comeza cada un dos patróns no conxunto dos 20 rexistros, o grosor das flechas representa a relevancia de cada fluotación en concreto sobre o conxunto total de cambios de patrón e os valores representados a carón de cada unha das flechas a porcentaxe que supón ese cambio, sobre o total de cambios dende o patrón orixe das flechas. Elimináronse as fluotacións C-pd e pd-C dado que o seu volume impediría apreciar o resto de cambios.

PARÁMETRO	MEDIA	D.E.	PARÁMETRO	MEDIA	D.E.
nº de probas	1,80	1,01	dur. total de np (min)	20,4	27,0
nº de probas <3 min	0,20	0,41	dur. m. de np (min)	25,2	20,3
nº probas antes de E1	1,73	0,79	dur. de np nas 1 ^{as} 5 horas (min)	8,8	18,2
nº de probas antes de E3	1,67	0,87	dur. de np nas 2 ^{as} 5 horas (min)	7,9	18,0
nº probas despois do 1º E1	0	0	dur. de np nas 3 ^{as} 5 horas (min)	5,1	16,9
nº de probas despois do 1º E3	0	0	dur. de np nas 4 ^{as} 5 horas (min)	8,0	20,4
nº de floemas	0,85	0,88	dur. de np antes do 1º E1 (min)	29,3	22,1
nº de E3	0,45	0,51	dur. de np antes do 1º E3 (min)	28,3	26,8
nº de E1 independentes	0	0	relación temporal proba/non proba	3,3	7,0
nº de E1+E2I-E2II	0,40	0,68	dur. da 1ª proba (min)	671,8	551,5
nº de E1+E3	0	0	dur. total das probas (min)	1139,0	186,4
nº de E1+E2I-E2II+E3	0,45	0,51	dur. m. das probas (min)	800,5	382,5
nº de E1>10 min	0	0	dur. m. das probas >3min (min)	874,8	376,2
nº de E1+E2I-E2II>20 min	0,55	0,69	dur. total de C (min)	397,0	226,8
nº de E1+E2I-E2II>10 min	0,60	0,68	dur. m. de C entre pds (min)	6,3	1,8
nº de non-probas	0,85	0,99	dur. m. de C entre pds nas 1 ^{as} 5 horas (min)	5,3	1,8
nº de np nas 1 ^{as} 5 horas (1-5)	0,55	0,89	dur. m. de C entre pds nas 2 ^{as} 5 horas (min)	5,6	1,8
nº de np nas 2 ^{as} 5 horas (6-10)	0,10	0,31	dur. m. de C entre pds nas 3 ^{as} 5 horas (min)	7,6	2,8
nº de np nas 3 ^{as} 5 horas (11-15)	0,10	0,45	dur. m. de C entre pds nas 4 ^{as} 5 horas (min)	9,2	3,3
nº de np nas 4 ^{as} 5 horas (16-20)	0,10	0,31	dur. m. de C entre pds antes de E1 (min)	5,6	1,9
nº de np antes do 1º E1	0,82	0,75	dur. m. de C entre pds despois de E1 (min)	7,4	2,6
nº de np despois do 1º E1	0	0,00	dur. m. de C entre pds antes de E3 (min)	5,5	1,4
nº de np antes do 1º E3	0,78	0,83	dur. m. de C entre pds despois de E3 (min)	7,7	0,5
nº de np despois do 1º E3	0	0	dur. m. de C entre pds antes do 1º G (min)	5,5	1,9
nº de pds	58,6	38,02	dur. m. de C entre pds despois do 1º G (min)	7,6	3,1
nº de pds nas 1as 5 horas	27,1	16,41	dur. m. de C entre Gs (min)	5,9	4,4
nº de pds nas 2as 5 horas	10,2	13,50	dur. m. de C (min)	6,6	1,7
nº de pds nas 3as 5 horas	10,9	13,87	dur. total pds (min)	32,9	22,4
nº de pds nas 4as 5 horas	10,2	14,34	dur. m. pds (s)	32,6	6,5
nº de pds maiores ca 1 min	2,0	4,56	dur. m. das pds nas 1 ^{as} 5 horas (s)	27,7	3,5
nº de pds sen fase II	9,6	9,87	dur. m. das pds nas 2 ^{as} 5 horas (s)	31,4	8,8
nº de pds na 1ª proba	34,3	43,50	dur. m. das pds nas 3 ^{as} 5 horas (s)	39,3	10,3
nº de pds na 2ª proba	27,3	33,05	dur. m. das pds nas 4 ^{as} 5 horas (s)	47,8	9,1
nº de pds na 3ª proba	38,5	27,04	dur. m. das pds antes de E1 (s)	30,0	3,5
nº de pds na 4ª proba	29,5	38,89	dur. m. das pds despois de E1 (s)	47,5	11,8
nº de pds medio por proba	43,5	34,75	dur. m. das pds antes de E3 (s)	30,8	3,9
nº de pds antes do 1º E1	46,3	33,74	dur. m. das pds despois de E3 (s)	59,1	5,9
nº de pds despois do 1º E1	12,2	20,71	dur. m. das pds antes do 1º G (s)	28,4	5,3
nº de pds antes do 1º E3	44,5	31,48	dur. m. das pds despois do 1º G (s)	37,6	9,0
nº de pds despois do 1º E3	11,2	20,06	dur. m. das pds con fase 2 (s)	33,1	8,0
nº de pds antes do 1º G	21,6	19,33	dur. m. das pds sen pd2 (s)	33,3	10,7
nº de pds despois do 1º G	44,3	38,94	dur. m. da pd1 (s)	23,7	5,7
nº de pds sen pd2 antes do 1º E1	7,8	9,77	dur. m. da pd2 (s)	8,8	2,5
nº de pds sen pd2 despois do 1º E1	2,1	3,16	dur. m. da post-pd2 (s)	2,3	0,6
nº de pds sen pd2 antes do 1º E3	9,2	10,51	relación temporal C/pd	14,3	6,6
nº de pds sen pd2 despois do 1º E3	1,7	3,49	% de fase 2 nas pds	26,5	4,2
% de pds sen pd2	19,0	13,25	dur. m. de E1 (s)	19,4	6,8
% de pds sen pd2 antes do 1º E1	21,2	26,74	dur. m. de E2I-E2II (min)	18,3	17,0
% de pds sen pd2 despois do 1º E1	13,0	9,64	dur. m. de E3 (min)	657,2	334,6
% de pds sen pd2 antes do 1º E3	23,4	29,36	dur. m. de E (min)	449,9	384,9
% de pds sen pd2 despois do 1º E3	14,0	4,49	dur. total de E (min)	567,6	402,9
nº de G	3,6	3,79	dur. total de E1 (s)	30,5	14,1
nº de G por proba	2,3	2,04	dur. total de E2I-E2II (min)	29,4	30,7
nº de G antes de E1	1,3	1,86	dur. total de E3 (min)	657,2	334,6
nº de G despois do 1º E1	2,2	3,86	contribución de E1 ó total do floema (%)	1,1	2,4
nº de G antes de E3	1,0	1,58	contribución de E2I-E2II ó total do floema (%)	22,2	36,5
nº de G despois do 1º E3	0,67	1,66	contribución de E3 ó total do floema (%)	93,7	8,7

Táboa 2: Parámetros de descrición do comportamento alimentario de *P. citri*. Os valores representan as medias aritméticas coas súas correspondentes desviacións estándar para os parámetros temporais e numéricos que caracterizan o comportamento de *P. citri*. O índice de potencial E3 é a porcentaxe de tempo adicado a E3 dende o primeiro E3 do rexistro. (np: non-proba; dur.: duración; dur. m.: duración media; d.e.: desviación estándar; post-pd2: tempo que vai dende a fin da pd2 á fin da pd). (Continúa na páxina seguinte).

PARÁMETRO	MEDIA	D.E.	PARÁMETRO	MEDIA	D.E.
dur. do E1 do 1º E1-E2>10 min (s)	20,5	7,7	Tempos dende comezo da 1ª proba		
dur. total de E antes do 1º E3 (min)	33,3	33,2	tempo ata 1ª pd (min)	4,0	2,6
Índice de potencial E3 (%)	84,4	27,5	tempo ata 1ª pd sen pd2 (min)	16,6	24,4
dur. m. de G (min)	224,4	299,5	tempo ata 1ª E1 (min)	374,7	289,9
dur. total de G (min)	523,9	379,0	tempo ata 1ª E3 (min)	405,3	277,7
tempo medio entre Gs (min)	59,7	43,1	tempo ata 1º E1+E2>10 min (min)	419,8	309,9
dur. m. de H (min)	347,1	-	tempo ate 1ª G (min)	234,8	327,7
dur. total de H (min)	347,1	-	tempo ate 1ª H (min)	121,1	
% de rexistro en np	1,7	2,3	Tempos dende comezo da proba		
% de rexistro en proba	98,3	2,3	tempo ata 1ª pd (min)	5,6	2,9
% de rexistro en C	33,1	18,9	tempo ata 1ª pd sen pd2 (min)	19,0	24,6
% de rexistro en pd	2,7	1,9	tempo ata 1ª E1 (min)	310,1	226,9
% de rexistro en G	35,0	33,3	tempo ata 1ª E3 (min)	384,9	285,2
% de rexistro en H	1,4	6,5	tempo ata 1º E1+E2>10 min (min)	371,4	254,0
% de rexistro en E1	0,0	0,0	tempo ate 1ª G (min)	221,2	317,6
% de rexistro en E2I-22	1,3	2,2	tempo ate 1ª H (min)	121,1	
% de rexistro en E3	24,7	33,3	tempo dende última pd ata o 1º E1-	8,2	2,2
% de rexistro en E	26,0	34,3	E2>10 min (min)		

Táboa 2 (continuación): Parámetros de descrición do comportamento alimentario de *P. citri*.

acompañantes sexa abondo para a inoculación do virus (Prado & Tjallingii, 1994). Os resultados obtidos do estudio do comportamento alimentario de *P. citri* amosan unha gran variabilidade no que respecta ó floema: unhas non chegan a atinxilo e, das que si o conseguen, algunhas fano de seguida mentres que outras tardan un bo número de horas en facelo. Tendo en conta que no experimento só se teñen en conta as cochinillas que comezaron a se alimentar ó pouco das poñer na planta, non se posúe un dato real que nos indique canto tempo tardaría unha cochinilla escollida ó chou en chegar ó floema.

Polo aquí exposto parece que o comportamento alimentario das cochinillas algodonosas está condicionando fortemente a súa capacidade vectora. Os virus que transmite, ben sendo semipersistentes (Lockhart & Olszewski, 1994; La Notte *et al.*, 1997) ben sendo circulativos non replicativos (Cid *et al.*, 2007), van ver minguadas as probabilidades de se transmitir co paso do tempo.

Polo tanto o tempo adicado en chegar ó floema, ademais do tempo que tarde en comezar a alimentación, van ser, polo menos en parte as causas das baixas taxas de transmisión. No caso concreto do GLRaV-3, onde a presenza do virus nas glándulas salivais primarias induce a pensar que a inoculación é mediada pola inxección de saliva cargada de virus, as longas rutas ate acadar o floema van actuar ademais en detrimento da efectividade da transmisión. No caso de que as células das glándulas salivais nas que se detecta o virus estean implicadas na formación da saliva formadora da vaíña, os virións que causen a infección deberán escapar á coagulación da saliva para poder iniciar a infección. Se pola contra, e a diferenza do que ocorre cos pulgóns, as células nas que se detecta o virus están ligadas á formación da saliva acuosa, o que será verdadeiramente determinante será o número de pds, nas que é de esperar que, como ocorre nos pulgóns, a salivación sexa principalmente acuosa. En calquera dos dous casos a capacidade infecti-

va será inversamente proporcional á lonxitude da ruta empregada para acadar o floema, ben pola lonxitude da vaíña formada, ben polo número de células nas que se realizaron pds. Se o que se sabe ate o momento sobre a salivación dos hemípteros, con dúas clases distintas de saliva secretadas independentemente, é certo e, como parece, a inoculación do GLRaV-3 está ligada á saliva xelificante, a dificultade para a mobilización dos virus será o maior impedimento para a súa transmisión.

Bibliografía

- Ackonor, J. B. (2002) Current levels of incidence of parasitism and predation in *Planococcus citri* Risso (Homoptera: Pseudococcidae) in Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao* L.) farms. *Insect Science and its Application*, 22 (2), 105-112.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Martelli, G. P., Milne, R. G. & Fauquet, C. M. (2004) The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*, 149 (5), 1045-1060.
- Alvarez, A. E., Tjallingii, W. F., Garzo, E., Vleeshouwers, V., Dicke, M. & Vosman, B. (2006) Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 121 (2), 145-157.
- Ben-Dov, Y. (2007) ScaleNet. Pseudococcidae. Retrieved 17 August 2007 from <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>
- Bodenheimer, F. S. (1951) Citrus entomology in the Middle East. (The Hague: W. Junk)
- Brødsgaard, H. F. & Albajes, R. (2000) Insect and Mite Pests (In R. Albajes (ed) *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops* (pp. 48-60). Hingham, MA, USA: Kluwer Academic Publishers)
- Cabaleiro, C. & Segura, A. (1997a) Field transmission of *grapevine leafroll associated virus 3* (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. *Plant Disease*, 81, 283-287.
- Cabaleiro, C. & Segura, A. (1997b) Some characteristics of the transmission of grapevine leafroll associated virus 3 by *Planococcus citri* Risso. *European Journal of Plant Pathology*, 103 (4), 373-378.
- Calatayud, P. A., Seligmann, C. D., Polania, M. A. & Bellotti, A. C. (2001) Influence of parasitism by encyrtid parasitoids on the feeding behaviour of the cassava mealybug *Phenacoccus herreni*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 98 (3), 271-278.
- Calatayud, P. A., Rahbe, Y., Tjallingii, W. F., Tertuliano, M. & Leru, B. (1994) Electrically recorded feeding-behaviour of cassava mealybug on host and nonhost plants. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 72 (3), 219-232.
- Cid, M., Pereira, S., Cabaleiro, C., Faoro, F. & Segura, A. (2007) Presence of *Grapevine leafroll-associated virus 3* in primary salivary glands of the mealybug vector *Planococcus citri* suggests a circulative transmission mechanism. *European Journal of Plant Pathology*, 118 (1), 23-30.
- Cid, M., Pereira, S., Gago, P., Couceiro, C., Cabaleiro, C. & Segura, A. (2006) *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae) as GLRaV-3 vector. Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3 - 7 April 2006. South African Society for Enology and Viticulture, 252-253.
- Daane, K. M., Bentley, W., Walton, V. M., Malakar-Kuennen, R., Millar, J. A., Ingels, C. A., Weber, E. A. & Gispert, C. (2006) New controls investigated for vine mealybug. *California Agriculture, January-March*, 31-38.
- Febvay, G., Rahbé, Y. & van Helden, M. (1996) MacStylet, software to analyse electrical penetration graph on the Macintosh. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 80, 105-108.
- Gullan, P. J. & Kosztarab, M. (1997) Adaptations in scale insects. *Annual Review of Entomology*, 42, 23-50.
- Janssen, J. A. M., Tjallingii, W. F. & Lenteren, J. C. (1989) Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 52, 69-81.
- Jiang, Y. X. & Walker, G. P. (2003) Electrical penetration graphs of the nymphal stage of *Bemisia*

- argentifolii*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 109 (2), 101-111.
- Jiang, Y. X., Lei, H., Collar, J. L., Martin, B., Muniz, M. & Fereres, A. (1999) Probing and feeding behaviour of two distinct biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. *Journal of Economic Entomology*, 92 (2), 357-366.
- Johnson, D. D. & Walker, G. P. (1999) Intracellular punctures by the adult whitefly *Bemisia argentifolii* on DC and AC electronic feeding monitors. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 92, 257-270.
- Kindt, F., Joosten, N. N. & Tjallingii, W. F. (2006) Electrical penetration graphs of thrips revised: combining DC- and AC-EPG signals. *Journal of Insect Physiology*, 52 (1), 1-10.
- Kubiriba, J., Legg, J. P., Tushemereirwe, W. & Adipala, E. (2001) Vector transmission of *Banana streak virus* in the greenhouse in Uganda. *Annals of Applied Biology*, 139 (1), 37-43.
- La Notte, P., Buzkan, N., Choueiri, E., Minafra, A. & Martelli, G. P. (1997) Acquisition and transmission of *grapevine virus A* by the mealybug *Pseudococcus longispinus*. *Journal of Plant Pathology*, 79, 79-85.
- Laflin, H. M. & Parrella, M. P. (2004) Developmental biology of citrus mealybug under conditions typical of California rose production. *Annals of the Entomological Society of America*, 97 (5), 982-988.
- Lei, H., Tjallingii, W. F. & van Lenteren, J. C. (1995) Recording of EPGs and honeydew excretion by the greenhouse whitefly *Bemisia* 1995: *Taxonomy, Biology, Damage Control and Management* (pp. 53-68)
- Lockhart, B. E. & Olszewski, N. E. (1994) Badnavirus group (In R.G. Webster & A. Granoff (eds) *Encyclopedia of Virology* (pp. 516). New York: Academic Press)
- Lockhart, B. E. L., KiratiyaAngul, K., Jones, P., Eng, L., DeSilva, P., Olszewski, N. E., Lockhart, N., Deema, N. & Sangalang, J. (1997) Identification of *Piper yellow mottle virus*, a mealybug-transmitted badnavirus infecting *Piper spp.* in Southeast Asia. *European Journal of Plant Pathology*, 103 (4), 303-311.
- Lucas Espadas, A. (2002) Comportamiento de melazo (*Pseudococcus citri* Risso) en uva de mesa en la Región de Murcia. Alternativas de control biológico. *Phytoma-España*, 138, 28-36.
- Martelli, G. P., Agranovsky, A. A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R. H. A., Dolja, V. V., Falk, B. W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A. V., Minafra, A., Namba, S., Vetter, H. J., Wisler, G. C. & Yoshikawa, N. (2002) The family Closteroviridae revised. *Archives of Virology*, 147 (10), 2039-2044.
- McLean, D. L. & Kinsey, M. G. (1964) A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. *Nature* (4939), 1358-1359.
- Nault, L. R. (1997) Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America*, 90, 521-541.
- Phillips, S., Briddon, R. W., Brunt, A. A. & Hull, R. (1999) The partial characterization of a badnavirus infecting the Greater Asiatic or water yam (*Dioscorea alata*). *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*, 147 (5), 265-269.
- Posnette, A. F. & Strickland, A. H. (1948) Virus diseases of cacao in West Africa .3. Technique of insect transmission. *Annals of Applied Biology*, 35 (1), 53-63.
- Prado, E. & Tjallingii, W. F. (1994) Aphid activities during sieve element punctures. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 72 (2), 157-166.
- Roivainen, O. (1980) Mealybugs. (In K.F. Harris & K. Maramorosch (eds) *Vectors of plant pathogens* (pp. 15-38). New York: Academic Press)
- Ruiz Castro, A. (1965) Plagas y enfermedades de la vid. (Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agronomicas)
- Santa-Cecilia, L. V. C. (2003) Interação cochonilha (Pseudococcidae)-planta avaliada mediante estudos biológicos e da técnica de "Electrical Penetration Graphs" (EPG). Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.
- Spiller, N. J., Koenders, L. & Tjallingii, W. F. (1990) Xylem ingestion by aphids - a strategy for maintaining water balance. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 55, 101-104.
- Staver, C., Guharay, F., Monterroso, D. & Muschler, R. (2001) Designing pest-suppressive multistrata perennial crop systems: shade-grown coffee in Central America. *Agroforestry Systems*, 53 (2), 151-170.
- Tjallingii, W. F. (1985) Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid

- stylets. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 38, 187-193.
- Tjallingii, W. F. (1988) Electrical Recording of Stylet Penetration Activities. (In A.K. Minks & P. Harewiin (eds) *Aphids: Their biology, natural enemies and control* (pp. 95-108). Amsterdam: Elsevier)
- Tjallingii, W. F. & Gabrys, B. (1999) Anomalous stylet punctures of phloem sieve elements by aphids. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 91, 97-103.
- Walker, G. P. (2000) A beginner's guide to electronic monitoring of homopteran probing behaviour. (In G.P. Walker & E.A. Backus (eds) *Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behaviour* (pp. 14-40). Lanham, MD: Thomas Say Publications in Entomology/Entomological Society of America)
- Walton, V. M. & Pringle, K. L. (2004) A survey of mealybugs and associated natural enemies in vineyards in the Western Cape Province, South Africa. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 25 (1), 23-25.

Discusión

O virus 3 do enrolado da vide (GLRaV-3) é o virus de vide con maior incidencia, aparecendo en tódalas rexións vitícolas do mundo (Martelli & Boudon-Padieu, 2006). Ate o momento só o home e as cochinillas teñen demostrado ser vectores deste virus. O home actúa coma vector ó mover material vexetal infectado e realizar enxertos con el. Vai ser, polo tanto, o causante do desprazamento a grandes e medias distancias do virus (Martelli & Boudon-Padieu, 2006). A cochinilla vai ser a responsable da dispersión do virus dentro das parcelas ou entre parcelas veciñas (Cabaleiro & Segura, 1997a, 2006).

En laboratorio foi posible probar a transmisión deste virus por un bo número de cochinillas, 9 algodonosas e 1 escamosa, unhas cunha única xeración anual e outras con varias, que segundo algúns autores poden chegar a ser 8 se a climatoloxía do ano lles é propicia.

A efectividade dos ensaios de transmisión de virus realizados con cochinillas varía en grande medida en función do ensaio e do método e precisión empregada (Posnette & Strickland, 1948). A efectividade dos ensaios de transmisión co GLRaV-3 é moi variable en función da especie de cochinilla (Golino *et al.*, 2002; Petersen & Charles, 1997; Krüger *et al.*, 2006), sendo especialmente baixa para o caso de *P. citri* (Cabaleiro & Segura, 1997b; Golino *et al.*, 2002). De todos modos os experimentos soen estar realizados con pouco número de repeticións co que a variabilidade é grande aínda entre experimentos realizados mesmo grupo (Golino *et al.*, 2002). Estas variabilidades nas taxas de transmisión foron tamén detectadas para outros virus transmitidos por cochinillas (Roivainen, 1980) todos eles restrinxidos ó floema.

A dispersión do GLRaV-3 en campo ligada á presenza de cochinillas descritas coma vectores está amplamente verificada (Engelbrecht & Kasdorf, 1990; de Borbon, 2004; Pietersen, 2004) incluso para vectores de escasa efectividade como é o caso de *P. citri* (Cabaleiro & Segura, 1997a, 2006). Polo atopado nos nosos traballos de campo os desprazamentos de cochinillas nas plantas conducidas en emparrado están principalmente enmarcados dentro da parte leñosa da planta. Só unha pequena parte das cochinillas, coincidindo con niveis de infestación elevados nas pólas de varios anos, se dirixen á parte verde e nelas só colonizan a parte máis próximas ás zonas lignificadas. Aínda que é frecuente que as polas verdes de distintas plantas se entrecrucen a distancia entre a as partes leñosas, que son utilizadas como acubillo polas cochinillas, é maior que noutros tipos de conducción. Malia iso, como describen Cabaleiro e Segura (2006), o incremento no número de plantas infectadas é rápido. É probable que o desprazamento de vectores durante accións de cultivo e o movemento entre restos de poda infestados e outros pés de planta vaian actuar como factores antrópicos que favorezan a dispersión da enfermidade. Así pois deben ser analizados e minimizados para evitar a expansión do virus.

Outro factor que pode ter efecto sobre a evolución da enfermidade é a aparición de incrementos das poboacións de cochinillas ligados a condicións climáticas. A consecución de

invernos suaves e con poucas precipitacións e de veráns calorosos pero húmidos poden dar lugar a fortes incrementos dos niveis de infestación. Estes van dar lugar a unha maior colonización da parte verde e movemento activo entre plantas, e aumentarán a probabilidade de que os movementos pasivos teñan lugar. Deberían pois adicarse esforzos en reducir as poboacións hibernantes, sobre todo en anos de invernos suaves, para o que o escascado e a aplicación de auga nos troncos pode ser de grande utilidade.

Ademais da dispersión do GLRaV-3 en presenza de cochinillas, en parcelas sen estas detectáronse incrementos semellantes na incidencia do virus (Habili *et al.*, 1995; Habili & Nutter, 1997; Cabaleiro & Segura, 1997a). Isto pode ser debido a dúas causas: á existencia de vectores alternativos (Habili *et al.*, 1995) ou á formación de enxertos naturais (Pietersen, 2004). Os vectores alternativos poden ser tanto cochinillas subterráneas coma algún outro organismo, probablemente subterráneo, non detectado ate o momento. Isto concordaría coa evolución temporal que presentan estas parcelas nas que se dá un primeiro tramo de aumento lixeiro da incidencia, outro posterior de forte incremento e finalmente outro de lixeiro incremento (Habili & Nutter, 1997). Os enxertos naturais estableceranse entre as raíces, que entran en contacto e que co crecemento se anastomosean dando lugar á fusión dos feixes vasculares e transmisión do virus. Este mecanismo de transmisión foi descrito xa para o fungo *Ceratocystis fagacearum* infectando *quercus* de xeito natural (Wilson & Lester, 2002) e para o *Apple mosaic virus* infectando plantas de lúpulo en condicións de laboratorio en maceita (Pethybridge *et al.*, 2002).

O papel das cochinillas alodonosas como vectores do GLRaV-3 en condicións naturais tense demostrado como seguro (Pietersen, 2004). Sen embargo nalgúns casos os datos obtidos ate o momento (Habili *et al.*, 1995; Habili & Nutter, 1997; Cabaleiro & Segura 1997a) fan supoñer que a dispersión natural do virus presente algún mecanismo suplementario que poida explicar a transmisión en ausencia de vectores. As relativamente altas taxas de dispersión en parcelas de baixa infestación (Cabaleiro & Segura, 1997a, 2006) seguen sendo un fenómeno de explicación incerta. Poida que o funcionamento simultáneo da transmisión por cochinillas e do mecanismo suplementario dean lugar a esas taxas de infección.

As cochinillas amosan unha capacidade de retención do virus non especialmente baixa, aínda que varía segundo a especie: entre as 72-96 horas para *P. citri* (Cid *et al.*, 2006) e *Pseudococcus longispinus* (Krüger *et al.*, 2006) e ata 8 días alimentándose nun non hospedador do virus para *Planococcus ficus* (Krüger *et al.*, 2006). Sen embargo a transmisión presenta un límite temporal moito máis reducido. Para *P. citri* está descrito que só o cambio inmediato de planta infectada a sa permite a transmisión (Cabaleiro & Segura, 1997b), e para *P. ficus* 48 horas de alimentación en planta non hospedadora son o máximo para que a transmisión teña lugar (Krüger *et al.*, 2006).

O estudio do comportamento alimentario de *P. citri* amosounos que dende o momento en que a cochinilla clava o estilete na planta ata que acada o floema poden transcorrer tempos moi variables. En moitos dos casos o atraso na chegada ó floema é debido a que empregan moito tempo en se alimentar no xilema malia a que están descritos como insectos comedores

de floema. Cando a cochinilla está alimentándose en xilema non se produce excreción polo que, como fan os pulgóns (Spiller *et al.*, 1990), está reaxustando o seu nivel hídrico. As cochinillas son capaces de variar apreciablemente o seu volume hídrico. Os desprazamento entre plantas, sobre todo cando supoñan un gasto considerable de tempo, van facer que presenten un certo grao de deshidratación. Isto fará que se alimenten primeiramente do xilema, atrásándose a chegada ó floema e reducíndose a eficiencia da transmisión. O grao de deshidratación será maior nas ninfas dos primeiros estadios xa que a maior relación superficie/volume e a máis delgada capa de ceras favorece a transpiración. As cochinillas durante os primeiros estadios establecen máis sinxelamente os puntos de alimentación en zonas desprotexidas. As adultas prefiren, en base ó observado, situarse en zonas de difícil acceso nas que se sentir protexidas antes que en zonas próximas ós nervios medios das follas. No caso dos movementos activos entre plantas as ninfas se situarán en zonas máis expostas, xeralmente órganos verdes, mentres que as cochinillas adultas tenderán a busca acubillo baixo a casca dos órganos ben lignificados. Así as adultas farán percorridos máis longos ate chegar a fixar o seu novo punto de alimentación co que a eficacia transmisora será máis reducida. Por outro lado o seu grande volume confírelle unha resistencia á desecación da que carecen as ninfas, moito máis sensibles (Bodenheimer, 1951), o que lles permitirá abordar desprazamentos máis longos podendo entón acadar unha nova planta susceptible de ser infectada.

A aparición de virións nas glándulas salivais primarias das cochinillas parece indicar un mecanismo de transmisión circulativo. Se ben, aínda que sexa de tipo circulativo, os parámetros temporais que o caracterizan se poderían corresponder perfectamente cunha transmisión semipersistente xa que nun poucos días perden a capacidade de transmitir o virus adquirido. Podería polo tanto ser considerado coma un virus circulativo no que atinxe á dinámica do virus dentro do insecto pero semipersistente no tocante ós parámetros temporais.

No caso de, como apuntan as probas, ser circulativo o tempo de mantemento da infectividade vai vir dado principalmente por 3 parámetros:

- Título viral acadado: canto maior sexa a cantidade de virus filtrados a partir do floema da planta onde adquiriu máis tempo tardará en perdelos completamente coa saliva. O título viral acadado polo insecto vai estar en función do título viral que presente a planta fonte de virus. A diferenza dos Closterovirus o grado de acumulación do GLRaV-3 nos tubos cribosos é baixo (Faoro, 1997). Polo tanto, ademais do título viral xeral da planta, o nivel de virus adquirido vai estar en función dos virións presentes no elemento criboso concreto no que a cochinilla insire os estiletos durante a súa alimentación.

- Velocidade de degradación dos virións: a velocidade de degradación dos virións dentro da cochinilla vai marcar un tempo límite para que se produza a transmisión. A detección en cochinilla se produce ata 8 días despois de finalizar a adquisición. Nun primeiro momento o virus se detecta preferentemente nas glándulas salivais pero é posible que posteriormente sexa adquirido dende a hemolinfa por algúns outros órganos que actúen coma reservorios nos que o virus pode ser detectado pero permanece bloqueado de cara á súa transmisión. Tampouco está claro se o órgano de almacenamento do virus son as glándulas salivais ou ben se o pro-

pio intestino pode desenvolver esa función. Polo tanto habería que determinar a permanencia do virus nos distintos órganos da cochinilla para ter unha idea da resistencia dos virións fronte a degradación dentro do corpo da cochinilla.

– Velocidade de secreción: o tipo de secreción salival que se realice durante a alimentación e a participación das células portadoras do virus na súa síntese van determinar o tempo que tarda a cochinilla en secretar totalmente o virus adquirido. Para os pulgóns que presentan unhas glándulas salivais máis sinxelas con só dous lóbulos están descritos dous tipos de salivas (Miles, 1999): a xelificante empregada para a formación da vaíña pola que avanzan os estiletos, e a acuosa que está relacionada coa neutralización da reacción de defensa das células da planta lesionadas polos estiletos (Will *et al.*, 2007). Así durante o avance intercelular a saliva secretada sería principalmente xelificante e durante as puncións celulares e floemáticas sería acuosa. Pouco se sabe sobre a saliva das cochinillas formada en glándulas salivais moito máis complexas con 8 lóbulos. Estas presentan un lóbulo análogo á glándula salival accesoria dos pulgóns, tanto en forma coma en estrutura interna (datos sen publicar), polo que podería ser factible a mesma dualidade que se dá nos pulgóns. De ser así durante a fase 1 das pds, así como durante a fase floemática caracterizada polo patrón E1 e poida que polo E2, secretaría saliva acuosa, e durante o avance intercelular, que representa o patrón C, secretaría basicamente saliva xelificante. Polo tanto, se como supomos as células nas que se detectou a presenza dos virións están relacionadas coa síntese da saliva xelificante, e esta se secreta unicamente no avance intercelular, grande parte da carga viral da cochinilla se perdería durante o avance estiletar. Así a capacidade infectiva diminuiría coa duración do período de avance intercelular e consecuentemente co gasto de saliva xelificante.

Estes tres parámetros estarían marcando a permanencia do virus ata o momento en que se produza a chegada ó floema e poida ser inoculado. Sen embargo, se os virións se secretan coa saliva xelificante, tería que producirse a solubilización dalgunha das partículas virais para que puidese chegar ate o interior do tubo criboso ou das células acompañantes e poder así infectar a planta. Isto faría que a infección só se producise nunhas poucas das chegadas das cochinillas con virus ó floema, o que parece contradicir as altas taxas de transmisión detectadas nalgúns casos (Krüger *et al.*, 2006).

A extrapolación das teorías deseñadas para pulgóns parece non axeitarse ós resultados obtidos para cochinillas. Tres razóns poderían facer que para o caso das cochinillas a infectividade chegase a ser tan alta nalgúns casos. Un deles sería a non diferenciación entre os dous tipos de saliva e que fose realmente un con diferente comportamento en función das características oxido-redutoras do medio. Outro sería que a saliva acuosa estea formada pola achega da glándula salival accesoria e por algúns lóbulos máis entre os que se atoparía aquel no que se detecta a presenza do virus. O terceiro sería que de xeito análogo ó que sucede cos virus de transmisión semipersistente e non persistente (Ng & Falk, 2006) existan receptores con unión específica para os virus. Dese modo os virus quedarían adheridos a eles durante a salivación xelificante pero sería despois, durante a salivación acuosa, dentro das células e dos tubos cribosos, cando se liberarían podendo dar lugar á infección cando se trate das células adecua-

das. Outros virus da familia Closteroviridae, como o crinivirus *Lettuce infectious yellows virus*, transmítense de modo semipersistente mediante a unión específica da copia diverxente da proteína da cápside á cutícula dos estiletes sen a intermediación de proteínas axudantes (Tian *et al.*, 1999; Ng & Falk, 2006)

Bibliografía

- Bodenheimer, F. S. (1951) Citrus entomology in the Middle East. (The Hage: W. Junk)
- Cabaleiro, C. & Segura, A. (1997a) Field transmission of *grapevine leafroll associated virus 3* (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. *Plant Disease*, 81, 283-287.
- Cabaleiro, C. & Segura, A. (1997b) Some characteristics of the transmission of grapevine leafroll associated virus 3 by *Planococcus citri* Risso. *European Journal of Plant Pathology*, 103 (4), 373-378.
- Cabaleiro, C. & Segura, A. (2006) Temporal analysis of *grapevine leafroll associated virus 3* epidemics. *European Journal of Plant Pathology*, 114 (4), 441-446.
- Cid, M., Pereira, S., Gago, P., Couceiro, C., Cabaleiro, C. & Segura, A. (2006) *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae) as GLRaV-3 vector. Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3 – 7 April 2006. South African Society for Entology and Viticulture, 252-253.
- de Borbon, C. M., Gracia, O. & Talquenca, G. S. G. (2004) Mealybugs and *grapevine leafroll-associated virus 3* in vineyards of Mendoza, Argentina. *American Journal of Entology and Viticulture*, 55 (3), 283-285.
- Engelbrecht, D. J. & Kasdorf, G. G. F. (1990) Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the mealybug, *Planococcus ficus*. *Phytophylactica*, 22, 341-346.
- Faoro, F. (1997) Cytopathology of closteroviruses and trichoviruses infecting grapevines. (In P.L. Monette (ed) *Filamentous viruses of woody plants* (pp. 29-47). Trivandrum, India: Research Signpost)
- Golino, D. A., Sim, S. T., Gill, R. & Rowhani, A. (2002) California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. *California Agriculture*, 56, 196-201.
- Habili, N. & Nutter, F. W. (1997) Temporal and spatial analysis of *grapevine leafroll-associated virus 3* in Pinot Noir grapevines in Australia. *Plant Disease*, 81 (6), 625-628.
- Habili, N., Fazeli, C. F., Ewart, A., Hamilton, R., Cirami, R., Saldarelli, P., Minafra, A. & Rezaian, M. A. (1995) Natural spread and molecular analysis of *Grapevine Leafroll-Associated Virus-3* in Australia. *Phytopathology*, 85 (11), 1418-1422.
- Krüger, K., Saccaggi, D. & Douglas, N. (2006) *Grapevine leafroll-associated virus 3*-vector interactions: Transmission by the mealybugs *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudococcidae). Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3 – 7 April 2006. South African Society for Entology and Viticulture, 130-131.
- Martelli, G. P. & Boudon-Padieu, E. (2006) Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine: Bibliographic report 1998-2004. (Bari: CIHEAM)
- Miles, P. W. (1999) Aphid saliva. *Biological Reviews*, 74 (1), 41-85.
- Ng, J. C. K. & Falk, B. W. (2006) Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 183-212.
- Petersen, C. L. & Charles, J. G. (1997) Transmission of grapevine leafroll-associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. *Plant Pathology*, 46, 509-515.
- Pethybridge, S. J., Wilson, C. R., Hay, F. S., Leggett, G. W. & Sherriff, L. J. (2002) Mechanical transmission of *Apple mosaic virus* in Australian hop (*Humulus lupulus*) gardens. *Annals of Applied Biology*, 141 (1), 77-85.
- Pietersen, G. (2004) Spread of Grapevine Leafroll Disease in South Africa - a difficult, but not insurmountable problem. *Wynboer: A Technical Guide for Wine Producers, June 2004*.
- Posnette, A. F. & Strickland, A. H. (1948) Virus diseases of cacao in West Africa .3. Technique of insect transmission. *Annals of Applied Biology*, 35 (1), 53-63.

Discusión

- Roivainen, O. (1980) Mealybugs. (In K.F. Harris & K. Maramorosch (eds) *Vectors of plant pathogens* (pp. 15-38). New York: Academic Press)
- Spiller, N. J., Koenders, L. & Tjallingii, W. F. (1990) Xylem ingestion by aphids - a strategy for maintaining water balance. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 55, 101-104.
- Tian, T. Y., Rubio, L., Yeh, H. H., Crawford, B. & Falk, B. W. (1999) *Lettuce infectious yellows virus*: in vitro acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of General Virology*, 80, 1111-1117.
- Will, T., Tjallingii, W. F., Thonnessen, A. & van Bel, A. J. E. (2007) Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (25), 10536-10541.
- Wilson, A. D. & Lester, D. G. (2002) Trench inserts as long-term barriers to root transmission for control of oak wilt. *Plant Disease*, 86 (10), 1067-1074.

Conclusións

Planococcus citri presenta escasa mobilidade entre as plantas do viñedo presentando unha distribución moi irregular e facendo pouco probable que o aumento de incidencia do virus 3 do enrolado (GLRaV-3) sexa exclusivamente debido a elas.

O período de actividade da *Planococcus citri* vai dende finais de xullo ate decembro ou xaneiro. Presenta fortes picos poboacionais a principios de temporada e partir dese momento as poboacións se manteñen en niveis baixos.

Planococcus citri presenta, no sistema estudado, 2 ou 3 xeracións consecutivas no ano aínda que a asincronía entre individuos fai que aparezan múltiples picos poboacionais e que no mesmo momento aparezan individuos en distintos estadios.

O GLRaV-3 é o primeiro membro da familia Closteroviridae que se detecta nas glándulas salivais primarias dun vector seu, *Planococcus citri*. O virus 1 do enrolado da vide (GLRaV-1), que non é transmitido por esta cochinilla, non aparece nas glándulas salivais. Isto suxire un mecanismo de transmisión de tipo circulativo, que probablemente sexa común ó resto dos ampelovirus transmitidos por cochinillas.

Descríbense os patróns de onda asociados coas distintas actividades alimentarias realizadas por *Planococcus citri*, que son semellantes os descritos para outras cochinillas algodonosas.

A estrutura das probas alimentarias de *Planococcus citri* é moi variable. A maioría das cochinillas permanecen parte do tempo de rexistro alimentándose no xilema. Entre a sexta e a vixésima hora un terzo das cochinillas se atopan alimentándose de floema. O tempo medio ate acadar o floema é de 6,25 horas

Abreviaturas

µl	microlitro
a.n.e.	antes da nosa era
AC	corrente alterna
cm	centímetro
cv.	cultivar
d.e.	desviación estándar
Da	dalton
DC	corrente contínua
emf	forza electromotriz
EPG	gráficas eléctricas de penetración
<i>et al.</i>	e outros
GΩ	xigaohmio
GLRaV	virus do enrolado da vide
GVA	virus A da vide
GVB	virus B da vide
h	hora
Ha	hectárea
IC-RT-PCR	inmunocaptura-retrotranscriptasa-reacción en cadea da polimerasa
K	kilodaltons
Kb	kilobase
KDa	kilodaltons
km	kilómetro
m	metro
M	molar
min	minuto
ml	mililitro
nm	nanómetro
nt	nucleótido
°C	grao centígrado
°D	grao-día
ORF	secuencia de lectura aberta
pA	picoamperio
PCR	reacción en cadea da polimerasa
pd	punción celular
R	resistencia
RNA	ácido ribonucleico
s	segundo
sp.	especie
spp.	especies
Tm	tonelada métrica

