

Figura 1. *Neophilaenus campestris*. A) Ninfa. B) Adulto.

Capacidad de dispersión de *Neophilaenus campestris*, vector de *Xylella fastidiosa*. ¿Realmente se desplazan solamente 100 metros?

Neophilaenus campestris (Hemiptera: Cercopoidea) ha sido identificado recientemente como uno de los insectos vectores capaces de transmitir *Xylella fastidiosa* a olivo, lo que supone una grave amenaza para la agricultura española. Uno de los aspectos fundamentales para la expansión de la bacteria es la capacidad de desplazamiento de sus insectos vectores. Por tanto, en este estudio se han realizado dos ensayos para conocer la capacidad de dispersión de estos insectos.

Por un lado, se ha realizado un ensayo de captura-marcaje-recaptura utilizando polvos fluorescentes para conocer el movimiento y capacidad de dispersión de *N. campestris*. Los resultados muestran que *N. campestris* es capaz de desplazarse al menos 2.473 m en 35 días desde olivares hasta espacios naturales poblados de pinos.

También se ha realizado un ensayo de movimiento direccional de especies de vectores potenciales de *X. fastidiosa* entre olivares y otros cultivos. Los resultados muestran que la mayoría de vectores se desplazan entre un olivar y un viñedo adyacente. Además, el movimiento de los insectos fue descendiendo progresivamente cuando la vegetación de cubierta comenzó a secarse.

Estos resultados sugieren que habría que revisar las medidas de control basadas en arrancar de raíz plantas, infectadas o no, con *X. fastidiosa* en un radio de 100 m, ya que los vectores tienen una capacidad de dispersión mucho mayor.

Palabras clave: Captura-marcaje-recaptura, migración, polvos fluorescentes, insecto vector, *Pinus pinea*, *Pinus halepensis*.

C. Lago^{1,2*}, M. Morente^{3*}, D. De las Heras-Bravo³, A. Marti Campoy⁴, F. Rodríguez-Ballester⁴, M. Plaza¹, A. Moreno¹ y A. Ferreres¹

¹Instituto de Ciencias Agrarias – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICA-CSIC) Madrid, España.

²Departamento de Producción Agraria, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAAB), Universidad Politécnica de Madrid (UPM) Madrid, España.

³Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), Alcalá de Henares (España).

⁴Instituto de Tecnologías de la Información y Comunicaciones (ITACA), Universitat Politècnica de València, Valencia, España.

*Ambas autoras han colaborado de igual forma en este trabajo.

dosier

| *Xylella fastidiosa* |

Xylella fastidiosa Wells (1984) es una bacteria fitopatógena causante de enfermedades graves e incurables. En campo, se propaga únicamente por vectores que se alimentan de savia xilemática, conocidos coloquialmente como cigarrillas. Los insectos responsables de la transmisión de esta bacteria pertenecen, dentro del orden Hemiptera, al suborden Cicadomorpha. Concretamente a las superfamilias: Cicadoidea, Cercopoidea y dentro de la familia Cicadellidae a la subfamilia Cicadellinae. En América existen multitud de vectores que pertenecen a la subfamilia Cicadellinae; sin embargo, en Europa la mayoría de vectores potenciales se enmarcan dentro de la superfamilia Cercopoidea (EFSA, 2019). Dentro de la familia Aphrophoridae (Hemiptera: Cercopoidea), *Philaenus spumarius* L. (1758) ha sido identificado como el principal vector europeo. Además, recientemente se ha demostrado que tanto *Neophilaenus campestris* Fallen (1805) como *Philaenus italosignus* Drosopoulos & Remane (2000) son capaces de transmitir *X. fastidiosa* a plantas de olivo en condiciones de laboratorio, sumándose así a la lista de vectores europeos (Cavaliere y col., 2019). *Neophilaenus campestris* es una especie de cigarrilla ampliamente distribuida en España, colonizando principalmente varias especies de gramíneas que crecen bajo los olivares (Morente y col., 2018), por lo que debe considerarse como una grave amenaza para varios cultivos de vital importancia en nuestro país tales como el olivo, el almendro o la vid. No obstante, cabe destacar que cualquier Cicadomorpha que se alimente de xilema podría actuar como potencial vector de la bacteria.

Uno de los elementos clave para la expansión de enfermedades transmitidas por insectos es la capacidad de dispersión del vector. En el caso de los juveniles (ninfas) de *N. campestris* y *P. spumarius* (Figura 1A), su movilidad se encuentra muy limitada y se desplazan cubriendo cortas distancias entre las distintas especies herbáceas en las que habitan. Sin embargo, cuando pasan a ser adultos (Figura 1B), su capacidad de dispersión y su polifagia aumenta y se desplazan volando, saltando o caminando arrastrando las patas traseras.



Figura 2. Esquema del ensayo de captura-marcaje-recaptura.

Estos insectos pasan la mayor parte de su vida moviéndose y alimentándose sobre la vegetación espontánea de cubierta tanto en los cultivos como en zonas de monte. En verano, cuando la vegetación se seca, se ven obligados a migrar en busca de alimento y refugio, por lo que se desplazan a zonas con plantas leñosas perennes u otras especies que se mantienen verdes en verano. Tras las lluvias otoñales, cuando la vegetación de cubierta de cultivos leñosos como el olivo rebrota, estos insectos regresan para poner los huevos. En el caso de *N. campestris*, suelen colocar sus huevos en áreas donde las gramíneas comienzan a rebrotar tras las primeras lluvias otoñales (Morente y col., 2018).

Una de las medidas implementadas por la Comisión Europea para luchar contra la dispersión de *X. fastidiosa* consiste en que, al detectar una planta infectada, se deben arrancar de raíz, de forma obligatoria, tanto las plantas infectadas como las plantas huéspedes que se encuentren en un radio de 100 m, independientemente de si están infectadas o no (Comisión Europea, 2019). Esta medida se fundamenta en el estudio de Weaver y King (1954) en el que se observa que *P. spumarius* es capaz de desplazarse 30 m en un solo vuelo y hasta 100 m en 24 h. No obstante, hay estudios que muestran capturas de Aphrophoridos a altitudes que alcanzan los 200 m (Reynolds y col., 2017). Esto sugiere que los vectores de *X. fastidiosa* podrían ser transportados de forma pasiva largas

distancias por medio de corrientes aéreas. Actualmente, no existe una información precisa de la capacidad de dispersión de estos insectos, por lo que resulta fundamental estudiar hacia dónde migran, las plantas que utilizan como refugio estival y la distancia que son capaces de recorrer.

Para ello, nuestro equipo ha realizado un extenso estudio de movimiento y capacidad de dispersión de vectores potenciales de *X. fastidiosa*. En este trabajo se muestran los resultados más relevantes de dicho estudio, desarrollado en el Instituto de Ciencias Agrarias - CSIC en colaboración con el Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) y el Instituto de Tecnologías de la Información y Comunicaciones (ITACA), Universitat Politècnica de València.

Material y métodos

Ensayo de captura-marcaje-recaptura de *Neophilaenus campestris*

Se realizó un ensayo en campo de captura-marcaje-recaptura para estudiar hacia dónde migran y la distancia que los adultos de *N. campestris* son capaces de recorrer (Figura 2).

Este ensayo tuvo lugar en Santos de la Humosa, Madrid. Se seleccionaron cuatro olivares como puntos de suelta de los vectores y se utilizaron cuatro colores fluorescentes: rosa, azul, amarillo y naranja para marcar los insectos capturados (un color por cada olivar) (Figura 3). Los olivares selec-

cionados presentaban vegetación de cubierta y se encontraban a unos 200 m de distancia unos de otros. Se capturaron 1315 adultos de *N. campestris* mediante manguero sobre la vegetación de cubierta presente en dichos olivares. El total de insectos capturados se dividió en cuatro grupos de marcaje y suelta (uno por olivar y color). Así, cada grupo de insectos se tiñó de un color diferente según el olivar en que fueron liberados. Los insectos marcados se liberaron sobre la vegetación de cubierta del olivar correspondiente. Transcurridos veinte días desde la suelta, coincidiendo con la senescencia de las cubiertas vegetales en la zona de estudio se realizó la primera recaptura. Posteriormente, se continuaron realizando recapturas de forma periódica hasta 43 días después de la suelta. Se realizaron batidas con manga entomológica en doce áreas concretas previamente seleccionadas alrededor de los olivares. El objetivo de dichas batidas era recapturar los insectos marcados y calcular la distancia que habían recorrido desde los lugares de suelta. Los puntos de recaptura seleccionados presentaban plantas que podían ser huéspedes estivales de los vectores de *X. fastidiosa*, tales como pinos, almendros, coscojas, quejigos, retamas, hinojo o cardo corredor. Estos puntos de recaptura se encontraban a una distancia de entre 94 m y 2.754 m de los olivares donde se liberaron los insectos marcados. Debido al tiempo transcurrido entre la suelta y la recaptura, los insectos marcados habían perdido parte del color y no se podían distinguir a simple vista. Por ello, los insectos recapturados se llevaron al laboratorio y se expusieron a luz ultravioleta para comprobar si estaban realmente marcados con fluorescente o no.

¿Afecta el polvo a la tasa de supervivencia o a la capacidad de vuelo de estos insectos?

Antes de realizar el ensayo de captura-marcaje-recaptura, se realizaron dos ensayos para comprobar si el polvo fluorescente afectaba a *N. campestris*. En primer lugar se evaluó el efecto del polvo sobre la supervivencia y posteriormente se evaluó su efecto en el potencial de vuelo.



Figura 3. Adulto de *Neophilaenus campestris* marcado de naranja.

Para el ensayo de supervivencia se seleccionaron doscientos adultos de *N. campestris*. Se marcaron cuarenta insectos de cada color y otros cuarenta se dejaron sin marcar. Estos insectos se dejaron en jaulas con plantas de *Bromus madritensis* (Poaceae) para que pudieran alimentarse y se contó el número de supervivientes dos veces a la semana durante 35 días.

Para estudiar si los polvos fluorescentes modificaban la capacidad de vuelo de los insectos se utilizaron molinos de vuelo (Insect FlyteMill, Crist Instruments, Hagerstown, MD, USA). Los molinos de vuelo son dispositivos

que constan de un brazo conectado a un soporte por medio de una aguja (Figura 4). Entre el soporte y el brazo hay dos imanes que crean suspensión magnética. En un extremo del brazo se coloca el insecto que se quiere estudiar y en el extremo opuesto un contrapeso adecuado. Para conectar el insecto al molino, en primer lugar, se anestesia, aplicando CO₂ durante cinco segundos. Después, aplicando una pequeña gota de cola termofusible sobre el pronoto del insecto, éste se une a la cabeza de un alfiler entomológico. Una vez el insecto se une al alfiler, se conecta al molino y en ese momento el insecto comienza a volar describiendo una trayectoria circular.

dosier

| *Xylella fastidiosa* |

El molino está conectado a un ordenador que registra el número de vueltas y su duración de forma automática mediante un software denominado "mill_recorder". Además, consta de otro software que calcula automáticamente una serie de parámetros de vuelo denominado "mill_processor". Ambos han sido desarrollados específicamente por la ITACA-Universitat Politècnica de València. Los parámetros de vuelo calculados fueron: (1) velocidad media (2) distancia recorrida (3) duración de vuelo. Para este ensayo se compararon estos tres parámetros de vuelo entre los insectos marcados con cada uno de los colores (diez insectos por color) y un control de diez insectos sin marcar. Antes de los ensayos los insectos se sexaron, también se estudió si el sexo influía en alguno de estos tres parámetros de vuelo.

Patrones de movimiento de cigarrillas en un olivar

Se desarrolló un ensayo para estudiar el movimiento de adultos de cigarrillas entre diferentes cultivos (Figura 5). Este ensayo tuvo lugar en un olivar de la zona de Villa del Prado en Madrid en los meses de mayo-julio de 2019. El olivar presentaba abundante vegetación de cubierta. Este olivar objeto de estudio estaba rodeado por un viñedo al noroeste y tres olivares sin vegetación de cubierta; uno de ellos, situado al noreste, presentaba tres encinas que formaban una barrera en uno de los bordes del olivar. Se colocaron cuatro bandas pegajosas amarillas por las dos caras entre el borde del olivar de estudio y los campos que lo rodeaban. Entre el viñedo y el olivar, además, se colocó una trapa de hilos pegajosa y una trampa tipo bi-direccional Malaise para estudiar el movimiento de los insectos que entraban y salían del olivar objeto de estudio (Figura 5). Se comprobó semanalmente el número de cigarrillas que quedaban atrapadas en las bandas. En función del lado de la banda en el que quedaban atrapados, se pudo determinar si los insectos estaban entrando al olivar de estudio (inmigrantes) o saliendo hacia los campos de los alrededores (emigrantes).

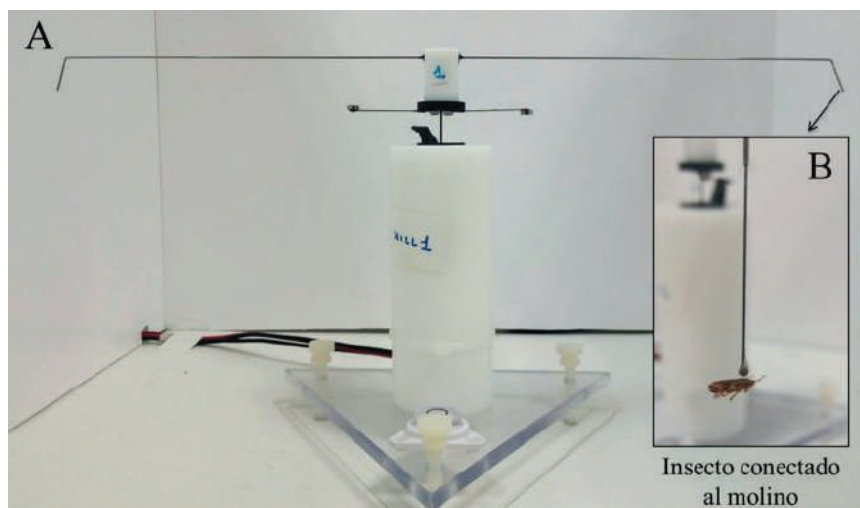


Figura 4. Molino de vuelo (A) e insecto conectado al molino mediante un alfiler (B).

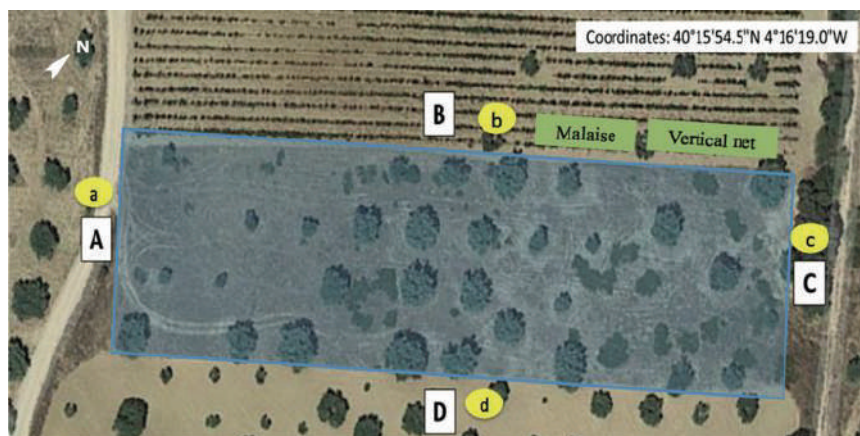


Figura 5. Olivar de Villa del Prado (6.075 m²). El olivar presenta cuatro bordes (A, B, C, D) rodeados por: (A) un olivar, (B) un viñedo (C) un olivar con 3 *Q. ilex* subsp. *ballota*, (D) y un olivar. Se colocaron cuatro bandas amarillas (bandas: a, b, c, d), una en cada borde. Además, se colocaron una trampa de hilos pegajosa y una trampa tipo bi-direccional Malaise en el borde (B). Google. (n.d.). Villa del Prado. Retrieved from: [https://www.google.es/maps/place/40°15'54.5"N+4°16'19.0"W/@40.2651569,-4.272151,132m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d40.2651389!4d-4.2719444?hl=es](https://www.google.es/maps/place/40°15'54.5)

Resultados

Ensayo de Captura-Marcaje-Recaptura

De los 1.315 adultos de *N. campestris* soltados, se recapturaron un total de 21 individuos marcados, todos *N. campestris*. Esta tasa de recaptura representa un 1.6% de individuos marcados recapturados respecto al total liberado. Todos los *N. campestris* recapturados, tanto marcados como no marcados, se encontraron en pinos de las especies *Pinus halepensis* y *Pinus pinea* situados en un radio aproximado de unos 3 km del lugar de la suelta. En base a este resultado puede decirse que los adultos de *N. campestris* se refugian en los pinares durante el verano, cuando la vegetación herbácea de cubier-

ta presente en los cultivos que habita se seca. De los 21 individuos de *N. campestris* recapturados, ocho individuos marcados fueron encontrados a 123 m y otros ocho individuos a 281 m de los puntos de suelta. Sin embargo, el resultado más destacable es que se encontraron cinco *N. campestris* marcados a una distancia de 2.473 m del punto de suelta. Esto demuestra que *N. campestris* es capaz de desplazarse más de 2 km en 35 días, siendo la mayor distancia registrada que una cigarrilla de la familia Aphrophoridae ha sido capaz de recorrer hasta la fecha.

¿Afecta el polvo a la tasa de supervivencia o a la capacidad de vuelo de estos insectos?

En el ensayo de supervivencia se demostró que marcar a los insectos con

polvo fluorescente no aumentaba su tasa de mortalidad (Figura 6).

En cuanto al ensayo con el molino de vuelo, se observó que ni el sexo ni el polvo fluorescente influían sobre el potencial de vuelo de los adultos de *N. campestris*. Además, en este ensayo el 56% de los insectos que se colocaron en el molino, tanto marcados como sin marcar, fueron capaces de volar. La distancia media recorrida por estos individuos en el molino de vuelo fue de 281.54 m y la máxima de 1.36 km en un tiempo de 1h 22 min; la duración media de los vuelos fue de 17 minutos; por último, la velocidad media fue de 0.26 m/s y la máxima de 0.42 m/s. Estos resultados indican que los adultos de *N. campestris* son capaces de recorrer una distancia mucho mayor de los 100 m en condiciones de laboratorio, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el campo.

Patrones de movimiento de adultos de cigarrillas en un olivar

La mayor parte de los vectores y vectores potenciales de *X. fastidiosa* fueron capturados en la banda pegajosa colocada entre el olivar de estudio y el viñedo situado al noroeste del olivar, mientras que en el resto de bandas el número de insectos capturados fue muy bajo. Las especies de cigarrillas capturadas fueron *N. campestris*, *P. spumarius*, *L. coleoprata* y *Cercopis* spp. Estos insectos fueron capturados a ambos lados de la banda, tanto entrando al olivar (inmigrantes) como saliendo hacia el viñedo (emigrantes). Además, respecto a las fechas de las capturas, se ha observado que el número de las mismas comenzó a descender la segunda semana de junio, cuando la vegetación de cubierta del olivar comenzó a secarse (Gráfico 1). El elevado movimiento de insectos entre el olivar y el viñedo, en contraste con la ausencia de movimiento entre el olivar de estudio y el resto de olivares, puede explicarse por la suculencia de las hojas de vid, que contrasta con la ausencia de vegetación de cubierta en los olivares colindantes al olivar de estudio. Esto, sumado al descenso de capturas observado después de que se secase la vegetación de cubierta del olivar, sugiere

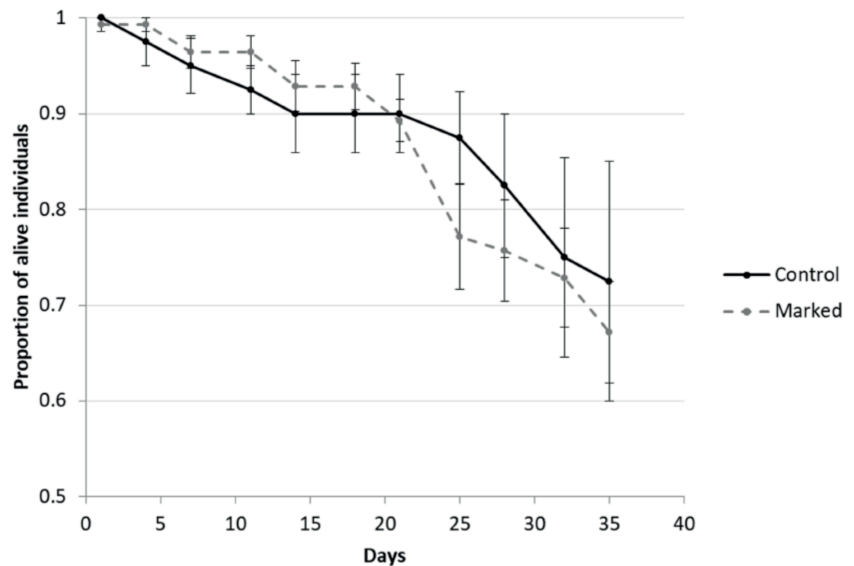


Figura 6. Curva de supervivencia de insectos marcados (línea discontinua) y de insectos no marcados (línea continua), con barras de error.

Vectores capturados en la banda entre el olivar y el viñedo

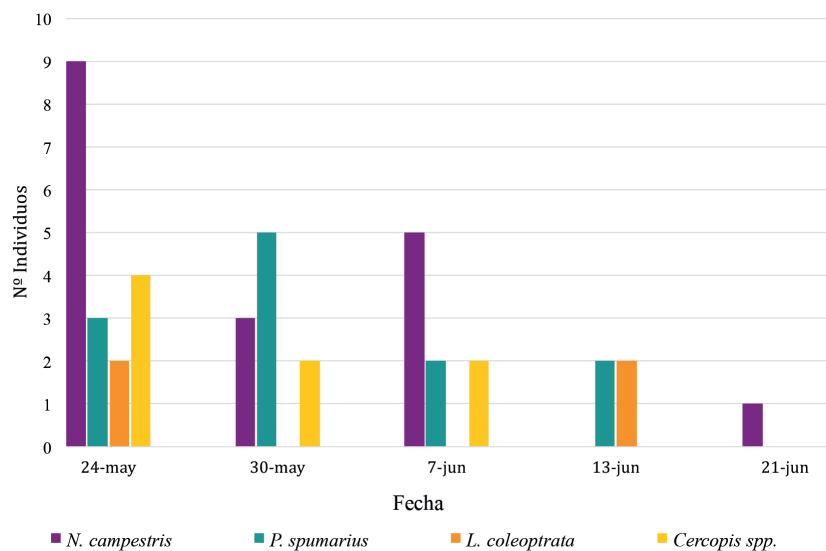


Gráfico 1. Número de vectores capturados (tanto inmigrantes como emigrantes) en la banda situada entre el viñedo y el olivar de estudio en cada fecha.

que el movimiento de los vectores de *X. fastidiosa* se ve fuertemente condicionado por la presencia de vegetación verde suculenta de la que puedan alimentarse.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir:

- Los adultos de *Neophilaenus campestris* son capaces de desplazarse mucho más de 100 m, llegando a recorrer distancias de más de 2.4 km en 35 días.
- Los adultos de *N. campestris* mi-

gran a pinares en verano, que utilizan como alimento y refugio cuando se seca la vegetación herbácea de los lugares que habitan.

- El movimiento de adultos de cigarrillas desde y hacia los olivares está muy condicionado por la presencia de plantas suculentas de las que puedan alimentarse.

¿A la luz de estos resultados, qué estrategia debemos seguir?

Estos resultados nos sugieren que los vectores de *X. fastidiosa*, cuando son adultos, tienen una alta capacidad de dispersión. Por tanto, para limitar la expansión de *X. fastidiosa* en

dosier

| *Xylella fastidiosa* |

las regiones donde esté presente debemos eliminar las posibles fuentes de inóculo, pero además controlar los vectores cuando aún son juveniles (ninfas), puesto que en esta fase tienen la movilidad muy limitada y son más vulnerables. Esto reducirá la presencia de adultos en las zonas donde se encuentre la bacteria, reduciendo el riesgo de expansión de la misma a cortas y largas distancias. Este objetivo debe desarrollarse de la forma más sostenible posible, teniendo en cuenta la ecología, biología y comportamiento de los insectos vectores. Medidas culturales como el desbroce en los meses de primavera, cuando los insectos aún son juveniles y por tanto vulnerables, son esenciales para el control de las

poblaciones de vectores y limitar la expansión de las enfermedades provocadas por *Xylella fastidiosa*.

Summary

Neophilaenus campestris is one of the recently identified spittlebugs (Hemiptera: Cercopoidea) able to transmit *Xylella fastidiosa* to olive trees so it should be considered a serious threat to Spanish agriculture. Knowledge on the dispersal ability of *N. campestris* is essential to limit the spread of *X. fastidiosa*. So we performed a mark-release-recapture assay using fluorescent dusts to track *N. campestris* movement in the field. Results indicated that *N. campestris* was able to disperse a maximum distance of 2473 m in 35 days from the

olive groves to pine trees.

Moreover, we carried out a survey of directional movement of potential vectors of *X. fastidiosa* between agrosystems. The results showed that the highest number of spittlebugs was captured between an olive grove and a vineyard close by. Moreover, the number of captures started to decrease when the ground vegetation dried out.

Our findings suggest that control measures by rooting-up *X. fastidiosa*-infected and non-infected trees in a radius of 100 m should be improved because vectors are able to disperse rapidly over much longer distances.

Bibliografía



- Cavaliere, V., Altamura, G., Fumarola, G., di Carolo, M., Saponari, M., Cornara, D., Bosco, D., Dongiovanni, C. (2019) Transmission of *Xylella fastidiosa* Subspecies *Pauca* Sequence Type 53 by Different Insect Species. *Insects*, 10, 324.
- EFSA. (2019). *Xylella fastidiosa*. Available online: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/xylella-fastidiosa>
- European Commission (2019). List of demarcated areas established in the Union territory for the presence of *Xylella fastidiosa* as referred to an Article 4(1) of Decision (EU) 2015/789. Available online: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/ph_biosec_legis_list-demarcated-union-territory_en.pdf
- Morente, M., Cornara, D., Sanjuan, S., Plaza, M., Moreno, A., Fereres, A. (2018). Vectores de *Xylella fastidiosa* en la comarca de Guadalest (Alicante). *Agrícola Vergel*, 411, 228-230.
- Reynolds, D. R., Chapman, J.W., & Stewart, A. J. (2017). Windborne migration of Auchenorrhyncha (Hemiptera) over Britain. *European Journal of Entomology*, 114: 554-564.
- Weaver, C. R., & King, D.R. (1954). Meadow spittlebug, *Philaenus leucophthalmus* (L.). *Ohio Agricultural Experiment Station Bulletin*, 741, 1-99.