

ESTUDIO DEL GENERO *BURSAPHELENCHUS* FUCHS Y DE *MONOCHAMUS GALLOPROVINCIALIS* OLIVIER EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE GALICIA

ABELLEIRA, A. ¹; PÉREZ- OTERO, R. ¹ Y MANSILLA, J.P.^{1,2}

¹Estación Fitopatológica do Areeiro (Diputación Pontevedra), Subida la Robleda s/n. 36153 Pontevedra. efa @efa-dip.org

²Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario, 27002 Lugo.

Palabras clave: cerambícidos, madera pino, nematodo, transmisor

Resumen: La detección por primera vez Europa, en concreto en Portugal, de *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle en el año 1999 desencadenó en los países miembros de la Unión Europea la obligación de la realización de muestreos periódicos, con el objetivo de determinar la posible presencia de este nematodo y su transmisor *Monochamus galloprovincialis* Olivier. En la Comunidad Autónoma Gallega, debido a su proximidad y a las importaciones madereras que realiza con Portugal, este estudio ha sido más exhaustivo y se han analizado 3725 muestras de madera, desde 1999 hasta 2007, recogidas en masas de coníferas, sanas y decaídas, aserraderos e industrias de la madera. Para determinar la presencia del transmisor se han instalado trampas de ventana o de embudo en las cuatro provincias gallegas desde el año 2001. No ha sido identificado *Bursaphelenchus xylophilus* pero sí otras especies de este género: *B. mucronatus* Mamiya et Enda, *B. sexdentati* Rühm, *B. eggersi* Rühm y *B. hylobianum* (Korenchenko) Hunt. *Monochamus galloprovincialis* ha sido capturado solo en las provincias de Ourense y Pontevedra y en número muy escaso. En este trabajo se describen las características morfológicas y morfométricas de estos nematodos y la distribución de los mismos y su vector en nuestra Comunidad.

INTRODUCCIÓN

El nematodo de la madera del pino *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner, 1934) Nickle, 1970, es el causante de la enfermedad conocida comúnmente como “Pine Wilt Disease”.

Este nematodo es originario de América del Norte (Canadá, USA, México) pero donde ha causado importantes daños ha sido en Japón, Corea, Taiwán y China.

Su transmisión de un árbol a otro se realiza principalmente mediante insectos del género *Monochamus* (*Coleoptera: Cerambycidae*). A grandes distancias es el hombre, con las actividades relacionadas con los movimientos de madera que lleva a cabo y que pueden ser susceptibles de llevar el nematodo, el transmisor, aunque en estas situaciones también los xilófagos puedan actuar como vectores.

Bursaphelenchus xylophilus y sus insectos vectores son organismos de cuarentena en la Unión Europea según contempla la Directiva 2000/29/CEE relativa a las medidas de protección contra la introducción en los Estados miembros de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad. En la EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) están incluidos en la lista A1 de los organismos no presentes en los países de la zona EPPO. Los riesgos de su introducción en Europa fueron analizados detalladamente por EVANS et al. (1996)

En 1999 *Bursaphelenchus xylophilus* fue encontrado en Setúbal (Portugal) siendo esta la primera detección en un país europeo (MOTA *et al.* 1999).

Por este motivo, en nuestra Comunidad, y debido a una serie de factores favorables que facilitarían la entrada de este nematodo (proximidad geográfica, importaciones de madera, condiciones climáticas, es vía de comunicación a terceros países, etc. se han desarrollado muestreos anuales en masas forestales, aserraderos e industrias de la madera y en el entorno de los puertos de inspección fitosanitaria en especies del género *Pinus* desde el primer año de su detección hasta el presente año, con el objeto de detectar la posible presencia de este nematodo y su vector.

Los resultados mas significativos de estos muestreos son que *Bursaphelenchus xylophilus* no ha sido detectado hasta la fecha en nuestra Comunidad, pero sí su vector principal *Monochamus galloprovincialis* y otras especies del género *Bursaphelenchus* como son *B. eggersi*, *B. mucronatus*, *B. sexdentati* (ABELLEIRA *et al.*, 2002, 2003) y *B. hylobianum*. La morfología y distribución en nuestra comunidad de estas especies son la base de este trabajo.

MATERIAL Y METODOS

En el año 1999 se realizó un muestreo en las masas de *Pinus* spp recogidas en el inventario forestal en cada una de las provincias de la Comunidad Gallega.

En el año 2000, la Decisión de la Comisión 2000/58/EC, obliga a los estados miembros a realizar muestreos oficiales para detectar la posible presencia de *B. xylophilus*. Por ello a partir de ese año las prospecciones que se han realizado en nuestra Comunidad siguen las directrices de la UE (ANONIMO, 2000).

Las muestras fueron recogidas en bolsas de plástico, marcadas y remitidas al Laboratorio de la Estación Fitopatológica do Areeiro. Antes de proceder a la extracción fueron incubadas durante dos semanas a 25 °C.

Para la extracción de los nematodos se siguió el método del embudo de Baermann: se sumergen pequeños trozos de madera o serrín en agua durante 48 horas; pasadas éstas se recoge la muestra y se observa a la lupa.

El estudio morfométrico y morfológico de los nematodos se hizo sobre preparaciones en lactofenol de Amman con un microscopio óptico.

Siguiendo el protocolo de la UE, para la determinación de las especies de *Bursaphelenchus* cuyas características morfológicas son similares a *B. xylophilus* es necesario realizar análisis moleculares, por lo que se ha empleado la técnica de PCR-RLFP descrita en ABELLEIRA *et al.* (2003).

El protocolo adoptado para la captura de insectos potencialmente vectores de *Bursaphelenchus xylophilus* ha consistido en la instalación de trampas de diferente tipo según la campaña en masas de *Pinus pinaster* (monoespecíficas o en mezcla con otras especies): trampas de ventana con trozas de pino recién cortadas como atrayente en 2001 y 2002; trampas de embudo modificadas con ipsenol y trementina en 2003; y trampas multifunnel de 12 embudos y silueta negra cebadas con ipsenol, ipsdienol y cis-verbenol, más una combinación de alfa-pineno con trementina y etanol absoluto, en los años siguientes. Desde el primer año, las trampas se colocaron entre los meses de mayo y junio según la campaña y se mantuvieron en el monte hasta los últimos días del mes de septiembre. En todos los casos se instalaron en las provincias de Pontevedra y Ourense (mínimo de cinco trampas por provincia) por tener temperaturas estivales más elevadas y ser limítrofes con Portugal, por lo que a priori son más sensibles a la introducción del nematodo; además, desde 2003 también se colocaron en A Coruña y Lugo, siempre en zonas donde los veranos pueden ser más cálidos. La revisión de las trampas se llevó a cabo quincenalmente, siendo llevados los insectos

recogidos al laboratorio, donde se procedió a la identificación de los coleópteros potencialmente vectores.

RESULTADOS

Durante estos nueve años de muestreos en la Comunidad Autónoma Gallega se han analizado 3725 muestras, entre virutas y serrín, de las cuales el 66,5% corresponde a masas forestales de coníferas, el 32,4 % a aserraderos e industrias de la madera y el restante 1,1 % a masas asociadas a PIFs.

Se han encontrado cuatro especies del género *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937: *B. eggersi*, *B. hylobianum*, *B. mucronatus*, y *B. sexdentati*, (en la Tabla 1 se detallan los datos de los puntos de muestreo).

Descripción de las especies de *Bursaphelenchus* Fuchs

El género *Bursaphelenchus* tiene unas características morfológicas generales que los definen: entre 0.4-1.5 mm de longitud, la región labial es elevada y generalmente diferenciada por una constricción, su estilete está bien desarrollado y mide 10-26 micras. En la a cutícula el número de campos laterales varía según la especie. Las glándulas esofágicas se solapan con el intestino en su parte ventral. En las hembras la posición de la vulva varía entre un 70-80% de la longitud del cuerpo, con saco uterino postvulvar; la vulva puede presentar membrana vulvar o labios salientes. Su región caudal es subcilíndrica, conoide o atenuada, con terminación redonda o aguda. En los machos la región caudal es cónica con una bursa terminal pequeña de forma y tamaño variable, variando también el número de pares de papilas que por lo general tiene dos postanales y un par preanal. Lo más característico de los machos es su espícula, que tiene forma de espina de rosal, con *cucullus* o sin él.

Actualmente están descritas unas 75 especies del género *Bursaphelenchus*, reunidas en varios grupos de especies según coincidan sus caracteres morfológicos y taxonómicos, y existen varias clasificaciones realizadas por diferentes autores (BRAASCH, H. 2004, RYSS, et al. 2005).

Según la clasificación realizada por RYSS et al. (2005) que se basa en la estructura de las espículas, este género se divide en seis grupos, de los cuales las especies encontradas en Galicia pertenecen a dos de ellos: *B. mucronatus* al grupo- *xylophilus* y las restantes (*B. eggersi*, *B. sexdentati* y *B. hylobianun*) al grupo- *piniperdae*

La identificación de las especies que pertenecen al grupo-*xylophilus* podemos considerarla la más crítica debido a que a él pertenece *B. xylophilus*, y a que *B. mucronatus* morfológicamente es prácticamente igual a *B. xylophilus* con la excepción de que las hembras de *B. mucronatus* tienen en la cola un micrón. El resto de las especies de los otros grupos, se diferencian bien de este grupo.

Las medidas de estas especies que se han detectado en Galicia se reflejan en la Tabla 2.

Bursaphelenchus mucronatus Mamiya et Enda 1979

Se caracteriza por tener cuatro incisuras laterales. Los machos tienen las espículas robustas con *cucullus*, y poseen tres pares de papilas caudal, un par precloacal y dos pares posteriores a la cloaca. En las hembras, el labio anterior de la vulva es alargado y solapa claramente la apertura vulvar. Su cola es redondeada y con mucrón.

Dada su proximidad morfológica con *B. xylophilus* se han realizado los análisis moleculares. Los valores obtenidos de la amplificación de la región de ITS corresponden a los establecidos en el protocolo de la EU.

Bursaphelenchus eggersi Rühm, 1956 (J.B. Goodey, 1960)

Sinónimo: *Aphelenchoides (Bursaphelenchus) eggersi* Rühm, 1956

Posee tres incisuras en los campos laterales; los machos poseen un par de papilas precloacales otro par posterior a la cloaca en la mitad de la cola y otro par donde empieza la bursa. Las hembras tienen la cola alargada y curvada ventralmente.

Bursaphelenchus hylobianum (Korenckenko, 1980) Hunt, 1993

Sinónimo: *Parasitaphelenchus hylobianum* Korentchenko, 1980

Tienen dos líneas laterales. Los machos poseen una papila precloacal, un par posterior a la cloaca y otro anterior a la bursa. Sus espículas tienen un *condylos* y *cucullus* grande. En las hembras la región caudal se estrecha gradualmente.

***Bursaphelenchus sexdentati* Rühm, 1960**

Sinónimo: *Aphelenchoides (Bursaphelenchus) sexdentati* Rühm, 1960

Busaphelenchus bakeri Rühm, 1964

Poseen cuatro incisuras en los campos laterales; los machos tienen tres pares de papilas caudales, una precloacal y dos posteriores. La bursa es grande. Las espículas no tienen *cucullus*. Las hembras tienen la región caudal que se va estrechando gradualmente y el labio superior de la vulva sobresale ligeramente con respecto al inferior.

En cuanto a los insectos potencialmente transmisores de *B. xylophilus*, las capturas registradas entre los años 2001 y 2006 (Tabla 3) indican que *Monochamus galloprovincialis* no es abundante en nuestra fauna, aunque sí está presente. En 2007, aún sin estar retiradas del monte las trampas instaladas ni analizadas la totalidad de las capturas, se confirma la misma tendencia, aunque sí es cierto que hasta el momento se han identificado tres ejemplares de la especie, recogidos en las provincias de Pontevedra y Ourense, al igual que en las campañas anteriores de muestreo. En cualquiera de los años, es la especie *Spondylis buprestoides* la mayoritariamente capturada de entre las potencialmente vectoras de *Bursaphelenchus xylophilus* aunque, como ya se ha referido, no se detectó en ningún ejemplar la presencia del nematodo.

CONCLUSIONES

La presencia del género *Bursaphelenchus* en nuestra Comunidad no es muy abundante ya que de las 3725 sólo se han detectado en 13 ocasiones. La especie más extendida es *B. eggersi*, siendo esta cita la primera referencia en *P. radiata* de la Península Ibérica (ABELLEIRA et al. 2003) *B. mucronatus* sólo ha sido detectado en aserraderos y con los datos que disponemos posiblemente de madera importada; de *B. sexdentati* sólo ha habido una detección a pesar de ser la especie más extendida en los países mediterráneos, y por último de *B. hylobianum* esta es la primera cita en nuestra comunidad y sobre *Pinus pinaster* en España.

Respecto a, *Monochamus galloprovincialis*, este aparece esporádicamente en las provincias más cálidas, aunque su presencia obliga a continuar los programas de detección.

BIBLIOGRAFIA

- ABELLEIRA, A.; ESCUER, M.; MANSILLA, J.; ARIAS, M., Y BELLO A.; 2002. Survey of the pine wilt nematode and its vector insect in the autonomous community of Galicia. *Nematology*, 4:259
- ABELLEIRA, A.; ESCUER, M.; ARIAS, M. Y MANSILLA, J.; 2003. The genus *Bursaphelenchus* Fuchs (Nematoda: Aphelenchida) in north-west Spain. *Nematology* 5, 677-685
- ANONIMO; 2000. E.C. Pinewood Nematode Survey Protocol 2000. European Comisión, Directorate- General Health and Consumer Protection, Directorate E- Public, animal and

- plant health. Unit E1. Legislation relating to crop products and animal nutrition. SANCO E/1 D(00), 7.
- ARIAS, M.; ESCUER, M. Y BELLO, A.; 2004. Nematodos asociados a madera y árboles de coníferas en pinares españoles. *Bol.San.Veg. Plagas* , 30:581-593
- BRAASCH, H.; 2004. Morphology of *Bursaphelenchus xylophilus* compared with other *Bursaphelenchus* species. In : Mota ,M, & Vierira, P. (Eds). The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Proceedins of an International Workshop, University of Evora, Portugal, August 20-22,2001. Nematology monographs & perspectives, Volume 1*, 127-143, E.J. Brill, Leiden, The Netherlands .
- EVANS, H.F.; MCNAMARA, D.G.; BRAASCH, H.; CHADDOEUF, J. & MAGNUSSON, C.; 1996. Pest risk analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vector in the genus *Monochamus*. EPPO Bulletin 26,199-249
- MOTA, M.M.; BRAASCH, H.; BRAVO, M.A.; PENAS, A.C.; BURGERMEISTER, W.; METGE, K.& SOUSA ,E.; 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1, 727-734
- RYSS. A.; VIEIRA, P.; MOTA, M. & KULINICH, O.; 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (*Aphelenchida: Parasitaphelenchidae*) with keys to species. *Nematology* Vol .7(3), 393-458.

Tabla 3. CAPTURAS EN TRAMPAS DE CERAMBICIDOS POTENCIALMENTE VECTORES DE *BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS*

	2001	2002	2003	2004	2005	2006
<i>Spondylis buprestoides</i>	22	150	35	76	181	150
<i>Acanthocinus hispanicus</i>	0	0	0	0	4	0
<i>Arhopalus ferus</i>	0	37	6	4	2	37
<i>Rhagium bifasciatum</i>	0	0	0	2	0	0
<i>Monochamus galloprovincialis</i>	1	0	1	0	0	0

Bursaphelenchus spp identificados	Punto de muestreo	Especie botanica	Localidad	Provincia	* Origen
<i>Bursaphelenchus eggersi</i>	Masa decaída	<i>Pinus pinaster</i>	Tomiño	Pontevedra	
	Masa decaída	<i>Pinus pinaster</i>	Fisterra	A Coruña	
	Masa decaída	<i>Pinus pinaster</i>	Vedra	A Coruña	
	Masa decaída	<i>Pinus radiata</i>	Curtis	A Coruña	
	Aserradero	<i>Pinus pinaster</i>	Carballo	A Coruña	Galicia
	Aserradero	<i>Pinus pinaster</i>	Mondoñedo	Lugo	Galicia
	Aserradero	<i>Pinus pinaster</i>	Villamarín	Ourense	Galicia
<i>Bursaphelenchus mucronatus</i>	Aserradero	<i>Pinus sylvestris</i>	Rabade	Lugo	Ucrania
	Aserradero	<i>Pinus sylvestris</i>	Porriño	Pontevedra	Francia
	Aserradero	<i>Pinus sp</i>	Cargamo	Ourense	Desconocido
	Aserradero	<i>Pinus sp</i>	Tomiño	Pontevedra	Desconocido
<i>Bursaphelenchus sexdentati</i>	Masa decaída	<i>Pinus sp</i>	Cortegada	Ourense	
<i>Bursaphelenchus hylobianum</i>	Masa decaída	<i>Pinus pinaster</i>	As Neves	Pontevedra	

Tabla 1: Datos de los puntos de muestreo sobre los que se han detectado las especies de *Bursaphelenchus* en la Comunidad Autónoma Gallega.

*Procedencia de la madera en las muestras de aserradero

medidas	<i>B. mucronatus</i>		<i>B. sexdentati</i>		<i>B. eggersi</i>		<i>B. hylobianum</i> *	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
n	10	10	3	10	12	8	20	13
(L)mm	600 ± 98.5 (530-860)	620 ± 110 (510-830)	840 ± 0.13 (720-970)	1004 ± 0.14 (780-1300)	627 ± 83.9 (548-850)	655 ± 69.2 (565-783)	582 ± 59 (507-747)	641 ± 71 (549-844)
a	43.2 ± 2.6 (39.2-48.2)	42 ± 4.1 (34.9-45.9)	40.6 ± 3.7 (36.8-44.2)	35.04 ± 5.5 (26.8-45.7)	36 ± 5.6 (25-45)	33.2 ± 4.9 (25-41)	35 ± 8.1 (37-42)	37 ± 3.3 (34-44)
b	9.8 ± 1.6 (8.7-14.1)	9.5 ± 1.7 (7.8-12.8)	11.5 ± 1.8 (9.4-12.8)	12.9 ± 1.9 (10.3-16.6)	8.3 ± 1.1 (6.9-10.8)	8.7 ± 0.4 (8-9.2)	6.9 ± 0.8 (5.8-9.1)	7.5 ± 0.9 (6.7-10.1)
c	22.2 ± 2.7 (17.6-27.8)	24.9 ± 3.4 (20.5-32.4)	22.1 ± 2 (19.8-23.3)	28.2 ± 4.4 (22.6-35.4)	14.7 ± 1.6 (12-18)	14.5 ± 1.3 (12.8-16.4)	17 ± 2.6 (10-21)	14 ± 2 (9-16)
c'	2.2 ± 0.42 (1.2-2.7)	3.4 ± 0.99 (2.0-5.1)	2.3 ± 0.2 (2.1-2.5)	2.7 ± 0.5 (1.6-3.4)	3.2 ± 0.5 (2.3-4.1)	3.6 ± 0.3 (3.2-3.9)	2.6 ± 0.3 (2.10-3.60)	4.7 ± 0.8 (3.90-6.57)
V	-	65.9 ± 83.6 (71-195.6)	-	75.5 ± 1.1 (74-77)	-	68 ± 0.6 (67.5-69.3)		72 ± 1.6 (67-73)
L.cola	27.4 ± 4.8 (19-37)	24.9 ± 4 (18-31.4)	37.8 ± 3.4 (35.6-41.7)	37.3 ± 5.4 (27.9-44)	42.4 ± 5.3 (35-53)	45.3 ± 2.9 (41-49)	34 ± 7 (28-54)	48 ± 11 (40-78)
Estilete (µm)	13.8 ± 1.5 (10.5-15.7)	13.8 ± 1.1 (12.8-16.3)	16.7 ± 2.9 (14.3-19.9)	16.3 ± 1.5 (14.8-19.7)	13.8 ± 0.9 (12-16)	13.6 ± 0.9 (12-15)	14 ± 1.1 (12-16)	16 ± 2.9 (12-22)
Espicula (µm)	24 ± 2.8 (20.4-30.8)	24 ± 2.8 (20.4-30.8)	17.6 ± 1.5 (15.9-18.7)	-	19.2 ± 2.2 (15.3-22)	-	20 ± 1.15 (18-22)	

Tabla 2: Medidas de las especies de *Bursaphelenchus*

* Las medidas de esta especie corresponden a las citadas por Arias et al 2004