



2022
Lleida

27 · 1
junio · juny
juliol · juliol

Cataluña
Catalunya

8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**

8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022

ISBN 978-84-941695-6-4

© Sociedad Española de Ciencias Forestales



Organiza

Detección e identificación de *Bursaphelenchus xylophilus* en su vector *Monochamus galloprovincialis*

ABELLEIRA ARGIBAY, A.¹, PÉREZ OTERO, R.¹, PIÑÓN ESTEBAN, P.¹, AGUÍN CASAL, O.¹, SALINERO CORRAL, C.¹, RODRIGUEZ RAJO, F. J.² y MANSILLA VAZQUEZ, P.¹

¹ Estación Fitopatológica Areeiro – Deputación de Pontevedra.

² Departamento de Bioloxía Vexetal e Ciencias do Solo. Universidad de Vigo.

Resumen

Bursaphelenchus xylophilus, el nematodo de la madera del pino, es transmitido foréticamente de un árbol a otro por medio de insectos vectores del género *Monochamus*. En Europa, hasta la fecha, solo está citada la especie *M. galloprovincialis*, en Portugal y España. Para monitorizar la distribución del vector, maximizar su captura y detectar la posible presencia del nematodo, entre primavera y octubre-noviembre se instalaron, en las masas de *Pinus* spp., trampas (de vanos cruzados fundamentalmente) cebadas con feromonas de agregación y sustancias kairomonales. Se revisaron semanalmente, recogiendo los insectos capturados y llevándolos al laboratorio para su análisis. Una vez identificados, los *M. galloprovincialis* se procesaron para detectar la posible presencia de *B. xylophilus*, que se encuentra en el vector en estado juvenil infectivo “dauer”. No obstante, la identificación morfológica de *B. xylophilus* tiene que realizarse a partir de los adultos, y para obtenerlos se criaron los dauer en placas de PDA con *Botrytis cinerea* durante 15 días a 25° C. Para la identificación molecular la extracción del ADN se hizo tanto de los dauer como de los adultos y la amplificación se realizó según diferentes metodologías.

Palabras clave

Cerambícido, juvenil dauer, nematodo de la madera del pino.

1. Introducción

La enfermedad denominada comúnmente en España como marchitamiento o seca del pino está causada por el nematodo *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Bühner) Nickle. Los síntomas y daños que provocan en las especies susceptibles de *Pinus*, son consecuencia de la invasión y multiplicación de los nematodos de los canales resiníferos, donde se alimenta de las células epiteliales que los revisten, así como de las células de parénquima circundante. La destrucción de los canales resiníferos impide el flujo de resina. La disminución de la transpiración en las acículas, ocasiona su marchitez y pérdida de coloración en los árboles afectados. Los rápidos incrementos de la población de los nematodos originan el desarrollo de la enfermedad y la muerte de los árboles afectados. Esta patología fue descrita por primera vez en Europa en la península ibérica, inicialmente en Portugal en 1999 (MOTA, et al 1999) y posteriormente en España en 2008 (ROBERTSON et al., 2011).

En Galicia, la primera detección tuvo lugar el año 2010 en el sur de la comunidad, concretamente en el municipio de As Neves (Pontevedra) (ABELLEIRA et al., 2011) lo que dio lugar a la declaración oficial de su presencia en la comunidad autónoma y al establecimiento de una zona demarcada y de una serie de medidas para lograr su control y erradicación, en cumplimiento la Decisión 2006/133/CE de la Comisión, de 13 de febrero de 2006 (y legislación que la modifica) (Resolución de 17 de noviembre de 2010). En 2016 se detecta un nuevo brote, próximo al anterior, en el municipio de Salvaterra do Miño y en agosto de 2018 se declaran siete nuevos puntos localizados en los municipios de O Porriño, Ponteareas, Salvaterra do Miño y Tui. Estos nuevos focos originan una reconfiguración de la zona demarcada inicialmente, que en la actualidad afecta total o parcialmente a 25 términos municipales del sur de la provincia de Pontevedra y Ourense (Resolución

de 28 de diciembre de 2018). En esta zona se han intensificado los muestreos periódicos en las masas de *Pinus* spp. para la evaluar la presencia y dispersión del nematodo y su vector.

La dispersión de *B. xylophilus* a corta distancia se produce por medio de insectos cerambícidos del género *Monochamus*, de diferentes especies según el país o área geográfica. *Monochamus alternatus* Hope es el vector principal en Japón y *M. carolinensis* Olivier en Norte América (LINIT, 1987). En Europa, hasta la fecha solo se ha asociado foréticamente al nematodo con *M. galloprovincialis* Olivier, que es la especie más abundante en la península ibérica (GONZÁLEZ PEÑA et al., 2007) y se ha citado tanto en Portugal (SOUSA et al. 2001) como en nuestro país (ABELLEIRA et al. 2020). Otras especies de *Monochamus* podrían ser vectores en otros países europeos (EVANS et al., 1996).

2. Objetivos

En este trabajo se detalla el procedimiento de análisis de los adultos de *Monochamus galloprovincialis* recogidos en las trampas distribuidas en la nueva zona demarcada, y los métodos de diagnóstico utilizados para determinar e identificar la presencia de *B. xylophilus* en los insectos capturados.

3. Metodología

Además de muestreos intensivos periódicos para la detección del nematodo en muestras de madera de *Pinus* spp. (mayoritariamente *P. pinaster* Ait.) en los 25 municipios que comprende actualmente la zona demarcada, los insectos se obtuvieron a partir de una red de trampeo. Cada año, se instalaron trampas de vanos cruzados cebadas con el atrayente Galloprotect 2D (SEDQ, Barcelona) (en la mayoría de casos) o Galloprotect Pinowit suspendidas de ramas de árboles a diferentes alturas según la configuración del pinar, pero a un mínimo de 70 cm desde el suelo.

El conjunto de trampas se revisó cada 7-10 días de media entre abril y noviembre. En cada revisión se realizó en campo una primera separación de los insectos recogidos, lo que permitió la liberación de los depredadores que hubieran caído en el recipiente colector. El resto de insectos se llevó en botes al laboratorio, donde se separaron los ejemplares de *Monochamus galloprovincialis* de otros cerambícidos capturados. La separación y determinación de la especie se realizó generalmente *de visu* aunque, a consecuencia del deterioro de algunos individuos debido a depredación o al agua que, en los períodos de más precipitación, llenaba el recipiente colector y degradaba el contenido, algunos debieron ser previamente secados y sus restos determinados sobre la base de caracteres anatómicos distintivos como su microescultura o pubescencia. El número de trampas donde se recogió algún individuo de *M. galloprovincialis* se refleja en la tabla 1.

Tabla 1. Numero de trampas analizadas con presencia de *M. galloprovincialis* en la nueva zona demarcada.

Año Muestreo	Nº de trampas analizadas ZD
2018	127
2019	506
2020	188
2021	175

Para la extracción nematológica, cada insecto se procesó individualmente. En caso de que estuvieran vivos, su análisis se realizó en menos de 24-48 horas; los individuos muertos se guardaron en nevera y se procesaron lo antes posible, en un plazo no superior a 1-3 meses.

El procedimiento para la extracción de los nematodos fue el siguiente: cada insecto se colocó en una placa Petri de vidrio con agua destilada estéril, se trocó con un bisturí y se dejó reposar a temperatura ambiente (18-22 °C) durante 24-48 horas, puesto que si permanecían más tiempo su posterior análisis bajo la lupa binocular se hacía muy molesto debido al mal olor que desprendían los insectos, sobre todo los más degradados.

En las muestras positivas en presencia del nematodo, para confirmar la identificación de *B. xylophilus* se recogieron individuos y se realizaron preparaciones microscópicas temporales con lactofenol de Amman con el fin de observar los caracteres morfológicos de los juveniles dauer. También se recogieron de 1 a 3 individuos por muestra para su identificación por técnicas moleculares. En este caso, previamente se lavaron con agua estéril para evitar contaminaciones que pudieran interferir en el análisis posterior.

Para el estudio de las características morfológicas de los adultos del nematodo, varios juveniles dauer se criaron en placas Petri con medio PDA donde había crecido previamente *Botrytis cinerea* Pers. y se mantuvieron durante al menos 15 días en una estufa a 26 °C. Una pequeña proporción de dauer ya puede mudar a adulto en las mismas placas Petri donde realiza la extracción del insecto.

Para la confirmación molecular de los ejemplares identificados previamente como posibles *B. xylophilus* se han utilizado cuatro técnicas recomendadas por la EPPO (Organización europea y mediterránea de protección de plantas) y/o por la CIPF (Convención internacional de protección fitosanitaria): PCR convencional de las regiones ITS1–ITS2 del ADN ribosómico (ADNr) (MATSUNAGA & TOGASHI, 2004), PCR-RFLP que amplifica un segmento de ADNr del nematodo que contiene las regiones ITS1 e ITS2 y, posteriormente, se digiere con enzimas de restricción (BURGERMEISTER et al., 2005, 2009), secuenciación de los espaciadores transcritos internos ITS-1, ITS-2 y 5,8S (ABELLEIRA et al, 2011) y DNA barcoding (análisis basado en el código de barras de las regiones 18S y 28S de ADNr) (EPPO, 2021). En el caso del procedimiento PCR-RFLP el fragmento de ADN amplificado se digirió con las enzimas *RsaI*, *HaeIII*, *MspI*, *HinfI* y *AluI*. Los perfiles de restricción obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% y los tamaños se compararon con los propuestos para *B. xylophilus* (BURGERMEISTER et al., 2005, 2009). La secuencia de los iniciadores y el tamaño esperado de los amplicones para cada técnica utilizada se presenta en la tabla 2.

Cada muestra analizada estuvo formada como mínimo por 1 nematodo hasta un máximo de 3, que podían estar en diversas etapas de desarrollo biológico, tanto juveniles dauer como adultos. La extracción de ADN genómico se realizó mediante el kit comercial QIAmp DNA Mini Kit (Quiagen, Alemania) siguiendo el protocolo DNA Purification from Tissues propuesto por el fabricante. Las amplificaciones, de cada una de las técnicas, se llevaron a cabo en un termociclador Biometra Trio (Analytik Jena) aplicando las condiciones propuestas por cada uno de los autores.

Para llevar a cabo la secuenciación y el DNA barcoding los amplicones obtenidos se purificaron con el kit “High Pure PCR Product Purification” (Roche Diagnostic), se prepararon con la reacción de secuenciación con el Big Dye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y se analizaron en el secuenciador automático ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se visualizaron con el Sequencing Analysis 5.1 y mediante el programa de alineamiento BLASTn, se compararon con las secuencias disponibles existentes en el Gen-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y en el Q-bank (<https://qbank.eppo.int>).

Tabla 2. Secuencia de los iniciadores, fragmento amplificado esperado y referencias de cada uno de los métodos moleculares utilizados para la identificación de *B. xylophilus*.

Método	Secuencia de Iniciadores	Fragmento amplificado (pares de bases)	Referencia
PCR -convencional	X-F: 5'-ACG ATG ATG CGA TTG GTG AC-3' X-R: 5'-TAT TGG TCG CGG AAC AAA CC-3'	ITS 557 pb	Matsunaga y Togashi, (2004)
PCR-RFLP	ITS1 (directo, F): 5'-CGT AAC AAG GTA GCT GTA G-3' (Ferris et al., 1993) ITS2 (inverso, R): 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain, 1993)	ITS 925 pb	Burgermeister et al., (2005, 2009)
Secuenciación	ITS1 (directo, F): 5'-CGT AAC AAG GTA GCT GTA G-3' (Ferris et al., 1993) ITS2 (inverso, R): 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain, 1993)	ITS 925 pb	Abelleira et al., (2011)
DNA barcoding	<u>Primera reacción</u> 988F CTCAAAGATTAAGCCATGC 1912R TTTACGGTCAGAACTAGGG <u>Segunda reacción</u> 1813F CTGCGTGAGAGGTGAAAT 2646R GCTACCTTGTACGACTTTT 28-81for TTAAGCATATCATTAGCGGAGGAA 28-1006rev GTTCGATTAGTCTTTCGCCCT	18S 980 pb 880 pb 28S 1000pb	EPP0 (2021)

4. Resultados y Discusión

La relación de trampas positivas en cuanto a detección de *B. xylophilus* frente al total analizado se situó, durante tres de los cuatro años de estudio, en torno al 40-50%. La excepción la ha constituido el año 2020, cuando ese valor no alcanzó el 30% y el número de *Monochamus* capturados fue también inferior (Figura 1).

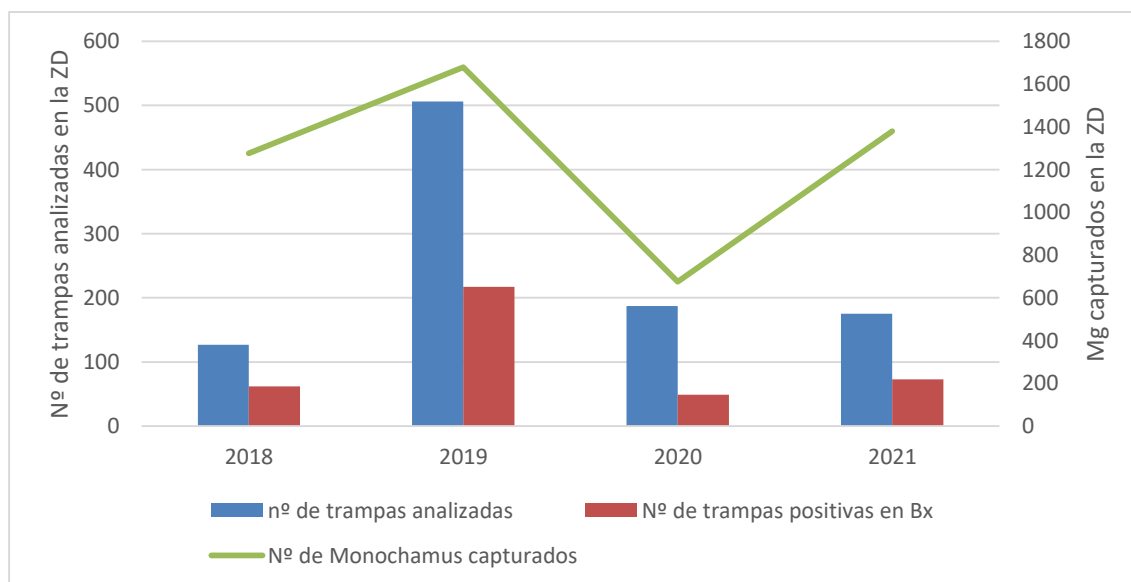


Figura 1. Muestro de *M. galloprovincialis* en la zona demarcada.

Los ciclos biológicos de *Bursaphelenchus xylophilus* y *Monochamus galloprovincialis* están estrechamente relacionados en todo el proceso de la enfermedad del marchitamiento del pino. Los nematodos extraídos de los insectos capturados se encuentran mayoritariamente en el estado de dispersión dauer J_{IV}. Este estado de supervivencia es morfológicamente similar a nivel de género e

incluso familia y consecuentemente la identificación morfológica de una especie resulta complicada (KANZAKI et al 2016). En todo caso, la morfología de los dauer extraídos de los adultos recogidos en las trampas de la nueva ZD, correspondía con la descrita en Portugal por PENAS et al. (2006 y 2008) para el género *Bursaphelenchus* y para la especie *B. xylophilus*, cuyas características generales son las siguientes: cuerpo cilíndrico entre 400-600 μm de longitud, cutícula finamente anulada, con un amplio campo lateral con cuatro incisiones. Cabeza redondeada en forma de cúpula, con el estilete que en ocasiones no se distingue. Bulbo medio también poco definido y cola cónica alargada con una pequeña proyección o mucrón.

El número de juveniles dauer J_{IV} que se han encontrado por individuo de *M. galloprovincialis* fue muy variado, fluctuando entre 1 y 33000. Aunque no frecuentemente, han aparecido otros nematodos en los insectos, sobre todo cuando éstos ya se encontraban muertos en las trampas o muy degradados. Los nematodos fueron extraídos tanto de insectos vivos como muertos. El método de extracción utilizado también permitió la detección de los nematodo vivos y muertos; en este último caso solo se pudieron identificar por técnicas moleculares.

Los adultos obtenidos en la cría y multiplicación fueron identificados morfológicamente como *B. xylophilus*. La identificación morfológica requiere la existencia de machos y hembras, realizar buenas preparaciones microscópicas, disponer de equipos de microscopía de alta resolución y aumento y una amplia experiencia en nematología, especialmente para diferenciar las especies próximas a *B. xylophilus* (EPPO, 2013). Debido a esta dificultad, en los protocolos de diagnóstico publicados por la EPPO y la CIPF aparecen diferentes claves que permiten empezar a diferenciar desde el taxón familia hasta especie, y que ayudan y centran el diagnóstico de *B. xylophilus* (EPPO, 2013 y CIPF, 2108). Las características morfológicas del grupo *xylophilus* para los machos son espículas estrechas y largas, curvadas uniformemente, con el *capitulum* aplanado y un *cucullus* terminal característico; las hembras presentan un gran labio vulvar y un largo saco post-uterino (RYSS et al 2005).

Para la determinación morfométrica de los individuos objeto de estudio (juveniles y adultos), en nematología se utilizan los índices de Man y otros parámetros. No obstante, los individuos obtenidos de cría en medios de cultivo pueden variar notablemente, incrementando su valor con respecto a los de los individuos de poblaciones naturales, lo que se debe tener en cuenta sobre todo si se definen nuevas especies (PENAS et al., 2008). En la tabla 3 se recogen las medidas de dos poblaciones, una natural de machos y hembras obtenida de una masa de *Pinus pinaster* de la zona demarcada (B_{X(EFA5.8)}), y otra de la población extraída de *Monochamus galloprovincialis* (B_{X(EFAB89)}) formada por juveniles dauer y adultos obtenidos en medios de cultivo después de 15 días.

Tabla 3. Medidas e índices De Man de *B. xylophilus* utilizadas en este estudio (en μm y formato: media \pm SD (rango)).

Carácter	B _{X(EFA B89)} Dauer JIV	B _{X(EFA B89)} Cría 15 días	B _{X(EFA B89)} Cría 15 días	B _{X(EFA 5.8)}	B _{X(EFA 5.8)}
Nº de individuos	10	10 ♂	10 ♀	10 ♂	10 ♀
Longitud cuerpo	545,80 \pm 63,43 (472-666)	920,04 \pm 40,36 (816,52-964,44)	1021,06 \pm 145,35 (819,76-1300,83)	570,36 \pm 84,11 (448,6-693,01)	686,47 \pm 127,84 (535,85-898,12)
a	34,28 \pm 3,45 (28,9-45,77)	46,38 \pm 1,78 (42,50-52,27)	40,47 \pm 2,95 (35,58-46,66)	38,38 \pm 4,37 (28,9-45,77)	36,93 \pm 6,28 (30,56-49,01)
b		10,40 \pm 1,01 (8,74- 12,50)	10,22 \pm 1,37 (7,06- 11,82)	7,65 \pm 0,35 (7,35-8,11)	7,78 \pm 1,64 (6,78- 11,65)

c	18,31±1,77 (15,86-20,74)	25,96±1,92 (22,85-28,81)	30,65±2,93 (25,90-35,72)	21,78±2,65 (18,49-27)	25,94±3,90 (20,94-32,56)
c'	2,02±0,13 (1,79-2,46)	2,06±0,15 (1,81-2,37)	3±0,13 (2,86-3,27)	2,02±0,13 (1,79-2,46)	2,88±0,22 (2,37-3,13)
Estilete		16,92±0,77 (15,22-18,91)	15,77±1,16 (13,52-18,84)	14,04±1,44 (11,67-18,09)	14,86±1,64 (13,05-18,09)
V			74,49±1,08 (72,23-76,77)		72,16±1,52 (70,45-75,13)
Espícula		32,05±2,62 (28,2-36,29)		23,06±1,49 (17,64-25,85)	
Max. ancho cuerpo	15,95±1,34 (13-17)	19,86±1,03 (17,19-21,49)	25,27±3,36 (19,99-31,49)	14,84±1,07 (13,04-16,42)	18,67±2,42 (14,72-23,44)
Max. ancho ano/cloaca	8,04±1,14 (6-9,58)	17,33±1,11 (16,04-19,45)	11,08±0,76 (9,37-12,03)	12,96±1,06 (10,14-14,94)	9,23±1,17 (7,75-12,04)
Longitud de la cola	29,88±2,69 (26-34)	35,59±2,73 (32,05-39,12)	33,24±2,54 (28,76-37,70)	26,19±2,36 (21,46-29,88)	26,46±2,71 (21,60-32,67)

Las cuatro técnicas moleculares utilizadas han permitido la identificación concluyente de *B. xylophilus*. En el caso de la PCR convencional se obtuvo un fragmento de 557 pares de bases, tamaño esperado para *B. xylophilus* (Figura 2). El análisis del perfil de los fragmentos de restricción con las enzimas *AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MspI* y *RsaI* en el protocolo de PCR-RFLP se correspondió también con lo esperado para *B. xylophilus* (Figura 3).

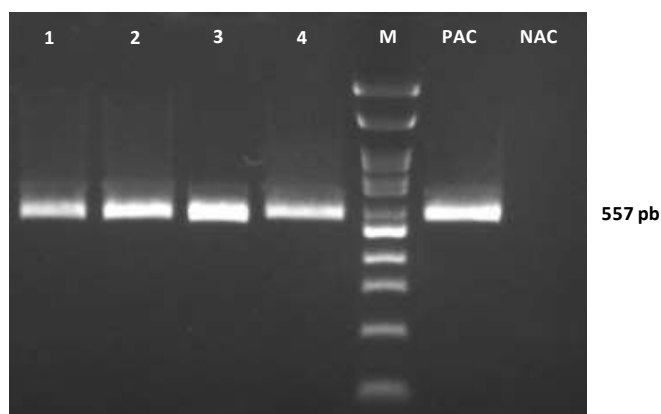


Figura 2. Gel de agarosa al 2% mostrando el fragmento de ADN de 557 pb obtenido mediante PCR convencional en muestras de *B. xylophilus*. Calles 1-4: muestras; M: marcador de peso molecular de 100pb; PAC: control positivo de amplificación; NAC: control negativo de amplificación

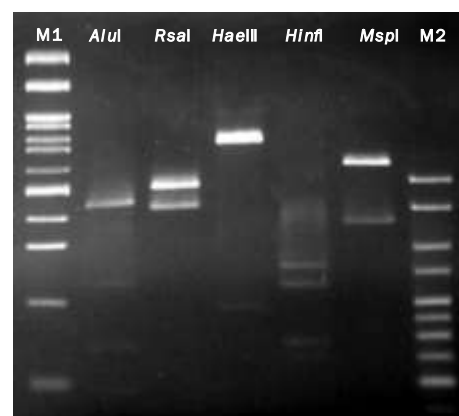


Figura 3. Gel de agarosa al 3% mostrando los fragmentos de restricción obtenidos por PCR-RFLP con las enzimas *AluI*, *RsaI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MspI* en una muestra de *B. xylophilus*. M1: marcador de peso molecular de 100pb; M2: marcador de peso molecular de 25pb.

Con la secuenciación y el análisis del código de barras (DNA barcoding) se obtuvo, con la aplicación comparativa BLAST, un porcentaje de homología superior al 99% con las secuencias incluidas en las bases de datos de *B. xylophilus*. Únicamente en algunos casos, en el proceso de secuenciación se ha producido amplificación cruzada con bacterias del género *Pseudomonas*. Esto podría estar relacionado con el procesamiento previo de las muestras que no habría eliminado contaminaciones asociadas a estos nematodos.

Dos secuencias de *B. xylophilus*, obtenidas en este estudio, han sido depositadas en el GenBank con los números de acceso MK789298 (EFA B89) y MK789297 (EFA B174).

5. Conclusiones

El método de extracción utilizado en los insectos (tanto vivos como muertos) permite la obtención de nematodos vivos y muertos.

La identificación morfológica del nematodo a nivel especie solo es posible si se dispone de individuos adultos.

Los juveniles dauer analizados en los *M. galloprovincialis* capturados en la zona demarcada se han identificado únicamente como *B. xylophilus*.

Los cuatro métodos moleculares utilizados (PCR convencional, PCR-RFLP, secuenciación y DNA barcoding) posibilitan la identificación de *B. xylophilus* a partir de muestras con un sólo ejemplar. Es importante el procesamiento de los nematodos antes de la extracción del ADN para evitar contaminaciones cruzadas que limiten el éxito en los análisis moleculares.

6. Bibliografía

ABELLEIRA, A.; PÉREZ-OTERO, R.; AGUÍN, O.; PRADO, A.; SALINERO, C. 2020. First Report of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) on *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) in Spain. *Plant Disease*, 104: 1259.

ABELLEIRA, A.; PICOAGA, A.; MANSILLA, J.P.; AGUÍN, O. 2011. Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, causal agent of pine wilt disease on *Pinus pinaster* in northwestern Spain. *Plant Disease*, 95(6): 776-776.

CIPF (Convención Internacional de Protección Fitosanitaria). 2018. Protocolos de diagnóstico para plagas reglamentadas PD 10: *Bursaphelenchus xylophilus*. NIMF 27.

BURGERMEISTER, W.; BRAASCH, H.; METGE, K.; GU, J.; SCHRÖDER, T.; WOLDT, E. 2009. ITS-RFLP analysis, an efficient tool for identification of *Bursaphelenchus* species. *Nematology*, 11: 649-668.

BURGERMEISTER, W.; METGE, K.; BRAASCH, H.; BUCHBACH, E. 2005. ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. *Russian Journal of Nematology*, 13(1): 29-42.

EVANS, H. F.; MCNAMARA, D. G.; BRAASCH, H.; CHADOEUF, J.; MAGNUSSON, C. 1996. Pest risk analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *EPPO Bulletin*, 26(2): 199-249.

EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2021. PM 7/129 (2) DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests. *EPPO Bulletin* 51: 100-143. <https://doi.org/10.1111/epp.12724>.

EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2013. PM7/4 (3) *Bursaphelenchus xylophilus*. *EPPO Bulletin*, 43(1): 105-118.

GALICIA. Resolución de 17 de noviembre de 2010, de la Dirección General de Producción Agropecuaria, por la que se declara en el territorio de la Comunidad Autónoma de Galicia la presencia del organismo de cuarentena *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle et al. (nematodo del pino) y se ordena comenzar las medidas para su erradicación. DOG Núm. 228, 26 de noviembre de 2010.

GALICIA. Resolución de 28 de diciembre de 2018, de la Dirección General de Ganadería, Agricultura e Industrias Agroalimentarias, por la que se declara en el territorio de la Comunidad Autónoma de Galicia la presencia de cinco nuevos positivos del organismo de cuarentena *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle et al. (nemátodo del pino) y se ordena comenzar las medidas para su erradicación. DOG Núm. 8, 11 de enero de 2019.

GONZÁLEZ PEÑA, C. F.; VIVES NOGUERA, E.; DE SOUSA ZUZARTE, A. J. 2007. Nuevo catálogo de los Cerambycidae (Coleoptera) de la Península Ibérica, islas Baleares e islas atlánticas: Canarias, Açores y Madeira. *Monografías Sociedad Entomológica Aragonesa*. Vol. 12. 212 pp.

KANZAKI, N.; MAEHARA, N.; AKIBA, M.; TANAKA, S. E.; IDE, T. 2016. Morphological characters of dauer juveniles of three species of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937. *Nematology*, 18(2): 209-220.

LINIT, M.J. 1987. The insect component of pine wilt disease in the United States. WINGFIELD, M. J. (eds.): Pathogenicity of the Pine Wood Nematode. 66-73. APS Press. St Paul, Minnesota.

MATSUNAGA, K.; TOGASHI, K. 2004. A simple method for discriminating *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* by species-specific polymerase chain reaction primer pairs. *Nematology*, 6: 273-277.

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(7): 727-734.

PENAS, A.C.; BRAVO, M.A.; NAVES, P.; BONIFACIO, L.; SOUSA, E.; MOTA, M. 2006. Species of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and other nematode genera associated with insects from *Pinus pinaster* in Portugal. *Annals of Applied Biology*, 148: 121 - 131.

PENAS, A. C.; BRAVO, M. A.; VALADAS, V.; MOTA, M. 2010. Detailed morphobiometric studies of *Bursaphelenchus xylophilus* and characterisation of other *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) associated with *Pinus pinaster* in Portugal. *J. Nematode Morphol. Syst.*, 10 (2): 137-163

ROBERTSON, L.; COBACHO ARCOS, S.; ESCUER, M.; SANTIAGO MERINO, R.; ESPARRAGO, G.; ABELLEIRA, A.; NAVAS, A. 2011. Incidence of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhrer, 1934 (Nickle, 1970) in Spain. *Nematology*, 13(6): 755-757.

RYSS, A.; VIEIRA, P.; MOTA, M.; KULINICH, O. 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology*, 7: 393-458.

SOUSA, E.; BRAVO, M.; PIRES, J., NAVES, P.; PENAS, A.; BONIFACIO, L.; MOTA, M. 2001. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology* 3: 89-91.