



**JUNTA DE ANDALUCIA**  
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA  
CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE

***PROGRAMA PARA LA APLICACIÓN DE LA  
NORMATIVA FITOSANITARIA RELATIVA AL  
NEMATODO DE LA MADERA DEL PINO  
(*Bursaphelenchus xylophilus*)***

***Plan Andaluz de Contingencia***

**noviembre, 2008**



# ÍNDICE

Pág.

<b>1. INTRODUCCIÓN Y ALCANCE.....</b>	<b>1</b>
<b>3. MARCO COMPETENCIAL.....</b>	<b>1</b>
3.1. Organismos oficiales competentes .....	1
3.2. Órganos específicos de control oficial .....	3
4.1. Antecedentes .....	4
4.2. Sintomatología.....	5
4.3. Hospedantes.....	10
4.4. Ciclo de vida de <i>B. xylophilus</i> .....	11
4.5. Principales vías de entrada.....	13
4.6. Dinámica de la población de <i>B. xylophilus</i> .....	14
4.7. Formas de dispersión .....	16
4.8. Caracterización de los vectores de <i>B. xylophilus</i> .....	17
<b>5. METODOS GENERALES DE DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN, PREVENCIÓN Y CONTROL.....</b>	<b>20</b>
5.1. Métodos de detección e identificación .....	20
5.1.1. Selección de lugares de prospección.....	20
5.1.2. Selección de especies de coníferas .....	22
5.1.3. Protocolos generales de muestreo .....	23
5.1.4. Identificación .....	27
5.2. Métodos de prevención y control aplicados en la Comunidad de Andalucía .....	29
<b>6. PLAN DE CONTINGENCIA .....</b>	<b>37</b>
6.1. Inicio del Plan de Contingencia .....	37
6.2. Medidas cautelares a adoptar en caso de sospecha de la presencia del organismo nocivo..	38
6.3. Medidas a adoptar en caso de confirmación de la presencia de un organismo nocivo .....	39
6.4. Erradicación del organismo nocivo .....	40
6.5. Consulta a los grupos de interés .....	41
6.6. Comunicación interna y documentación.....	41
6.7. Comunicación externa .....	42
6.8. Pruebas y formación del personal .....	42
6.9. Evaluación y revisión del plan de contingencia .....	42
6.10. Medidas en caso de incumplimiento .....	43
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y ENLACES DE INFORMACIÓN .....</b>	<b>44</b>



**PLAN ANDALUZ DE CONTINGENCIA**  
**NEMATODO DE LA MADERA DEL PINO**  
**(*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle et al.)**

## **1. INTRODUCCIÓN Y ALCANCE**

El Plan Andaluz de Contingencia <sup>(\*)</sup> recoge las medidas que deben adoptarse contra el nematodo de la madera del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*) con el fin de impedir su aparición y, en su caso, determinar su distribución para controlarlo y erradicarlo. El fin es establecer unos criterios horizontales básicos que proporcionen, un procedimiento básico de actuación que asegure una respuesta armonizada, rápida y eficaz ante un brote de esta enfermedad.

Los criterios y medidas que se describen a continuación de acuerdo a la legislación vigente son de aplicación en todo el territorio andaluz. En tanto la Comisión Europea no se pronuncie al respecto, la duración del programa se prevé ilimitada. En este sentido, y como consecuencia de la situación fitosanitaria de la enfermedad, el Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino podrá introducir las modificaciones que consideren necesarias o determinar su conclusión, consultado el Comité Fitosanitario Nacional.

El presente Plan Andaluz de Contingencia, constituye una herramienta de actuación armonizada para prevenir la introducción en el territorio andaluz del nematodo de la madera del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*) y, en su caso, para el control y erradicación del mismo.

(\*) En la reunión extraordinaria del día 27 de junio de 2008 del Comité Fitosanitario Nacional (CFN), se acordó establecer un Plan Nacional de Contingencia, de acuerdo con la directrices establecidas por la EPPO (Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas).

## 2. MARCO LEGISLATIVO

- Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal.
- Ley 43/2003, de 21 de noviembre, de montes.
- Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros.
- Real Decreto 1190/1998, de 12 de junio, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación o control de organismos nocivos de los vegetales aun no establecidos en el territorio nacional.
- Directiva 2000/29/CE del Consejo, de 8 de mayo del 2000, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad
- Decisión 2006/133/CE de la Comisión, de 13 de febrero de 2006, por la que se exige a los Estados miembros que adopten, con carácter temporal, medidas complementarias contra la propagación de *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nicle et al. (el nematodo de la madera del pino), en lo que respecta a zonas de Portugal distintas de aquellas en las que se haya comprobado su ausencia.

Modificada por:

- Decisión 2008/340/CE de la Comisión, de 25 de abril de 2008.
- Decisión 2008/378/CE de la Comisión de 15 de mayo de 2008.
- Decisión 2008/684/CE de la Comisión de 19 de agosto de 2008.
- Decisión 2008/790/CE de la Comisión de 7 de octubre de 2008.

### 3. MARCO COMPETENCIAL

#### 3.1. Organismos oficiales competentes

Las responsabilidades en materia de sanidad fitosanitaria corresponden al Estado y a la Comunidad Andaluza, de acuerdo a los siguientes distribución de competencia:

- **MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO**
  - **Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos**  
Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria  
Cometidos:
    - Representación en la Unión Europea (COPHS, Comité Fitosanitario Permanente, etc) y remisión de información.
    - Legislación básica (nacional)
    - Coordinación a través del Comité Fitosanitario Nacional.
    - Inspección fitosanitaria de envíos de terceros países en los puntos de entrada.
    - Inspección del las empresas de embalajes de madera para verificar el cumplimiento de la NIMF 15
  - **Dirección General de Gestión del Medio Natural**  
Subdirección General de Política Forestal y Desertificación  
Cometidos:
    - Gestión y coordinación de las Redes europeas de daños en bosques (inspecciones de puntos de la red europea de daños 16x16 km)
    - Estudios y valoraciones de la situación de las plagas forestales.
- **COMUNIDAD ANDALUZA**

Las comunidades autónomas desarrollan todas las competencias ejecutivas en el control del PWN, excepto la inspección de envíos de terceros países en los puntos de entrada.

Entre los cometidos que se realizan están:

- Prospección de las masas forestales
- Controles e Inspección de viveros, aserraderos e industrias de primera transformación de la madera
- Controles en el movimiento de materiales de riesgo
- Detección de los brotes y aplicación de las medidas de erradicación
- Envío de la información al MARM

El desarrollo de estos cometidos en la Comunidad Andaluza se ejecutan por los organismos siguientes:

Consejería de Agricultura y Pesca

Dirección General de la producción Agrícola y Ganadera

Servicio de Sanidad Vegetal

- Delegaciones Provinciales de la Consejería de Agricultura y Pesca

Departamentos de Sanidad Vegetal

Laboratorios de Producción y Sanidad Vegetal

Cometidos:

- Controles e inspecciones en viveros, aserraderos e industrias de primera transformación de la madera y controles en el movimiento de materiales de riesgo.
- Detección de los brotes y aplicación de las medidas de erradicación
- Coordinación interna y envío de información al MARM.

Consejería de Medio Ambiente

Dirección General de Gestión del Medio Natural

Servicio de Gestión Forestal Sostenible

- Departamento de Equilibrios Biológicos
- Delegaciones Provinciales de la Consejería de Medio Ambiente

Cometidos:

- Prospecciones y aplicación de las medidas de erradicación en masas situadas sobre terrenos forestales



#### IV Zona de la Guardia Civil

##### Comandancias Provinciales

##### Cometidos:

- Controles del movimiento terrestre de material vegetal procedente de Portugal

### **3.2. Órganos específicos de control oficial**

Los organismos competentes de las comunidad andaluza establecerán un **Equipo de Dirección de Emergencia** para tratar, en particular, los aspectos tácticos y operacionales del presente plan de contingencia utilizado diariamente. Este equipo será responsable para:

- Dirigir la prospección para determinar la extensión del brote y las posibilidades para la erradicación, así como los probables costes
- Dirigir la aplicación de las medidas de erradicación
- Movilizar y administrar los recursos necesarios para llevar a cabo la erradicación
- Establecer comunicación con otras organizaciones publicas o privadas concernidas.
- Designar un portavoz responsable para la comunicación interna y externa, así como para las notificaciones oficiales.

## **4. NEMATODO DE LA MADERA DEL PINO**

La seca del pino (= marchitamiento de los pinos) es una enfermedad causada por el nematodo de los pinos (Pine wood nematode = PWN) *Bursaphelenchus xylophilus*. El nematodo *B. xylophilus*, nativo de Norteamérica, no es la causa primaria de la muerte de los pinos nativos de Norteamérica, pero causa la muerte de algunas especies de pino exóticas introducidas en Norteamérica. En los países donde se ha introducido *B. xylophilus*, como Japón, Corea, China, Taiwán y Portugal la seca de los pinos es una enfermedad que puede alcanzar proporciones epidémicas.

Con esta sección se pretende poner a disposición de los productores, comerciantes y por el personal de los Organismos oficiales responsables una valiosa fuente de información.

#### 4.1. Antecedentes

Hacia los años 1900 se observó en Kyushu (Japón) un aumento anormal de la cantidad de pinos muertos. A principios de los años 1913, Yano reconoció las dimensiones epidémicas de la enfermedad que producía la muerte de los pinos. Más de sesenta años después se descubrió el agente primario de la enfermedad y se inició un manejo adecuado y una nueva concepción de la enfermedad como epidemia diseminada por un insecto. La enfermedad se estaba extendiendo desde 1905 y se conocía perfectamente la sintomatología, tal como se conoce actualmente, aunque el agente causante no se había identificado. Hasta entonces se había realizado un gran esfuerzo para desarrollar estrategias basadas en estudios entomológicos.

Ante la dificultad de conocer si el árbol estaba o no enfermo los entomólogos diseñaron una técnica para medir la cantidad de resina que se produce en la exudación. De hecho demostraron que había un elevado grado de asociación entre la cantidad de oleoresina exudada y la incidencia del efecto letal en el pino.

En 1969 Tokushige & Kiyohara estudiando hongos encontraron gran cantidad de nematodos viviendo en la madera, más tarde en 1972 el nematodo se describió por Mamiya & Kiyohara como *Bursaphelenchus lignicolus*. En 1971 Kiyohara & Tokushige sugirieron que *B. xylophilus* era el agente causante de la marchitez de los pinos (“seca de los pinos”) y *Monochamus alternatus* fue asignado como el principal vector de PWN en Japón. Inoculando con unas suspensiones del nematodo en árboles sanos se reproducen los síntomas que se producen en una infestación natural. Cuando los experimentos se realizaron en verano, 40-60 días después de la inoculación, los árboles se murieron.

Desde los años treinta la enfermedad se ha ido extendiendo por las zonas costeras de clima más cálido. En 1975 se encontró que la dispersión de PWN había dado un salto enorme, ya que apareció en puntos aislados en el norte del Japón, en un bosque cerca de una fábrica de pulpa de papel. Las factorías de pulpa y astilleros donde se acumula gran cantidad de troncos tienen un papel importante como puntos de inicio de la enfermedad. La presencia de la enfermedad se atribuye al transporte de troncos de pino infectados que fueron introducidos en áreas exentas del nematodo.

El incremento de las pérdidas, a pesar de las medidas de control, es debido por un lado a condiciones climáticas, mayor temperatura y sequedad, y otra debida a que en Japón como en muchas partes ha disminuido drásticamente el uso de restos de pinos y el tratamiento de los pinos, es decir, las prácticas silvícolas se han reducido de forma significativa.

En el territorio europeo fue detectado en junio de 1999, cuando Portugal comunicó al resto de Estados miembros y a la Comisión Europea que había comprobado que algunas muestras de pinos originarias de su territorio estaban infectadas por el nematodo del pino (*B. xylophilus*). De forma casi inmediata, la Comisión adoptó medidas de control y erradicación para que fuesen aplicadas por Portugal. En este sentido, la legislación vigente (*Decisión 2006/133/CE de la Comisión de 13 de febrero de 2006* y sus modificaciones posteriores) exige a los Estados miembros que adopten, con carácter temporal, medidas complementarias contra la propagación de *B. xylophilus* para proteger sus territorios.

#### **4.2. Sintomatología**

El desarrollo de la enfermedad y la muerte súbita de los árboles afectados es la característica fundamental de la marchitez del pino. Árboles que aparecen sanos a primeros de verano, mueren al final del verano (octubre), mostrando un follaje pardo rojizo. El signo externo más aparente por el cual se manifiesta la enfermedad es por el amarillamiento y el marchitamiento total de las acículas. Como si hubiera sido sometido el árbol una rápida desecación.

En los primeros estadios de la enfermedad se observa una reducción drástica de la exudación de resina. La reducción y cese de la exudación de resina es el primer síntoma interno detectable. Antes de que se descubriera el agente causante de la enfermedad, los entomólogos habían observado una relación muy estrecha entre la reducción de resina a principios de verano y la muerte de los árboles en otoño.

Los entomólogos habían investigado las condiciones bajo las cuales el coleóptero ataca a los árboles de pino. Demostraron que la ovoposición se realizaba solamente en árboles que no presentaban exudación de oleorresinas. Los árboles sanos producen mucha oleorresina que rodearía el huevo y la larva y los podría llegar a matar.

Kiyohara & Tokushige (1971) inocularon con *B. xylophilus* diferentes partes de los pinos *P. densiflora* y *P. thunbergii*. En todos los casos la inoculación produjo los mismos síntomas que en condiciones naturales. Para estudiar la cronología de la enfermedad en condiciones naturales Mamiya et al (1973) estudiaron la cantidad de oleoresina exudada. A finales de junio se observó el primer signo de enfermedad. Desde la mitad de julio a mitad de agosto los signos de la presencia de la enfermedad se fueron constatando progresivamente. Del total de árboles muertos al final de la estación 83 % se habían diagnosticado como árboles enfermos durante el periodo de estudio. Más del 90 % de los árboles murieron de agosto a mitad de octubre. Desde final de julio hasta mitad de agosto se observó la ovoposición por *M. alternatus* en árboles enfermos que no mostraron signos externos de la enfermedad.

El inicio de la enfermedad puede resumirse en las siguientes etapas:

1. Reducción y cese de la producción de exudados de resina. A mitad de julio los árboles afectados no presentan exudación de resina. En condiciones experimentales los árboles inoculados presentan reducción de resina y dos semanas después de la inoculación cesa completamente la producción de resina.



**Síntomas de la seca de los pinos originada por *Bursaphelenchus xylophilus*. Imágenes superiores en un jardín de Estados Unidos. Imágenes inferiores síntomas en *Pinus* spp. en condiciones naturales.**

2. La transpiración se reduce y finalmente cesa. La transpiración cesa de 20-30 días después de la inoculación. Durante este periodo no se observa síntomas de la enfermedad.

3. El marchitamiento y amarillamiento de las hojas se debe a la disminución de la transpiración. La desecación de la madera y disminución de la humedad en los vasos conductores de sabia son las características de la aparición de la enfermedad.



**Sintomatología de la seca del pino en distintos paisajes**

4. El árbol enfermo muere de final de agosto a octubre, alrededor de 30-40 días después de la aparición de los primeros síntomas. Las acículas marrón-pardas se mantienen en el árbol hasta el próximo verano.

En condiciones naturales la infestación por el nematodo se produce al penetrar este por las heridas producidas por *Monochamus* al alimentarse sobre las ramas jóvenes. Las LD penetran en los tejidos mudan a adultos e inician la reproducción. En experimentos de inoculación se observó un rápido movimiento de los nematodos desde el lugar de inoculación a través del tronco y ramas durante las primeras 24 horas después de la infestación. Después de la inoculación los nematodos entraron directamente en los canales resiníferos, invadiendo nuevas áreas y extendiéndose gradualmente hacia todas las ramas del árbol. Se demostró que las células del parénquima murieron antes de que el nematodo se dispersara por toda la madera e iniciara el desarrollo de la población.

Los resultados acumulados de muchos experimentos de inoculación de plantones, de árboles de un año han demostrado que la exudación de resina cesa por completo 6-9 días después de la inoculación. Cuando cesa la exudación de resina los nematodos solo se detectan en la zona donde se produjo la infestación. En los árboles inoculados alrededor de 20-30 días después de la inoculación decrece la transpiración y empiezan a aparecer marchitamiento en las hojas. El típico enrojecimiento de la pinocha es considerado como el síntoma más característico de la enfermedad, mientras que la muerte o sequedad de los árboles es el resultado del cese de la transpiración que origina decoloración y marchitamiento. Los árboles que se marchitan y finalmente se secan tienen nematodos en todas partes, en ramas, raíces y tallo.

En condiciones naturales, en Japón, los árboles infectados por *B. xylophilus* mueren en el año que se ha producido la infestación, menos de un 10% de los infectados muere al año siguiente al empezar la primavera. Esta es la evolución típica de la enfermedad en áreas calidas donde ha predominado una elevada infestación. La inoculación en verano originó una rápida aparición de la enfermedad, por el contrario una inoculación más temprana febrero a mayo resulto un desarrollo lento hasta llegar al verano. No se observaron árboles muertos si la inoculación se producía de septiembre a octubre. La muerte de los árboles tuvo lugar a los 40-60 días después de la inoculación durante el verano

En áreas más frías del norte del Japón, donde recientemente se ha producido la infestación, el 40% de los árboles muere entre enero y mayo del año siguiente. De acuerdo con las observaciones de Kishi (1977) los árboles que mostraron hojas rojizas y murieron en la primavera siguiente, habían sido diagnosticados como enfermos en septiembre mediante el estudio de los exudados de resina.

Estas observaciones indicaban un retraso en el desarrollo de la enfermedad en árboles que habían sido infectados a mediados de verano. Se observó experimentalmente que el desarrollo de la enfermedad podía ser controlado con la temperatura. En el norte del Japón y en el norte de EE.UU. se ha observado la muerte de algunas partes del árboles causadas por *B. xylophilus*.

El ambiente modifica la susceptibilidad de los pinos frente a PWN. Temperaturas elevadas y déficit hídrico en la estación de crecimiento favorece la intensidad y la dispersión de la enfermedad. El factor climático clave para el desarrollo, tanto de *B. xylophilus* como de las especies de *Monochamus*, es la temperatura; si bien las poblaciones de *Monochamus* de diferentes regiones climáticas muestran diferencias en las tasas de desarrollo y en las temperaturas óptimas. En Japón, las condiciones para el desarrollo epidémico de la enfermedad se dan con temperaturas medias altas, donde se sobrepasan los 24°C en el mes de agosto. En el suroeste del Japón el área más severamente infestada desde el inicio de la extensión de la enfermedad esta localizada en una zona de temperatura media anual de 15-16 °C.

En las zonas donde la temperatura media anual es de 10-12 °C el daño producido por PWN no es tan severo y puede considerarse como el estado de introducción de la enfermedad. Existen diferencias notables entre el desarrollo de la enfermedad en áreas de clima más frío y las de clima más cálido y también respecto a la extensión de la enfermedad. En las zonas de clima más frío al ser el desarrollo de *B. xylophilus* y de *Monochamus* mucho más lento se pueden establecer los centros de infección y de dispersión de la enfermedad.

De acuerdo con los resultados e información acumulada la evolución de la epidemia en áreas frías es diferente del que tiene lugar en las zonas calidas. Este comportamiento diferente en la evolución de la enfermedad se debe a las bajas temperaturas, que origina por un lado un menor desarrollo de la población de PWN y por otro y unido al anterior una desincronización de la relación forética PWN-Insecto.

Un patrón inoculado con PWN y mantenido a 25-30 °C, muere a los 40-45 días desde la inoculación, mientras que árboles inoculados y dejados a 20 °C y 15 °C no mostraron síntomas de la enfermedad. Los datos de Norteamérica y Japón muestran que el marchitamiento y muerte del arbolado producidos por la enfermedad, están íntimamente relacionados con las isotermas de verano. En particular no han sido observados síntomas de la enfermedad, aún existiendo poblaciones del nematodo, en las localidades donde la temperatura diarias medias son de 20°C e inferiores.

En las áreas frías casi la mitad de los árboles enfermos no mueren el mismo año de la infestación ya que mueren en la primavera o a primeros de verano del año

siguiente. El desarrollo de la enfermedad se atrasa en las zonas más frías. El desarrollo bianual de la enfermedad se ha observado también en árboles que han sido infectados en agosto en las zonas cálidas.

Se inicia la enfermedad a 25-30°C y se controla al reducir la temperatura a 18-20° C. El desarrollo de la enfermedad se reactiva si se aumenta la temperatura. En condiciones naturales el retraso en el desarrollo de la enfermedad se debe al efecto ralentizador que las bajas temperaturas tienen sobre la capacidad de multiplicación del nematodo. El nematodo se reproduce más despacio, tarda más en taponar los vasos conductores y la planta al transpirar menos por las bajas temperatura no se produce un estrés hídrico que la debilite y la marchite. En las áreas del norte más frías es frecuente observar la muerte de algunas ramas a causa de PWN. Esto se observa en EE.UU. y en Japón, y se considera que representa los síntomas del inicio de la enfermedad, porque en muchos casos a la muerte de esas ramas sigue la muerte del árbol en dos años. Las ramas muertas muy a menudo no son detectadas entre los árboles sanos y pueden servir como reservorio de *B. xylophilus*, ya que son usadas *Monochamus alternatus* para poner los huevos.

### 4.3. Hospedantes

Evans et al, (1996), a partir de la bibliografía mundial consultada y de las comunicaciones personales de los investigadores especializados en la materia, proporcionan una lista de las especies del género *Pinus* y de otras coníferas, con su grado de susceptibilidad a *B. xylophilus*, referida a la evidencia de la reproducción del nematodo en árboles vivos. No siempre queda claro por la literatura si la información proporcionada se refiere a plantas jóvenes de laboratorio o viveros o bien a árboles maduros. Es conocido que las plantas jóvenes muestran una mayor susceptibilidad a la invasión por el nematodo, especialmente a la inoculación artificial.

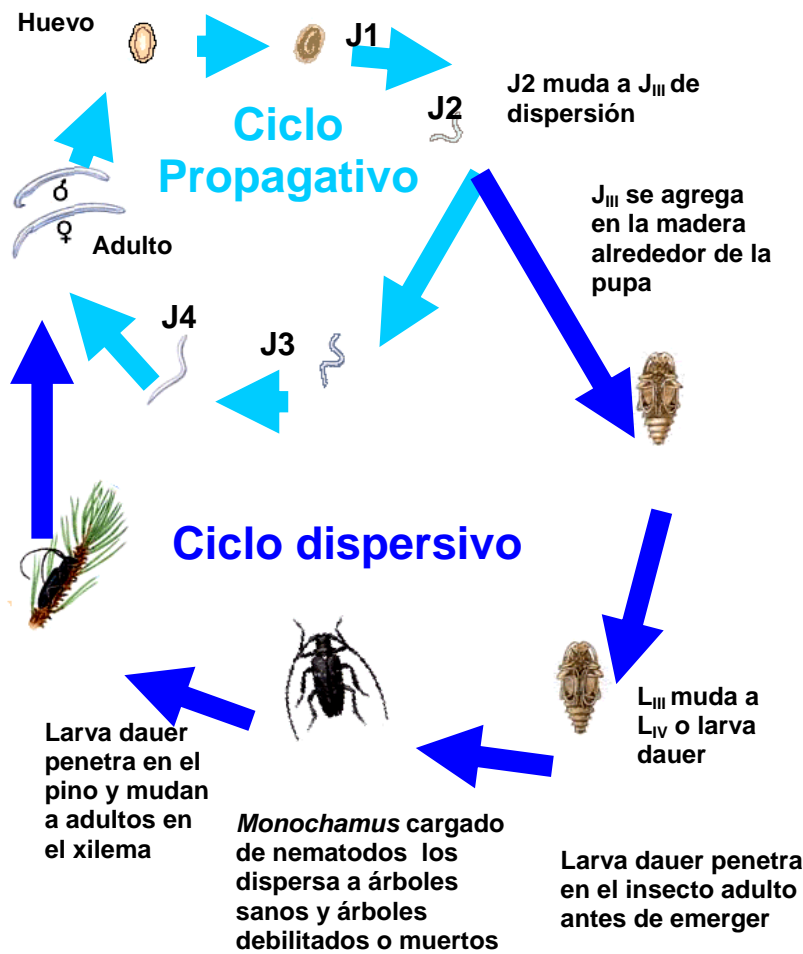
La susceptibilidad a la enfermedad debe distinguirse de la aptitud de *B. xylophilus* a colonizar árboles muertos durante la fase micófaga de su ciclo, en la que un mayor número de especies arbóreas puede ser colonizadas. Hasta el momento, sólo existe evidencia de una mortalidad extensiva en masas forestales del género *Pinus* de los países asiáticos alcanzados por la enfermedad.



De acuerdo a la legislación específica vigente (*Decisión 2006/133/CE*), se considera “madera y corteza sensibles” a la madera y a la corteza aislada de coníferas (*Coniferales*), excepto la de *Thuja* L., y “plantas sensibles” a las plantas (excepto los frutos y las semillas) de *Abies* Mill., *Cedrus* Trew, *Larix* Mill., *Picea* A. Dietr., *Pinus* L., *Pseudotsuga* Carr. y *Tsuga* Carr.

#### **4.4. Ciclo de vida de *B. xylophilus***

*B. xylophilus* completa su ciclo biológico en 5 días a 25 °C en *Botrytis cinerea*. La temperatura basal para el desarrollo de PWN es de 9.5 °C y a temperatura superior a 33 °C no se reproduce PWN tanto si entra en el pino a través de las heridas producidas por *Monochamus* al alimentarse en las ramas jóvenes (Transmisión primaria) como si entra al depositar los huevos (ovoposición) *Monochamus* (Transmisión secundaria) el nematodo se halla en el estadio 4º o larva dauer (LD) que es una forma de resistencia. Las LD al penetrar en los canales resiníferos se desarrollan en hembras y machos que inician la reproducción. La hembra produce 79 huevos durante 28 días de ovoposición. La hembra necesita ser refertilizada continuamente para que siga poniendo huevos. La eclosión del huevo origina juveniles de segundo estadio J2 que evolucionaran a J3, J4 y finalmente a adulto (ciclo de propagación o multiplicación). A continuación se muestra un diagrama con el ciclo biológico descrito:



Cuando la población de nematodos en la madera ha alcanzado el máximo desarrollo se inicia un declive y se origina juveniles de tercer estadio de dispersión diferentes del tercer estadio J3 de propagación. Los juveniles J3 de dispersión difieren morfológica y biológicamente ya que están adaptados a vivir en condiciones desfavorables, como sequedad, baja temperatura, falta de comida. De hecho este tipo de larva puede sobrevivir durante un periodo más largo que los otros tipos de estadios LD y adultos.

Desde el invierno hasta la primavera los juveniles J3 de dispersión migran en la madera de modo que se acumula alrededor de la cámara pupal de *Monochamus*. Al principio de la primavera todos los nematodos allí agregados son J3 de dispersión, estos se hallan situados a 1-2 mm de la madera que rodea la cámara pupal. La mayoría de los nematodos se encuentran en traquéidas y hay muchos más en la madera de primavera que en la de verano. Al final de la primavera los J3 de dispersión mudan a LD justo antes de que *Monochamus* emerja de la pupa. La agregación de los juveniles alrededor

de la cámara pupal y su posterior desarrollo a LD parece ser que esta influenciado por sustancias segregadas por la pupa.

*B. xylophilus* es muy móvil e incluso fuera del agua. Esta habilidad le permite pasar de la madera al interior del vector y de un trozo de madera a otro. *B. xylophilus* se mueve entre unos trozos de madera a otros en el suelo y entre las raíces de pino a otras raíces y de unas semillas a otras.

#### 4.5. Principales vías de entrada

La transmisión de *B. xylophilus* por *Monochamus* puede ser de dos modos.

- **Transmisión primaria.** Las larvas dauer (LD) penetran en el árbol sano por las heridas ocasionadas por *Monochamus* al alimentarse sobre las ramas jóvenes. Para que el nematodo pueda entrar en los canales resiníferos y alimentarse de las células epiteliales de los canales resiníferos (fase fitófaga) el árbol debe ser sensible.

La enfermedad epidémica del marchitamiento o seca del pino que termina con la muerte del árbol sólo se da cuando se produce la transmisión primaria y las condiciones ambientales de temperatura y déficit hídrico son elevados. La muerte de los árboles derivada de la acción de los nematodos es el resultado de la combinación de la susceptibilidad de la especie y de las condiciones de estrés en que se encuentre el árbol, generalmente altas temperaturas y bajas precipitaciones, tal como ocurre en Japón y China y en el caso de los pinos exóticos en el medio oeste de USA. El número de LD que lleva el cerambícido decrece con el tiempo. La cantidad de LD que pierde el insecto es escasa la primera semana, alcanza el máximo dos semanas después de la emergencia y baja al ir pasando el tiempo de vida del insecto.

- **Transmisión secundaria.** Se da cuando el insecto pone huevos sobre una rama muerta, sobre un árbol que se ha muerto recientemente o sobre el tronco o tocón de un árbol recién cortado. Esta segunda transmisión sirve para mantener las poblaciones. En la transmisión secundaria los nematodos e insectos explotan los recursos alimenticios del árbol muerto, las larvas de *Monochamus* se alimentan de las células del *cambium* y después de la madera y los nematodos de las hifas de los hongos, fundamentalmente *Ceratocystis*, introducidos por el mismo cerambícido o por otros insectos perforadores.

La transmisión secundaria sólo tendrá éxito cuando el ciclo de vida del nematodo y del insecto se complete y se sincronice de tal modo que se reasocie *B. xylophilus* con el vector.

A continuación se muestra el ciclo biológico de *Monochamus* y las fases de alimentación de *B. xylophilus* en el pino. La fase fitófaga del nematodo es por transmisión primaria mientras que la fase micófaga es por transmisión secundaria.



#### 4.6. Dinámica de la población de *B. xylophilus*

De acuerdo con los resultados experimentales los plantones de tres años inoculados cesaron de exudar resina, seis a nueve días después de la inoculación y casi todos los nematodos estaban en el lugar donde se produjo la inoculación. De nueve a doce días después de la inoculación se observa un incremento de la población y se observan los síntomas de la enfermedad. Los mismos resultados se obtuvieron con plantones de un año. *B. xylophilus* raramente se detecta en la madera de los árboles cuando empieza a cesar la exudación de oleorresinas.

Después de la reducción y cese de exudación de resina, empieza a aparecer muchos huevos y juveniles J2 en los canales resiníferos, que indican el progresivo incremento de la población del nematodo. La destrucción de las células epiteliales, rayos y *cambium* coincide con el incremento de la población de PWN. En un árbol recién muerto se pueden encontrar nematodos en cualquier parte del árbol.

Después de alcanzar el máximo la población decrece gradualmente al irse deteriorando el pino. En este estadio de evolución de la población aparecen los juvenil J3 de dispersión y al pasar el tiempo la proporción de J3 de dispersión aumenta hasta llegar a ser el total de la población en madera. En invierno y a la primavera siguiente no se encuentran juveniles de otro tipo que no sea J3 de dispersión.

La dinámica de la población de PWN es diferente para los árboles que mueren en el mismo año que para los que presentan la enfermedad bianual. En los árboles que mueren en el mismo año de la infestación, las poblaciones son elevadas y están distribuidas por todo el árbol. En varios muestreos se ha observado que en las áreas donde el ciclo es bianual la distribución del nematodo esta limitada a algunas partes del árbol por lo que los nematodos no se podían detectar en maderas recogidas de las partes bajas de esos árboles enfermos.

Debido al retraso en la aparición de la enfermedad los árboles no son reinfectados (transmisión secundaria) por el insecto, porque el periodo de ovoposición de los insecto ya ha pasado cuando el árbol esta enfermo. Posiblemente los árboles que desarrollan la enfermedad con el modo bianual no puedan servir como fuente de inoculo para la nueva estación pero si para el año siguiente. Estos pinos permanecen con la madera suficientemente fresca y húmeda como para proporcionar lugares de ovoposición para los primeros *Monochamus* adultos de la primavera siguiente.

La emergencia del adulto de *Monochamus* en áreas frías es un mes más tarde que en las áreas cálidas, por lo que el periodo de emergencia en áreas frías es de un mes y en las áreas calidad de dos meses. En las áreas cálidas la ovoposición temprana y las elevadas temperaturas del verano permiten que las larvas se desarrollen casi todos los estadios larvarios del ciclo antes de que llegue el invierno. En las áreas frías el crecimiento de la larva de *Monochamus* sólo llega al segundo estadio larvario, por lo que estas larvas tardan dos años en desarrollar todo el ciclo.

*Monochamus alternatus* tiene una generación anual pero ocasionalmente hay una sola generación en dos años. El porcentaje de insectos que tienen una generación cada dos años se incrementa en las zonas frías. De acuerdo con los datos acumulados, el número de LD que llevan los insectos de una generación de dos años es menor que la que llevan los insectos de una generación anual. La tasa de reproducción del insecto es mucho menor en áreas frías que en áreas cálidas. La temperatura fría en verano parece ser el factor primario que retrasa la extensión de la enfermedad.

Mamiya (1983) señala que se pueden reconocer dos aspectos respecto al aumento de la población de *B. xylophilus* en árboles enfermos. El primero se refiere a la patogenicidad del nematodo y el segundo al aumento de la población y distribución de esta población a través de todo el árbol. El primero tiene influencia en el segundo porque sólo si los nematodos tienen éxito y originan una respuesta patológica en el huésped podrán desarrollar más tarde un aumento de la población y por tanto llevara este aumento a la aparición de un árbol enfermo.

La inoculación a diferentes especies de pino ha permitido observar diferentes grados de susceptibilidad de las especies de pinos frente a *B. xylophilus*. Las especies nativas del Japón *P. densiflora*, *P. thunbergii*, *P. luchensis* son muy susceptibles, mientras que otras especies de pino exóticas en Japón son resistentes.

#### **4.7. Formas de dispersión**

El rango de dispersión de *B. xylophilus* dependerá de la capacidad de dispersión de *Monochamus*. La dispersión de la enfermedad dependerá de la presencia de especies susceptibles y de las condiciones ambientales. La experiencia adquirida por los Japoneses en el tema demuestra que la actividad humana y las practicas selvícolas es uno de los factores más importantes en la dispersión de *Monochamus* y de *B. xylophilus*.

*Monochamus* vuela sólo 100 m, aunque puede llegar a 3 km o más. La distancia de dispersión natural de *B. xylophilus* a nuevos árboles depende del comportamiento de *Monochamus* spp. en la búsqueda de lugares de cría y alimentación. Es normal que la dispersión esté relacionada directamente con la disponibilidad de material apto para la cría y por tanto la transmisión por ovoposición sea el medio más importante para la dispersión del nematodo, pero en Asia, donde la enfermedad es epidémica y se expresa

con el marchitamiento de los pinos, la transmisión durante la alimentación de los adultos es también muy importante. A su vez, la capacidad de vuelo y su actividad depende de la temperatura y de la proximidad de los árboles hospedantes atractivos.

El requerimiento por parte del insecto de ser fertilizado frecuentemente y antes de la ovoposición ha propiciado el hecho que la dispersión del insecto con el nematodo asociado no haya sido mucho mayor. Se ha detectado el insecto y el nematodo muchas veces entre la madera que se ha importado de USA a Europa. La posibilidad de que el nematodo haya sido introducido no se puede descartar ya que el insecto pone huevos aunque no estén fertilizados con lo cual la transmisión del nematodo es posible.

Sin embargo, la actividad humana en sus prácticas forestales habituales, el comercio y el transporte ocasional y aleatorio con todo tipo de vehículo son capaces de dispersar a grandes distancias *B. xylophilus*, sus vectores o ambos como así ha sido demostrado en la práctica.

Por otra parte *B. xylophilus* es un organismo con una notable plasticidad biológica. Ha demostrado esta plasticidad al colonizar nuevas áreas y adaptarse a nuevas situaciones, tales como las de China, Corea, Japón y Portugal, donde ha invadido los ecosistemas de áreas lejanas de su distribución geográfica original, adaptándose a diferentes especies hospedantes, diferentes vectores y posiblemente a condiciones climáticas diferentes.

#### **4.8. Caracterización de los vectores de *B. xylophilus***

Muchas especies de *Bursaphelenchus* están asociadas a coleópteros y son dispersados por ellos. Especies xilófagas de las familias *Cerambycidae*, *Buprestidae* y *Curculionidae* se han citado como insectos que transportan individuos de *B. xylophilus* en sus cuerpos, pero no tienen ningún papel como vectores de la enfermedad en la naturaleza (Linit et al., 1983).

El género *Monochamus* incluye numerosas especies no bien catalogadas. Se ha estudiado la biología y el ciclo biológico de *M. alterntus*, *M. caroliniensis*, *M. titillator*, *M. scutelatus* y *M. notatus*. Las especies difieren en algunos aspectos como la tasa de

desarrollo, el comportamiento en la ovoposición y muestran todas ellas rasgos comunes en el ciclo biológico.

Las hembras de *Monochamus* son atraídas por sustancias volátiles que se desprenden de los árboles que han sufrido un estrés o que han sido cortados recientemente. Ikeda et al. (1979) demostraron que ciertos monoterpenos y etanol desprendidos por el pino cuando se seca o está casi seco atrae a los insectos para realizar la ovoposición.

El cruzamiento y puesta se realiza en la oscuridad, encima del tronco de árbol cuando la hembra está masticando la corteza para realizar el orificio donde pondrá el huevo. El cruzamiento se realiza durante todo el periodo de vida de la hembra para asegurar que los huevos son fértiles. Se ha comprobado que la fertilización es necesaria inmediatamente antes de la ovoposición.

*M. carolinensis* y *M. alternatus* ponen un solo huevo por orificio. La larva se llama “sawyers” porque hace un ruido característico cuando construye la galería. La larva se alimenta primero en la parte interior de la corteza, *cambium* y floema, la segunda y tercera muda comen en la zona de los vasos liberianos originando una galería superficial llena de material fibroso, después tuerce hacia madera y forma una galería en forma de U que termina a pocos milímetros del *cambium*. La cámara pupal se forma en el extremo exterior del túnel, donde la larva inicia la diapausa alrededor de octubre.

*M. alternatus* y *M. scutellatus* presentan cuatro estadios de desarrollo larvario antes del inicio de la pupación. El ciclo de *Monochamus* es de 8-12 meses cuando no tiene hibernación, aunque en las áreas de clima frío puede haber una generación cada dos años. La larva pupa entre abril y julio. El periodo de pupación depende de la temperatura y requiere 46 días a 15 °C, 20 días a 20 °C y 12 días a 25 °C.

El adulto emerge entre mayo y julio o mucho antes en las regiones más cálidas. La mitad de los adultos han emergido entre la mitad de junio y primeros de julio, aunque puede prolongarse casi hasta octubre. La temperatura límite para el desarrollo de la larva a adulto es de 11 °C. El adulto después de salir de la cámara pupal permanece en estado de quiescencia durante 5-7 días y entonces abandona el árbol haciendo un



orificio de 6-10 mm en la madera y corteza. Tras emerger vuela a las ramas jóvenes del año o del año anterior y se alimenta de la corteza.

El periodo de maduración sexual dura diez días en algunas especies, aunque en otras puede durar de tres a cuatro semanas. Cuando está plenamente desarrollado, ya puede empezar a poner huevos. Los adultos cuando están maduros se mueven entre los árboles muertos o debilitados o recién cortados para aparearse y poner huevos. Pone huevos de junio a agosto, la mayoría entre julio y final de agosto. La hembra vive alrededor de tres meses y sigue poniendo huevos hasta que muere.

La larva del insecto y el nematodo obtienen alimento del árbol muerto y se desarrollan independientemente. Sólo vuelven a estar en contacto cuando *B. xylophilus* en el estadio LD invade el cuerpo del imago de *Monochamus* justo antes de salir del árbol.



*Monochamus* spp. A. larva, B. pupa en el interior de la cámara pupal, C. Imago saliendo del árbol, D. Imago alimentándose en un rama joven, E. Imago sobre una rama de pino.

## 5. METODOS GENERALES DE DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN, PREVENCIÓN Y CONTROL

### 5.1. Métodos de detección e identificación

El objetivo es determinar si el nematodo del pino, *Bursaphelenchus xylophilus*, está presente en nuestro territorio.

#### 5.1.1. Selección de lugares de prospección

El criterio de prospección está basado en las características biológicas del vector y del nematodo de la madera del pino y se dirige a esos árboles que tengan más probabilidad de ser colonizados por *Monochamus* spp y, consecuentemente podría haber transmisión del nematodo del pino. Por tanto, para ser calificado como un lugar de prospección, deben emplearse las siguientes características para la selección: prospecciones previas, rango de hospedantes conocidos de PWN y *Monochamus* spp., registros de historial reciente y áreas de explotación comercial forestal, estado de salud (fuego, viento, daños por nieve etc.), presencia y distribución de *Monochamus* spp., puntos de importación de madera (incluyendo madera de embalaje) manejo o almacenamiento.

Asumiendo que no hay registros previos de *B. xylophilus* en un área, el muestreo debería dirigirse a árboles cercanos a lugares con probabilidad de ataque de *Monochamus* spp. y, por asociación, presencia potencial de PWN. Donde estos lugares no existan, deberán ser prospectadas las masas forestales aparentemente sanas. En todo caso el objetivo de muestreo deberían ser árboles en decaimiento, preferentemente árboles moribundos o recientemente muertos que muestren evidencia de infestación por escarabajos cornilargos del género *Monochamus*.

Los siguientes síntomas servirán como indicativo para el muestreo: decoloración, (por ejemplo amarilleamiento) de agujas, marchitez, evidencia de ataques de insectos, (por ejemplo típica larva cabeza-plana (por ejemplo la típica larva cabeza-plana de *Monochamus* de debajo de la corteza o las galerías ovales (agujeros de larva) o agujeros de salida de adultos), mancha azul crecimiento fúngico en la madera, y falta de flujo de resina de las heridas.

Para comprobar el índice de flujo de resina es necesario que los árboles estén aún verdes, quitando parte de la corteza desde la capa del *cambium*. En árboles sanos se cubrirá la superficie de madera con resina en una hora, mientras que habrá reducción o ausencia de flujo de resina en pinos no sanos. Sin embargo, estos síntomas no son específicos y pueden ser causados por factores físicos u otros patógenos.

Por el momento, no existe un método para distinguir visualmente entre árboles que están muriendo por la enfermedad de la marchitez del pino y aquellos que mueren por otras razones. También debería tenerse en cuenta que la presencia de PWN en árboles no está asociada siempre con síntomas de marchitez y que la presencia del nematodo en un árbol puede ser localizada en los lugares de oviposición.

➤ **Prospecciones en lugares con la más alta probabilidad de presencia del nematodo de la madera del pino**

Bosques de especies susceptibles dentro de un radio de 5 kilómetros desde puntos de importaciones de madera (puertos), preferentemente aquellas relacionadas con países donde PWN está presente, lugares de manejo o almacenamiento de la madera importada (aserraderos y centros de procesamiento de madera).

La madera de embalaje es también una vía de riesgo para la entrada de PWN y su vector. La madera de embalaje en la mayor parte de los casos es importada en contenedores sellados, de modo que es el punto de destino, más que el punto de importación, el que presenta un riesgo más alto. Donde sea posible identificar importadores que estén importando mercancías asociadas con madera bruta de embalaje (por ejemplo piedras de asía) desde países donde el PWN está presente y donde sea probable que tal madera de embalaje haya sido almacenada en grandes cantidades. Muestrear bosques dentro de un radio de 5 kilómetros de radio de esas áreas de almacenamiento.

Fuentes de potenciales árboles hospedantes (por ejemplo pequeños bosques, árboles aislados, árboles de parques, etc) alrededor de puntos de importación, manejo o almacenamiento de madera.

### ➤ **Prospecciones en otros lugares**

Áreas que muestren síntomas de decaimiento (áreas salvajes, incluyendo declive de bosques, sequías, etc.).

Bosques de especies susceptibles que hayan pasado calamidades tales como vendavales, daños por nevada, y especialmente, incendios forestales; se sabe que los escarabajos de *Monochamus* son atraídos por incendios forestales y son comúnmente invasores secundarios en los años siguientes a un incendio forestal.

En cuanto a áreas que no muestren síntomas de decaimiento, por ejemplo bosques que sólo presentan árboles sanos con pocos o ningún árbol muerto recientemente, tales lugares solo serían prospectados y muestreados si no se dispone de ninguno de los lugares de prospección arriba mencionados.

#### **5.1.2. Selección de especies de coníferas**

**Selección en los lugares con la más alta probabilidad de presencia del Nematodo del pino:**

- En estos lugares la selección de especies de coníferas se basará en árboles en decaimiento salud y/o evidencia de actividad de *Monochamus* spp., por tanto no es necesario centrarse solo en especies susceptibles de *Pinus*. De todos modos, cuando sea posible, se debe dar preferencia a *Pinus nigra*, *P. pinaster* y *P. sylvestris*.

**Selección en otros sitios:**

- Debe darse preferencia a *P. nigra*, *P. pinaster*, y *P. sylvestris*, las coníferas europeas consideradas como más susceptibles a *Bursaphelenchus xylophilus*. De forma particular en el caso de bosques al sur de la isoterma 20° Julio/Agosto, la zona donde puede esperarse en pinos susceptibles que se de la marchitez del pino.

### 5.1.3. Protocolos generales de muestreo

La distribución de nematodos puede ser muy localizada dentro de los árboles, especialmente justo después de que hayan sido introducidos por oviposición o por la maduración del escarabajo vector.

En los casos de enfermedad de marchitez del pino los nematodos pueden propagarse muy rápidamente llegándose a encontrar en alto número en todas las partes del árbol excepto en agujas, conos y semillas. Debería tomarse nota de que *Bursaphelenchus xylophilus* invade también el sistema radicular y puede sobrevivir allí por un cierto período de tiempo cuando el árbol está ya muerto y desecado o ha caído. De todos modos, en árboles no-susceptibles, bajo condiciones desfavorables climáticas, o dependiendo de la situación fisiológica del árbol, el ataque del *Bursaphelenchus xylophilus* puede darse en forma de distribución limitada dentro de árboles, por ejemplo, una infestación de *Bursaphelenchus xylophilus* puede establecerse en la copa o en partes de la copa sin más dispersión a otras partes.

#### ➤ Toma de muestras

En todos los casos el material de muestreo debería ser esterilizado por limpieza de residuos e inmersión en alcohol absoluto, o sustancia de similar capacidad desinfectante, entre las distintas prospecciones en diferentes lugares. Esto minimizará la potencial contaminación cruzada entre distintos lugares:

**- Árboles recientemente muertos (en suelo o aún en pie) y árboles en decaimiento (sospechoso de ser causado por PWN)**

Dada la posibilidad de distribución desigual de nematodos dentro del árbol, las muestras pueden ser tomadas de partes diferentes del tronco del árbol, por ejemplo en la copa, en el centro y aproximadamente 1.5 m. por encima del nivel del suelo. Para evitar la contaminación con la mayor parte de especies saprófagas de nematodos, la corteza debería ser eliminada antes del muestreo.

El mejor método para valorar los nematodos es cortar discos de madera en tres puntos a lo largo de la longitud del árbol. Quitar la corteza, valorar la presencia de

mancha fúngica (azul o gris) o sistemas de galerías de insectos (agujeros de larva). Eliminar un sector de la mancha/parte infestada por insectos del disco. Cortar en piezas pequeñas usando un método que no genere calor. Tomar un total de al menos 30 g. por disco.

Usar un taladrador eléctrico o mecánico con un taladro de al menos 20 mm de diámetro; el diámetro del taladro no es crítico pero los taladros más pequeños pueden generar más calor que los grandes. Taladrar despacio para evitar producir calor y taladrar hasta una profundidad de 4 cm. Dependiendo del diámetro del taladro usado, se necesitan varios agujeros para reunir la cantidad requerida de material, que debería ser un total de 30 g. por taladro.

También puede usarse un barrenadora de Pressler, tomar centros de madera desde diferentes partes del árbol para conseguir una muestra de al menos 30 gr. por árbol.

En áreas en las que se conoce la presencia de escarabajos *Monochamus*, pueden usarse troncos caídos durante el período de vuelo de los escarabajos como troncos trampa. Los escarabajos son atraídos a ellos para la oviposición y ha sido probado que la transmisión del nematodo puede darse en tales casos. (LUZZI et al., 1984; DWINELL, 1997). Muestreando la madera o los escarabajos emergidos podrá realizarse un seguimiento de la presencia de *Bursaphelenchus xylophilus* en un área limitada. Los escarabajos pueden completar su ciclo vital en ese material. También es posible acelerar el desarrollo del escarabajo llevando los árboles trampa al laboratorio en otoño. Los escarabajos emergerán algunas semanas antes de que hayan emergido bajo condiciones naturales. (SCHÖNFELD, 2006). Las muestras de madera pueden ser tomadas de los troncos trampa por los métodos descritos antes para árboles.

Las cantidades citadas son aquellas que son realmente procesadas en el laboratorio. Es preferible tomar muestras mayores en campo y usar pequeñas submuestras para el proceso.

En cada lugar, tomar muestras desde al menos 1 árbol, pero preferentemente 5 árboles. Esto dependerá de los números de árboles insanos o muertos presentes. Es importante tomar una muestra representativa del lugar; si hay muchos árboles no sanos

o muertos, sería sabio tomar muestras de más árboles. Para cada lugar, combinar muestras de no más de 5 árboles para al final hacer una extracción total de alrededor de 150 gr.

**- Aserraderos y almacenes de maderas**

Se tomarán muestras de cualquier lote de madera sensible al nematodo del pino, preferiblemente sobre madera cortada en el año en curso para detectar las larvas de los perforadores y los nematodos antes de que el insecto se desarrolle o se mueran los nematodos en la madera seca.

- Se dará preferencia a las maderas que presenten algún tipo de síntomas (azulados, orificios o galerías de salida de perforadores). Si existe suficiente material vegetal sintomático se recogerán varias muestras que representen lo mejor posible los síntomas observados.
- No se mezclarán muestras sintomáticas y asintomáticas.
- No se mezclarán trozas de diferentes especies, aún proviniendo del mismo lote de madera.
- No se cogerán muestras de corteza, ni serrín.
- En el caso de que exista madera importada y madera nacional, se deberán separar las muestras, y conocer inequívocamente la procedencia de la madera para seguir su trazabilidad.
- Si es posible se tomarán varias submuestras en diferentes partes del lote de madera y se fusionarán en una sola o en varias, según considere el inspector, teniendo en cuenta el volumen del parque de madera o de la industria.
- Las muestras se tomarán de virutas o astillas de:
  - Madera almacenada
  - Montones de chips de madera
  - Tablas o tablones o de pilas de madera aislada.
- La toma de muestras se puede realizar con diversos utensilios que saquen virutas (formón, etc.) o un taladro eléctrico. El taladro puede de ser de batería recargable, aconsejándose una broca de unos 20-25 mm. La velocidad será lenta para que no caliente las virutas y mate a los nematodos.

El tamaño de la muestra será de al menos 150 gr. por lugar de origen del material muestreado. Es muy importante consignar el volumen total de la partida donde se ha tomado la muestra.

Al realizar la toma de muestras se pueden contaminar los instrumentos de trabajo (brocas, recogedor, formón, etc.), por lo que es imprescindible que entre muestra y muestra se desinfecten los útiles de muestreo. Una forma sencilla de desinfección es la inmersión del útil de corte en líquido desinfectante o mediante pulverización con éste, copiosamente, hasta llegar a goteo, dejando secar al aire. Como productos desinfectantes se pueden utilizar lejía, alcohol de 96 (al 70%), cloruro de benzalconio, etc.

### **- Árboles sin síntomas**

Si no es posible encontrar árboles (o partes de árboles) en decaimiento, entonces las muestras deberían ser tomadas de árboles asintomático. El muestreo de árboles completamente sanos, fuera de áreas con factores que incrementen la probabilidad de PWN y presencia de vectores, debería hacerse solo si no hay alternativa.

El procedimiento de toma de muestras será similar al caso de árboles recientemente muertos o con decaimiento. Notese que incluso árboles de apariencia saludable pueden estar infectados con el nematodo pero debido al tiempo de transmisión, clima, etc. los nematodos pueden estar localizados en la copa de los árboles donde la alimentación para maduración *Monochamus* spp. ha tenido lugar. Por ello, es aconsejable tomar muestras también de las partes altas del árbol y la copa.

### **- Detección de insectos**

Aunque normalmente no se dispone de un sistema de trapeo efectivo con trampas específicas para especies *Monochamus* y un atrayente específico o feromona, podría ser útil investigar la presencia del nematodo incluso en un número bajo de escarabajos (por ejemplo capturas en árboles trampa). La larva de nematodo está normalmente presente en el 4º instar, etapa de dispersión (lapso juvenil) en la traquea y en el organismo de los escarabajos. Para aislar nematodos, se diseccionan y aplastan los escarabajos en recipientes apropiados y se guardan en agua entre 24 a 48 horas a 24° C



(SOUSA et al. 2001). Durante las etapas juveniles dejarán los escarabajos y pueden ser cultivados en *Botryotinia fuckeliana* (anamorfo: *Botrytis cinerea*) cultivado en agar malta para una mejor identificación. También puede usarse la técnica Baermann funnel para extraer los nematodos de las escarabajos. Donde puedan efectuarse técnicas moleculares, podrán usarse para identificar los nematodos a nivel de especie.

#### ➤ Manejo de las muestras

- Las muestras se introducirán en bolsas de plástico con cierre hermético o que pueda cerrarse herméticamente con un dispositivo adecuado.
- Cada una de ellas se identificará con una etiqueta, en la que se incluirá un número o código de referencia, y se introducirá en el interior de ésta.
- Si se toma la muestra en aserraderos e industrias de la madera, en la bolsa también se escribirán estos datos con rotulador indeleble. La referencia o número de las muestras se indicará en el Acta de inspección (incluida en el protocolo de inspección de aserraderos e industrias de la madera.
- En el acta de inspección se deberá anotar de cada una de las muestras: el número o código de referencia, fecha de recogida, especie de conífera y su procedencia, punto de toma de muestra, municipio, provincia, los datos del titular de la empresa, coordenadas de la misma, etc., así como cualquier otro dato que se considere de interés.
- Finalmente las muestras, una vez cerradas, precintadas y correctamente identificadas se enviarán al laboratorio de diagnóstico para su análisis. Si no fuese posible su envío inmediato podrá almacenarse a temperatura ambiente, en un lugar donde no haya cambios bruscos de temperaturas, preferentemente entre 25°-30°C.

#### 5.1.4. Identificación

Para la identificación, las muestras se someten a un proceso de extracción que puede basarse en métodos fundamentados en la movilidad de los nematodos (por ejemplo, la técnica del embudo de Baermann que implica la inmersión de pequeños trozos de madera en agua) o que impliquen la maceración, filtración y centrifugación final para aislar tanto a los nematodos muertos como vivos.

El *Bursaphelenchus xylophilus* puede ser identificado en base a criterios morfológicos y/o varias técnicas moleculares. El último sumario del género *Bursaphelenchus* codifica 75 especies de los géneros que pueden ser encontrados en RYSS et al (2005) aunque ya se han descrito algunas nuevas especies *Bursaphelenchus*.

La identificación morfológica tiene que ser confirmada por técnicas moleculares en el caso de:

- a) encontrar únicamente larvas (*Aphelenchoididae*) sospechosas de pertenecer al género *Bursaphelenchus*
- b) encontrar típicos machos o hembras, con un mucrón, que podría pertenecer a *B. mucronatus*, *B. xylophilus* o *B. fraudulentus*
- c) primera detección en una región.

#### ➤ **Identificación morfológica**

*B. xylophilus* presenta las características típicas del género *Bursaphelenchus*: Cuerpo de 0.4 - 1.5 mm. Cutícula estriada, banda lateral con 0-4 estrías. Región labial elevada y diferenciada. Estilete de 10- 26 µm, cono delgado y atenuado, base robusta con nódulos débiles. Vulva 70-80 %, con saco uterino postvulvar. Región caudal del macho curvada en forma de palo de golf. Bursa pequeña, terminal y sin costillas.

Los machos de *B. xylophilus* presentan espícula grande, *capitulum* aplanado, *condylus* pequeño, contorno de la lamina dorsal angular en el tercio posterior. *Cucullus* presente en la terminación de la espícula. La hembra presenta membrana vulvar bien desarrollada. Región caudal subcilíndrica con la terminación redonda. Algunas poblaciones de Estados Unidos se han descrito con un diminuto mucrón.

#### ➤ **Identificación molecular**

La identificación molecular está basada en varias técnicas como pruebas de hibridación de ADN (Abad et al., 1991, Tares et al., 1994) y varias técnicas de PCR (Braasch et al., 1999). Braasch et al. (1999) han usado técnicas de PCR basadas en ITS-RFLP para diferenciar 17 especies de *Bursaphelenchus*.

Para el análisis PCR-RFLP se recomienda utilizar de 1-50 ejemplares, no importa machos o hembras se colocan en un ependor con búfer de lisis (1X PCR búfer, 60 mg/ml de proteasa K ) y se calientan a 60 °C durante una hora y después se hierve durante 15 minutos. Después el tubo de ependor se centrifuga y se toma 5 µl del sobrenadante que será usado para la amplificación de ADN.

Se usa en la PCR los cebadores 5'-CGTAACAAGGTAGCTGTAG-3' (Ferris et al., 1993) y 5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3' (Vrain, 1993), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 200 mM de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP y 1 unidad de DNA-Polimerasa. La desnaturalización inicial se realiza a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, de 1 minuto a 55 °C, de 1 minuto a 72 °C y finalmente 5 minutos a 72 °C para terminar la elongación.

La identificación molecular se efectúa según el protocolo de diagnóstico establecido a través de la normativa EPPO, específico para *Bursaphelenchus xylophilus*.

## **5.2. Métodos de prevención y control aplicados en la Comunidad de Andalucía**

Durante el presente año 2008, la aparición de nuevos brotes del nematodo del pino en zonas de Portugal, en las cuales hasta entonces no se había observado su presencia, ha obligado a modificar la Decisión 2006/133/CE para ampliar las medidas provisionales en ella prevista. En el caso de España, por la proximidad de los brotes con la frontera entre ambos países y el consiguiente riesgo de dispersión natural y de acuerdo con dicha decisión, se establecieron las siguientes medidas complementarias de emergencia para prevenir la introducción del nematodo de la madera del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*) en el territorio español, aprobadas en el Comité Fitosanitario Nacional de 23 de julio de 2008:

### **➤ Prospecciones en masas forestales**

De acuerdo a la consideración de zona demarcada para todo el territorio de Portugal continental, estableciéndose una zona tampón de 20 km en el territorio portugués que bordea la frontera con Andalucía, se establece una zona de alto riesgo a partir de la frontera con Portugal que abarca una franja de 20 km desde la misma, equivalente a la zona tampón en el territorio portugués. Además, se establece otra zona,

de riesgo medio, que abarca 80 km a partir del final de la zona tampón andaluza, es decir, las dos zonas señaladas abarcarían 100 km desde la frontera. El resto del territorio pertenece a una tercera zona denominada de Bajo Riesgo.

En función de dichas zonas de riesgo, se han establecido las siguientes intensidades y características de vigilancia:

**ZONA 1:** De **alto riesgo** (Franja de 20 km. desde la frontera con Portugal).

1. Se tomarán muestras sobre todos los puntos que una *malla de 2x2* kilómetros determine en aquellas masas con presencia de coníferas (admitiéndose un desplazamiento del punto teórico de hasta 200 metros en cualquier dirección).
2. Se tomará siempre, al menos, una muestra (muestre el árbol síntomas o no) siguiendo el protocolo vigente hasta la fecha.
3. Ante la presencia de varias especies, se tomará siempre sobre la más sensible. Las prospecciones en Portugal sólo han determinado positivos sobre *Pinus pinaster* por lo que se considerará este especie como especialmente sensible frente a otras.
4. Se determinarán las coordenadas de los puntos reales de muestreo en UTM (European Datum 50 – Huso 30).

**ZONA 2:** De **riesgo medio** (Franja comprendida entre los 20 y los 100 km. desde el límite con la zona de riesgo alto).

1. Se tomarán muestras sobre todos los puntos que una *malla de 4x4* kilómetros determine en aquellas masas con presencia de coníferas (admitiéndose un desplazamiento del punto teórico de hasta 400 metros en cualquier dirección).
2. Los criterios sobre el muestreo y la toma de datos serán igual que en la ZONA 1 (puntos 2, 3 y 4).

**ZONA 3:** De **bajo riesgo** (resto de Andalucía)

- 1.- Prospección sobre malla de 8x8:
  - a) Se tomarán muestras sobre todos los puntos que una *malla de 8x8* kilómetros determine en aquellas masas con presencia de coníferas

- (admitiéndose un desplazamiento del punto teórico de hasta 800 metros en cualquier dirección).
- b) La inspección se fundamentará en la determinación del estado vegetativo de la masa entorno al punto teórico de muestreo.
  - c) Se procederá a la toma de muestras, según el protocolo, en aquellos puntos donde el valor medio de la defoliación de la masa observada sea superior al 25 % (árbol dañado) o bien se observen signos o síntomas del nematodo.
  - d) Los criterios sobre las especies a prospectar y la toma de datos serán igual que en la ZONA 1 (puntos 3 y 4).
  - e) Será necesaria, por tanto, la visita de todos los puntos y la cumplimentación de la ficha indicando si se ha tomado muestra o no y las razones para ello.

## 2.- Prospección sobre malla de 16x16

- a) Se tomarán muestras sobre todos los puntos que esta malla determine en aquellas masas con presencia de coníferas.
- b) Los criterios sobre el muestreo y la toma de datos serán igual que en la ZONA 1 (puntos 2, 3 y 4).
- c) Ante la coincidencia de puntos de ambas mallas siempre se procederá a la toma de muestras como correspondiente a la malla de 16x16.

Las coníferas que no se encuentren vegetando en buenas condiciones deben ser muy tenidas en cuenta debido a que son las que mayor atracción ejercen sobre el *Monochamus* para que realice su puesta y, a su vez, pueden mostrarnos los primeros estadios de la enfermedad. Debido a esto se realizara un muestreo de estas masas al considerarlas de alto riesgo, independientemente de la zona de Andalucía en la que se localicen.

El arbolado susceptible superviviente a los incendios, debido tanto al daño que el fuego ha producido como a la abundancia de restos que favorece la presencia de *Monochamus*, se incluirá dentro de estas masas debilitadas.

El muestreo, al realizarse sobre arbolado vivo en pie, se llevará a cabo siguiendo el mismo protocolo que en los muestreos sistemáticos.

Para su posterior localización se tomarán las coordenadas de los puntos de muestreo en UTM (European Datum 50 – Huso 30).

### **MASAS CON DECAIMIENTO:**

- Las masas con decaimiento se muestrean ya que son las que más posibilidades tienen de que el *Monochamus* realice la puesta al preferir éste árboles debilitados.
- Este muestreo también permite descartar la acción del nematodo como causante de este decaimiento.
- Este tipo de masas únicamente se muestrearán en el caso de que no hayan sido muestreadas por el muestreo sistemático. Es decir, una masa en la que se observa un decaimiento y en la que hay un punto del muestreo sistemático, no se estima necesario tomar otra muestra adicional.
- Se establece un ratio mínimo de una muestra por cada 400 has de masa decaída, que corresponde a una *malla de 2x2 km*. Se hará al menos una prospección por foco determinado, independientemente de la superficie.
- Es independiente de la zona de riesgo en la que se encuentren las masas.

### **BORDES DE INCENDIOS:**

- Los bordes de incendios, cuando afectan a especies susceptibles, son el lugar preferido por el *Monochamus* para su reproducción y, por tanto, pueden ser puntos de infestación.
- Se ha establecido un muestreo en una franja no superior a 50 metros a ambos lados del borde del incendio manteniendo el ratio de 1 muestra cada 400 has, que corresponde a una *malla de 2x2 km*.
- Se establece que el efecto de riesgo del incendio se mantiene en los dos años posteriores a su suceso, tomando al menos una muestra, y además se establecerán itinerarios con recogida

En el acta de inspección se deberá anotar de cada una de las muestras: el número o código de referencia, fecha de recogida, especie de conífera y su procedencia, punto de toma de muestra, municipio, provincia, los datos del titular de la empresa, coordenadas de la misma, etc., así como cualquier otro dato que se considere de interés.

➤ **Aserraderos e industrias de la madera**

Como medida general de control se establecerá el censo de todos los aserraderos e industrias madereras, para que puedan ser inspeccionadas y sometidas a seguimiento fitosanitario oficial en caso de que reciban madera o cualquier otro material sensible al nematodo de la madera del pino, procedente de Portugal.

Por otro lado, en función de la localización de las empresas y/o instalaciones con respecto a las zonas de riesgo, se han establecido las siguientes intensidades de vigilancia:

En la zona de riesgo alto (20 km desde la frontera con Portugal) y medio (80 km desde el final de la zona de alto riesgo), se llevarán a cabo, al menos, dos inspecciones anuales, tomando como mínimo una muestra en cada inspección. En caso de la existencia de partidas de material procedente de Portugal, se llevará a cabo la inspección de todas ellas, con la consiguiente toma de muestras. También se comprobará la separación física de dichas partidas del resto de material procedente de otros lugares.

En el resto del territorio andaluz, se llevarán a cabo, al menos, una inspección anual, en los aserraderos e industrias de la madera, tomando como mínimo una muestra. En caso de la existencia de partidas de material procedente de Portugal, se llevará a cabo la inspección de todas ellas, con la consiguiente toma de muestras. También se comprobará la separación física de dichas partidas con el resto de material procedente de otros lugares. Por otro lado, en los alrededores (5 km) de las instalaciones, cuando haya masas forestales sensibles, se tomará al menos una muestra anual.

Todo ello conforme a lo establecido en el protocolo de inspección de aserraderos e industrias de la madera.

➤ **Controles del movimiento terrestre de material vegetal procedente de Portugal**

El importante comercio de madera establecido entre Portugal y España constituye un riesgo para la dispersión del nematodo del pino en territorio andaluz, tanto como consecuencia de su transporte como de su localización final en los puntos de manejo y almacenamiento. En este sentido, para establecer un mayor control fitosanitario, y de acuerdo con el *artículo 12.1 de la directiva 2000/29/CE* se solicitará la colaboración de la Guardia Civil para llevar a cabo inspecciones, relacionadas con la circulación de la madera u otro material vegetal sensible procedente de Portugal, en las infraestructuras viales andaluzas.

➤ **Prospecciones en entornos de puntos de riesgo**

Los puntos de riesgo son aquellos en los que el movimiento, tratamiento o transformación de la madera implica a alguna de las especies forestales susceptibles al nematodo. Serán principalmente Industrias relacionadas con la madera, PIFs, etc., y su entorno será muestreado una vez que sea establecido por la Administración Competente dicho punto de riesgo. Para ello serán necesarios los datos de localización de las mismas (coordenadas de los puntos de muestreo en UTM (European Datum 50 – Huso 30).

El protocolo empleado de toma de muestras será el mismo que en los anteriores casos ya que se realiza también sobre árboles en pie.

De forma general en torno al punto definido como de Riesgo, se establecerá un área circular de 5 km de radio y, en el caso de que se encuentre una masa de una especie susceptible en terreno forestal dentro de dicha zona, se deberá prospectar. La Consejería de Medio Ambiente es quien deberá tomar dicha muestra.

La prospección del entorno de estos puntos de riesgo se llevará a cabo siguiendo los criterios siguientes:

- Se muestreará el entorno únicamente si hay especies susceptibles sobre terreno forestal en dicha zona circular.



- El muestreo del entorno del punto de riesgo se realizará según una malla de 2x2 km, es decir, se deberá mantener el ratio de una muestra por cada 400 has de especies susceptibles. (admitiéndose un desplazamiento del punto teórico de hasta 200 metros en cualquier dirección).
- Ante la presencia de varias especies, se tomará siempre sobre la más sensible. Las prospecciones en Portugal sólo han determinado positivos sobre *Pinus pinaster* por lo que se considerará esta especie como especialmente sensible frente a otras.
- Los puntos ya prospectados por pertenecer a algunas de las mallas de muestreo, masas con decaimiento, etc. y que se localizan dentro del entorno del punto de riesgo deben tenerse en cuenta ya que contribuyen a determinar el ratio de una muestra por cada 400 has (se pueden asimilar a algunos de los puntos de la malla de 2x2, reduciendo así el número de muestras a tomar).
- En aquellos entornos en los que la malla de 2x2 no determine ningún punto pero existan especies susceptibles en terrenos forestales, se tomará una muestra en un lugar a criterio del técnico.
- Es independiente de la zona de riesgo en la que se localice el punto o su entorno.

Se considerarán también puntos de riesgo aquellos lugares, independientemente de su localización, en los que las inspecciones detecten la presencia del nematodo. En estos casos el protocolo de trabajo será similar al resto de los puntos de riesgo, únicamente se incrementa el radio del entorno desde los 5 km a los 20 km.

Los Puntos de Inspección de Fronteras son ubicaciones en las que se produce entrada y acumulaciones de madera, en múltiples formas y estados. Sus entornos han de muestrearse de igual forma que en el caso de industrias de la madera.

#### ➤ **Prospección para delimitación**

Si se encuentra *Bursaphelenchus xylophilus*, durante la prospección de detección, deberá incrementarse de modo significativo la intensidad de muestreo para poder delimitar, con la mayor precisión posible, la extensión de la infestación en nuestro territorio.

Las prospecciones se efectuarán dentro de un área inicial delimitada de 20 Km de radio alrededor de cualquier positivo descubierto durante una prospección de detección. Todas las masas susceptibles deberían ser muestreadas, muestren o no síntomas, de acuerdo con el procedimiento señalado anteriormente, según una malla de 2x2 km, tomando muestras sobre masas presenten síntomas o no. Si se obtienen resultados positivos, los bordes del área de prospección delimitada deben desplazarse hacia fuera (manteniendo el radio de 20 km) hasta que no se encuentren más positivos.

Para delimitar el borde definitivamente de una zona afectada por el nematodo, deben ser cortados también árboles sanos (en un radio de 50 m), analizándose la presencia de *Monochamus*, en la copa, y recogiendo muestras. El muestreo de árboles sanos con el propósito de determinar los límites del área infestada es particularmente importante donde se piense que la situación climática pueda ser limitante para la expresión de síntomas de la enfermedad.

Se deberá establecer una zona tampón alrededor del límite exterior de la zona infestada. Deberán llevarse a cabo prospecciones intensivas en esa zona durante la campaña en curso y durante la siguiente para que los límites exteriores de la zona infestada sean determinados exactamente de manera fiable. El tamaño preciso de la zona tampón dependerá de la disponibilidad de huéspedes, clima, presencia de barreras naturales de *Monochamus spp.*, de dispersión, etc. El radio de la zona tampón no será en ningún caso inferior a 20 km.

Todos los brotes detectados deberán ser registrados documentalmente, localizando en un mapa las áreas afectadas con coordenadas precisas de cada brote identificado, con toda la información complementaria necesaria para conocer la situación real en relación al número de árboles infestados, mortalidad y medidas específicas aplicadas, entre otros aspectos.

## 6. PLAN DE CONTINGENCIA

### 6.1. Inicio del Plan de Contingencia

El plan de acción debe estar preparado para iniciarse cuando existe la sospecha o la confirmación de la presencia de un brote. El plan de contingencia se comienza cuando:

- El organismo nocivo es detectado como resultado de una inspección general o de prospecciones específicas o cuando los Organismos oficiales responsables son informados de su presencia por un particular o por la industria.
- El organismo nocivo es detectado por un país importador.

Es importante que el Plan de Contingencia se comience rápidamente y que se actúe de acuerdo a la estructura de responsabilidades establecida por las administraciones públicas.

En las fases iniciales de información sobre un brote debe recogerse del sitio afectado lo siguiente:

- El origen probable del brote. Además se debe consignar los detalles incluyendo, en su caso, otros puntos de destino.
- La localización geográfica y propietario del lugar afectado
- Los hospedantes infestados en el lugar afectado (especies, variedad, fase de desarrollo, etc.)
- Cómo el organismo nocivo fue detectado e identificado (incluyendo fotografías de sintomatología)
- Nivel de presencia del organismo nocivo
- Dispersión e impacto del daño (incluyendo la parte del hospedante afectada)
- Importaciones recientes o movimientos de vegetales o productos vegetales hospedantes en y fuera del lugar afectado
- Movimiento de las personas, productos, equipos y maquinaria, en su caso.
- Historia del organismo nocivo en el sitio, lugar de producción o área afectada

## 6.2. Medidas cautelares a adoptar en caso de sospecha de la presencia del organismo nocivo

Cuando se tenga sospecha de la presencia de *Bursaphelenchus xylophilus*, a través de los exámenes oficiales, de las notificaciones pertinentes, o de cualquier otro medio, deben adoptarse una serie de medidas cautelares orientadas a confirmar o desmentir la presencia de la enfermedad y a evitar su dispersión mientras se define la situación. Estas medidas son las siguientes:

- Confirmación o desmentido de la presencia del organismo nocivo en el brote bajo sospecha de contaminación.
- Hasta tanto no se haya confirmado ni desmentido la presencia del organismo nocivo, se procederá a la inmovilización cautelar de los vegetales o productos vegetales de los cuales se hayan tomado las muestras, excepto bajo control oficial; siempre que se compruebe que no existe ningún riesgo identificable de dispersión de los organismos.
- Determinación de la fuente/s primaria/s de la sospecha de contaminación
- Establecimiento de medidas complementarias adecuadas basadas en el nivel de riesgo estimado, para evitar cualquier dispersión potencial del organismo.
- Si existe riesgo de contaminación de material vegetal que proceda o se dirija a otra Comunidad Autónoma o Estado Miembro, la Comunidad Autónoma en la que se produzca la sospecha de contaminación, se informará inmediatamente al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, para que éste a su vez informe a las Comunidades Autónomas o Estados miembros afectados.

Para la consecución de estos objetivos, los representantes de los Servicios de Sanidad Vegetal/Forestal competentes en cada caso deben realizar una inspección en la zona afectada o industria origen de la sospecha, con el fin de llevar a cabo las siguientes acciones:

- Obtener tanta información como sea posible, incluyendo el historial de los vegetales o productos vegetales, así como los detalles de cualquier movimiento del material vegetal en la zona o industria afectada.
- Localizar los potenciales huéspedes cercanos

- Realizar un muestreo completo de todas las existencias de madera en la industria implicada, en su caso, y si se considera oportuno, de vegetales hospedantes en las proximidades. Las muestras que sean recogidas durante los muestreos indicados, con el fin de confirmar o desmentir la presencia del organismo nocivo.

Con posterioridad a la inspección llevada a cabo a la zona o industria origen de la sospecha de contaminación, debe concertarse una reunión de seguimiento para:

1. Recomendar la ejecución de procedimientos de control
2. Recomendar los recursos requeridos
3. Asignar las siguientes responsabilidades:
  - Determinación de medidas que garanticen la eliminación del material contaminado en lugares y condiciones adecuadas
  - Localización en planos de las zonas próximas sensibles
  - Obtención de un listado de industrias que hayan tenido relación con el material bajo sospecha
  - Obtención de cualquier otra información que pueda ayudar a establecer la trazabilidad del material bajo sospecha
4. Informar a la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera y al Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino.

### **6.3. Medidas a adoptar en caso de confirmación de la presencia de un organismo nocivo**

Si la presencia del nematodo de la madera del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*), en una muestra tomada en cumplimiento de la legislación vigente, fuera confirmada mediante análisis de laboratorios oficiales o bajo supervisión oficial, la Comunidad Andaluza adoptará las siguientes medidas previstas en el anexo de la Decisión 2006/133/CE con el fin de evitar la propagación del organismo nocivo y conseguir su erradicación:

- Demarcación de zonas afectadas
- Investigación para determinar la extensión y fuente del origen del brote, y evaluar el riesgo de dispersión.

- Determinación del rastro y medidas en referencia al material relacionado con el material afectado, en su caso.
- Métodos de eliminación de vegetales o productos vegetales contaminados.
- Desinfección y/o limpieza de las instalaciones de almacenamiento.
- Medidas de erradicación para el período especificado que sigue a un brote en la zona demarcada, así como cualquier otra restricción relacionada con el material sensible, las medidas de control adicionales en el movimiento y prospecciones adicionales contempladas en la legislación vigente.

En el caso de que se requiera continuar con la aplicación de medidas legales en el área demarcada por un período prolongado, se llevará a cabo una revisión de las medidas de erradicación y control para determinar el éxito y el coste-efectividad de dichas medidas a largo plazo. Esta revisión implicará la consulta a los grupos de interés e incluirá:

- Evaluación de la efectividad de medidas actuales
- Evaluación del impacto económico y del coste-efectividad de continuar las medidas existentes
- Consideración de medidas adicionales para fortalecer las acciones de erradicación
- Consideración de obligaciones legales e impacto en los procedimientos de importación y exportación
- Consideración de propuestas alternativas, incluyendo las medidas de seguimiento tanto como para controlar el organismo nocivo como para erradicarlo o incluso el cese de las medidas legales

#### **6.4. Erradicación del organismo nocivo**

El organismo nocivo se considerará erradicado de una zona demarcada si las prospecciones de seguimiento, durante los dos años posteriores a la aparición del último brote, proporcionan resultados negativos de la presencia del nematodo de la madera del pino. En este caso, se puede considerar reestablecida la normalidad fitosanitaria y se dará de baja la zona demarcada.

En cualquier caso, se llevarán a cabo actividades inspectoras de supervisión que confirmen que no hay más incidencias del organismo nocivo.

### **6.5. Consulta a los grupos de interés**

La comunidad andaluza determinará el grado de implicación de los grupos de interés en la preparación de su Plan de Contingencia. En particular, la implicación del sector debe tener como objetivo promover el conocimiento de las amenazas de la plaga, la vigilancia conjunta con buenas garantías y prácticas fitosanitarias. Con dicha implicación también se ayuda a asegurar que dichos grupos se encuentran comprometidos y son totalmente conscientes de lo que sucederá si aparece un brote.

El plan de contingencia de la comunidad andaluza recogerá los grupos de interés a los que se avisará en caso de su inicio. Una vez que el brote haya tenido lugar dichos grupos pueden ser invitados a una reunión para informarles de las medidas adoptadas y de cualquier otra implicación relacionada con el brote y mantenerlos informados de su desarrollo.

A través de un Grupo Asesor, el Equipo de Dirección de Emergencia puede actuar en concordancia con los grupos de interés en el progreso del programa de erradicación, así como para recoger su información y/o puntos de vista. El Grupo Asesor también facilitará la consulta eficaz con los grupos de interés en casos dónde la prolongación de las medidas sea necesaria.

### **6.6. Comunicación interna y documentación**

El portavoz designado por el Equipo de Dirección de Emergencia debe asegurar la eficacia de la comunicación entre los Organismos oficiales, desde el inicio del plan de contingencia hasta que el plan de erradicación sea oficialmente confirmado. Dicho portavoz también debe informar a las personas pertinentes al nivel de responsabilidad político y estratégico sobre el brote, la naturaleza del brote, los resultados de la investigación y la extensión del brote, la valoración y el coste de la erradicación, el impacto en la industria y medio ambiente y los resultados del programa de erradicación.

## **6.7. Comunicación externa**

Para aumentar el conocimiento entre los grupos de interés con el objetivo de prevenir la entrada o dispersión de la plaga, la comunidad andaluza establecerá un plan de publicidad que cubrirá aspectos tales como la biología de la plaga o cómo minimizar el riesgo de introducción. Se podrá utilizar cualquier medio de publicidad que se estime oportuno (como las hojas impresas, carteles, información en la página Web) y podrá ponerse a disposición de los grupos de interés.

Además, en caso de la existencia de un brote será necesario establecer otro plan de publicidad para resaltar las medidas que están siendo tomadas y las maneras de prevenir la dispersión posterior de la plaga. Los posibles medios de comunicación pueden incluir notas de prensa, notificaciones oficiales, información en la página Web, etc.

El portavoz designado por el Equipo de Dirección de Emergencia será el responsable para la comunicación externa, incluida la comunicación con la prensa. Dicho portavoz será el responsable para hacer declaraciones oficiales y notas de prensa, contactos con los medios de comunicación, notificando e informando al sector, comunicando con los agentes externos interesados y notificaciones oficiales.

Por otro lado, los planes de publicidad se ajustarán a las disposiciones vigentes en materia de política de confidencialidad.

## **6.8. Pruebas y formación del personal**

Los organismos oficiales competentes en materia de sanidad vegetal/forestal promoverán la realización de cursos de formación del personal para garantizar una actuación armonizada en el conjunto del territorio Andaluz.

## **6.9. Evaluación y revisión del plan de contingencia**

El presente Plan de Contingencia será evaluado, revisado y actualizado siempre que sea necesario para su adaptación a la normativa vigente y a la evolución del riesgo en el territorio Andaluz.



### **6.10. Medidas en caso de incumplimiento**

En caso de que se incumplan los requisitos establecidos en la Decisión 2006/133/CE de la Comisión de 13 de febrero de 2006 y sus modificaciones posteriores, o las medidas de erradicación adoptadas en las disposiciones oficiales de acuerdo con el apartado 6 del artículo 7 del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, dichos incumplimientos constituirán infracciones contempladas en régimen sancionador de la Ley 43/2002, de sanidad vegetal.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y ENLACES DE INFORMACIÓN

En este apartado se recogen algunas fuentes bibliográficas y enlaces Web de interés para consultar información relativa al nematodo de la madera del pino, y que debe servir de complemento a las fuentes recogidas en los planes de contingencia de las comunidades autónomas.

- Abad, P., Tares, S., Bruguier, N., De Guiran, G. 1991. Characterization of the relationships in the pinewood nematode species complex (PWNSC) (*Bursaphelenchus* spp.) using a heterologous unc-22 DNA probe from *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology*, 102, 303-308.
- Braasch, H., Metge, K., Burgermeister, W. 1999 *Bursaphelenchus*-Arten (Nematoda, Parasitaphelenchidae) in Nadelgehölzen in Deutschland un ihre ITS-RFLP-Muster. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.*, 51, 312-320
- Cram, M., Hanson, J. 2004. How to identify and manage pine wilt disease and treat wood products infested by the pine wood nematode. USDA, NA-FR-01-04, 20 pp.
- EPPO/CABI 1996. Quarantine Pest for Europe, 2nd edn. CAB International, Wallingford (GB) 10 pp.
- EPPO Standars 2000. Diagnostic protocols for regulated pests *Bursaphelenchus xylophilus*. 10 pp.
- 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*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 26, 199-249.
- FAO (1998): Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias, Directriz para prospección. NIMF Pub. No 6. IPPC Secretaria, FAO: 12pp.
- FAO (1999): Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias, Determinación de Status de Plaga en un Área.. NIMF Pub. No 8. IPPC Secretaria, FAO: 18pp.
- Ikeda, T., Enda, N., Yamane, A., Oda, K., Toyoda, T. 1980. Attractants for the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl. Ent. Zool.* 12, 239-302.
- Kishi, Y. 1980. Mortality of pine trees by *Bursaphelenchus lignicolus* M. & K from *Monochamus alternatus* (Japanese). *J. Jpn. For. Soc.* 60, 179-182.
- Kiyohara, T, Tokushige, Y. 1971. Inoculation experiments of a nematode, *Bursaphelenchus* sp., onto pine trees (Japanese with English summary). *J. Jpn. For. Soc.* 53, 210-218.
- Linit, M.J., Kondo, E., Smith, M.T. 1983. Insects associated with the pinewood nematode. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematodo: Aphelenchoididae) in Missouri. *Environmental Entomolog* 12, 467-470.
- Mamiya, Y. 1983. Pathology of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual Review of Phytopathology* 21, 201-220
- Mamiya, Y. 1988. History of pine wilt disease in Japan. *Journal of Nematology* 20, 219-226
- Mamiya, Y., Kiyohara, T 1972. Description of *Bursaphelenchus lignicolus* n. sp. (Nematoda, Aphelenchoidea) from pine wood and histopathology of nematodes infested trees. *Nematologica* 18, 120-124.

- Mamiya, Y., Kobayashi, T., Zinno, Y., Enda, N., Sasaki, K. 1973. Disease development of pine trees naturally infected with *Bursaphelenchus lignicolus* (japanese). Trans. 84th Mtg. Jpn. For. Soc. 332-334.
- Mota, M.M., Braasch, H., Burgermeister, W., Medge, K., Bravo, M.A., Penas, A.C, Sousa, E. 1999. First record of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1, 727-734
- Nickle, W.R., Golden, A.M., Mamiya, Y., Wergin, W.P. 1981 On the taxonomy and morphology of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934) Nickle, 1970. *Journal of Nematology* 13, 385-392
- Ryss, A.; Viera, P.; Mota, M.; Kulinich, O. (2005): A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology* 7 (3): 393-458.
- Schönfeld, U. (2006): Untersuchung von *Pinus silvestris*-Fangbäumen auf schlüpfende Käfer und holzbesiedelnde Nematoden der Gattung *Bursaphelenchus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 58 (5): 122-126.
- Sousa, E.; Bravo, M. A.; Pires, J.; Naves, P.; Penas, A.C.; Bonifácio, L.; Mota, M.M. (2001): *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology* 3 (1): 89-91.
- Tares S, Lemontey JM, Guiran G de, Abad P 1994 Use of species-specific satellite DNA from *Bursaphelenchus xylophilus* as a diagnostic probe. *Phytopathology* 84, 294-298
- Tokushige, Y., Kiyohara, T. 1969 *Bursaphelenchus* sp. In the wood of dead pine trees (Japanese). *J. Jpn. For. Soc.* 51, 193-195.
- Wingfield, M.J. ed. 1987. Pathogenicity of the pine wood nematode. APS Press, St Paul, MN: 122 pp.

## ENLACES WEB:

- <http://www.marm.es>
- <http://www.eppo.org>
- <http://na.fs.fed.us/pubs/>
- [www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/howtos/ht\\_pinewilt/pinewilt.htm](http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/howtos/ht_pinewilt/pinewilt.htm)
- <http://www.state.gov/g/oes/ocns/inv/cs/2314.htm>