



. Nematologia .
da floresta ao eppendorf

Nemátode da Madeira do Pinheiro (NMP) *Bursaphelenchus xylophilus*



Organismo de quarentena A2

(presente na Europa, localização restrita – Portugal e Espanha)

Nemátode da Madeira do Pinheiro (NMP)

Bursaphelenchus xylophilus



O género *Bursaphelenchus* inclui ≈ 120 espécies, das quais apenas *B. xylophilus* (em coníferas) e *B. cocophilus* (em coqueiro) são fitoparasitas; as restantes são sobretudo micetófagas e não parasitas.

Nemátode da Madeira do Pinheiro (NMP) *Bursaphelenchus xylophilus*



Nemátode – insecto vector



Colheita de amostras na floresta



Colheita de amostras na floresta



Entomologia, INIAV

Entrada oficial de amostras:



FICHA DE REGISTO PARA ANÁLISE FITOSSANITÁRIA

O formulário deve ser convenientemente preenchido e enviado em formato Word para o e-mail: consultas_safsv@iniao.pt
As amostras deverão ser dirigidas para: INIAV • Edifício Florestal, ao c/ Consultas SAFSV • Av. da República, Qta do Marquês, 2780-159 Oeiras

IDENTIFICAÇÃO DO REQUERENTE

Responsável pelo envio / entrega da amostra	Refª da amostra	Data de envio
Endereço para facturação		Tel./Telex
		NIF/NIPC
		E-mail
Endereço para resposta		Tel./Telex
		E-mail

ESPECIALIDADE(S) A QUE E DIRIGIDA A AMOSTRA PARA ANÁLISE

- Acarologia Bacteriologia Entomologia Herbologia Micologia Nematologia Virologia
 Sementes

NATUREZA E ORIGEM DA AMOSTRA

Planta inteira Partes da planta: _____ Idade da planta / cultura: _____

Nome comum ou espécie _____ Variedade _____ Origem do material de propagação _____
Sobreiro _____

Ácaros Insectos Solo Substrato Água Outro: _____

Local de colheita da amostra _____ Freguesia _____ Concelho _____ Data de colheita _____

INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Distribuição do problema fitossanitário na cultura: total na bordadura em mancha na linha ao acaso


Plantas afetadas (%) _____ Ocorrência de condições adversas: _____

Breve descrição dos sintomas ou objetivo da análise:

Pesticidas aplicados recentemente:

Entrada oficial de amostras:



 Instituto Nacional de
Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

FICHA DE REGISTO PARA ANÁLISE FITOSSANITÁRIA

O formulário deve ser convenientemente preenchido e enviado em formato Word para o e-mail: consultas.safsv@iniaov.pt
As amostras deverão ser dirigidas para: INIAV • Edifício Florestal, ao c/ Consultas SAFSV • Av. da República, Qta do Marquês,
2780-159 Oeiras

IDENTIFICAÇÃO DO REQUERENTE

Responsável pelo envio / entrega da amostra	Refª da amostra	Data de envio

Endereço para facturação

	Tel/Tel/m	NIF/NIPC
	E-mail	

Endereço para resposta

	Tel/Tel/m	
	E-mail	

ESPECIALIDADE(S) A QUE E DIRIGIDA A AMOSTRA PARA ANÁLISE

Acarologia Bacteriologia Entomologia Herbologia Micologia Nematologia Virologia
 Sementes

As amostras têm de ser remetidas rapidamente ao laboratório e não podem ficar na bagageira a apanhar muito calor: este transporte é da **total responsabilidade** do cliente ou do técnico que colheu as amostras

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.
Unidade Estrutural de Investigação e Serviços de Sistemas Agrários e Florestais e Sanidade Vegetal
Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-159 Oeiras - Portugal
Tel (+351) 21 446 37 60 E-mail: consultas.safsv@iniaov.pt

Extracção de nemátodes

Protocolos de diagnóstico OEPP

Bulletin OEPP/EPP0 Bulletin (2013) 43 (1), 105-118

ISSN 0250-8052. DOI: 10.1111/epp.12024

European and Mediterranean Plant Protection Organization
Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes

PM 7/4 (3)

Diagnostics Diagnostic

PM 7/4 (3) *Bursaphelenchus xylophilus*

Specific scope

This standard describes a diagnostic protocol for *Bursaphelenchus xylophilus*¹.

Specific approval and amendment

First approved in 2000-09. Revised on 2009-09.
Second revision approved on 2012-09

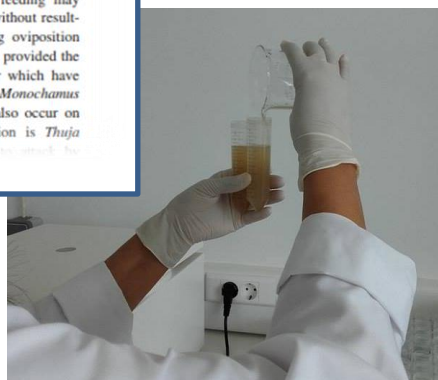
Introduction

Bursaphelenchus xylophilus, the pine wood nematode, is an EPPO A2 pest. The nematode is native to North America [Canada, US, Mexico (unconfirmed)] and is thought to have been carried to Japan at the beginning of the 20th century on timber exports. In Japan, the nematode has been causing massive mortality of native pine trees (*Pinus densiflora*, *P. thunbergii*, *P. luchuensis*), where it is the most damaging forest pest. It has also spread to China, Korea, Portugal and Taiwan. More recently, it has also killed pines in the USA, but only exotic species including *P. sylvestris*, in the warmer southern areas of the country. Regardless of the limited occurrence of pine wilt disease in North America, *B. xylophilus* as such is widely dispersed in native conifer stands. In 1999, *B. xylophilus* was detected on *P. pinaster* in continental

(maturation feeding by either sex), or, depending on *Monochamus* species, to the trunks or larger branches, including wood waste or debris, weakened trees or trees that recently died, during oviposition by the females. Transmission of *B. xylophilus* to the live trees during feeding by the adult beetles can result in the development of wilt disease in the tree, but only in susceptible species of *Pinus* under suitable climatic and edaphic conditions. Nevertheless, transmission of *B. xylophilus* by maturation feeding may occur also to *Pinus* and other tree genera but without resulting in wilt development. Transmission during oviposition can occur on most if not all coniferous species, provided the trees are weakened, dying from any cause or which have recently died, thus making them suitable for *Monochamus* oviposition. Transmission at oviposition can also occur on timber and cutting waste. A known exception is *Thuja*



<https://www.eppo.int/>



Extracção de nemátodes

Protocolos de diagnóstico OEPP

Bulletin OEPP/EPP Bulletin (2013) 43 (1), 105-118

ISSN 0250-8052. DOI: 10.1111/epp.12024

European and Mediterranean Plant Protection Organization
Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes

PM 7/4 (3)

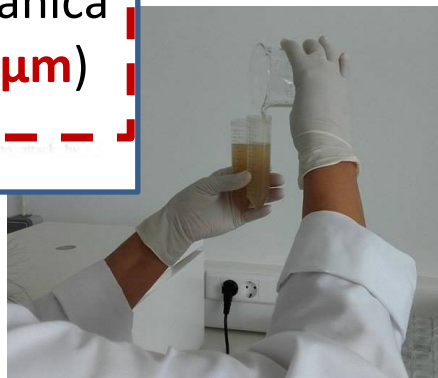
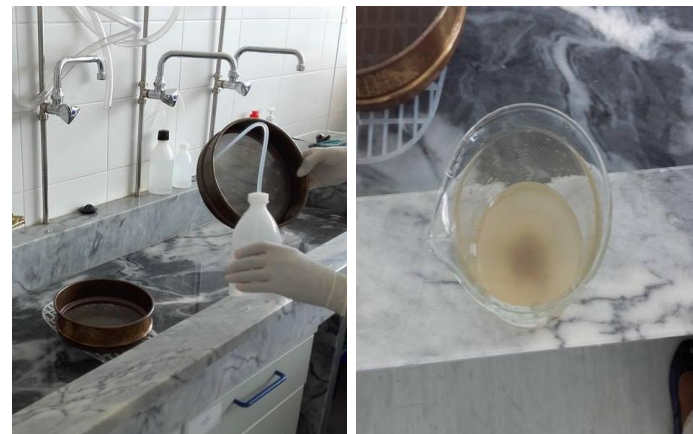
Diagnostics
Diagnostic

PM 7/4 (3) *Bursaphelenchus xylophilus*

Os nemátodes são organismos aquáticos e separam-se dos tecidos vegetais (serrim) e dos insectos através de imersão em água (**48 hrs**) e posterior separação mecânica (crivagem com crivo de malha **38µm**)



<https://www.eppo.int/>





Montagem de amostras de madeira



Montagem de amostras de madeira (método do tabuleiro)



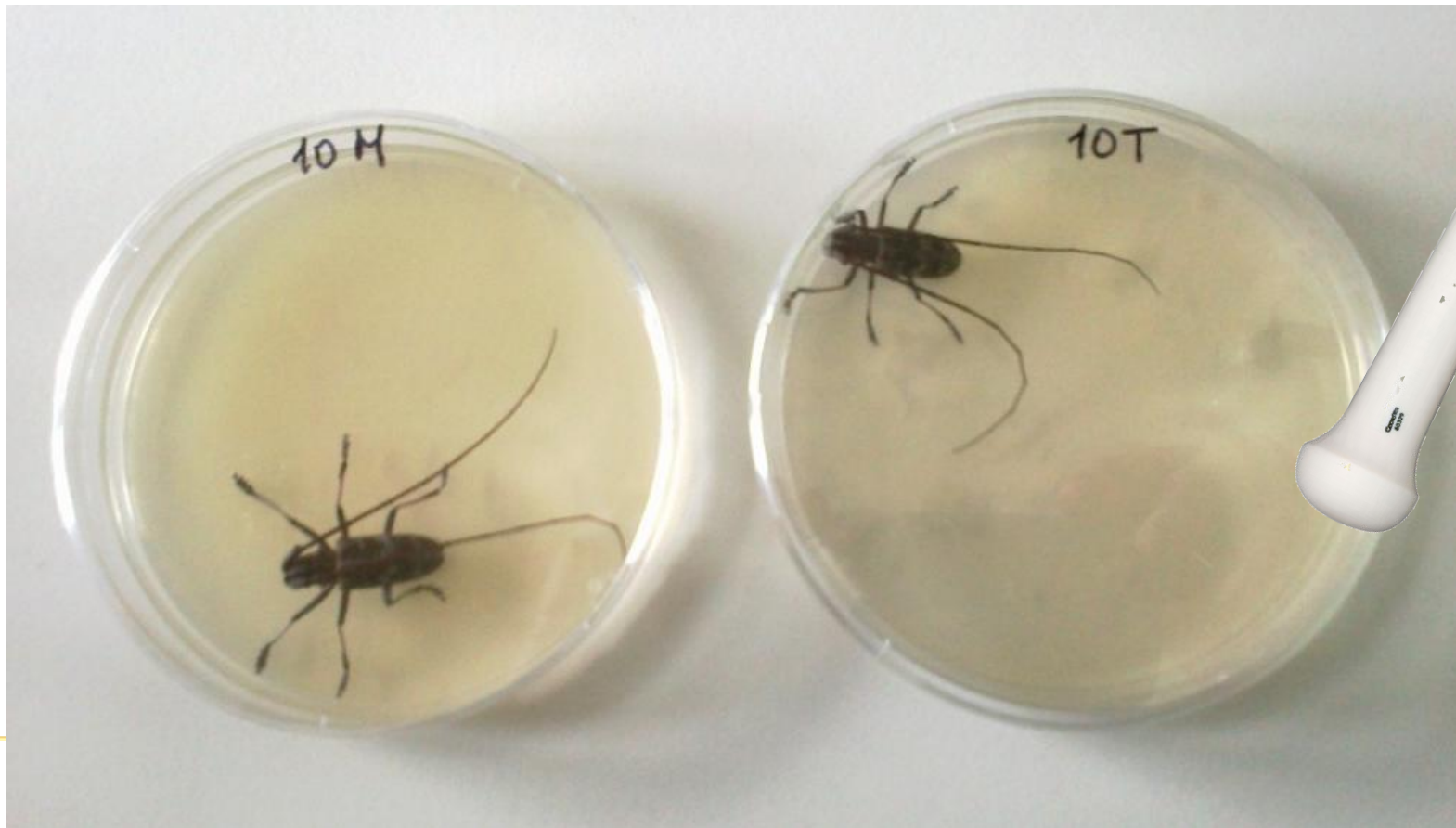
Montagem de amostras de madeira (método do tabuleiro)

48 hrs de imersão



Amostras de madeira em extracção

Extracção a partir do insecto vector





Extracção de nemátodes das amostras



Extracção de nemátodes a partir da madeira



Extracção de nemátodes (crivo de 38 μm)



Extracção de nemátodes



Extracção de nemátodes



Suspensão de nemátodes



Bancada de observação (lupas e microscópio)



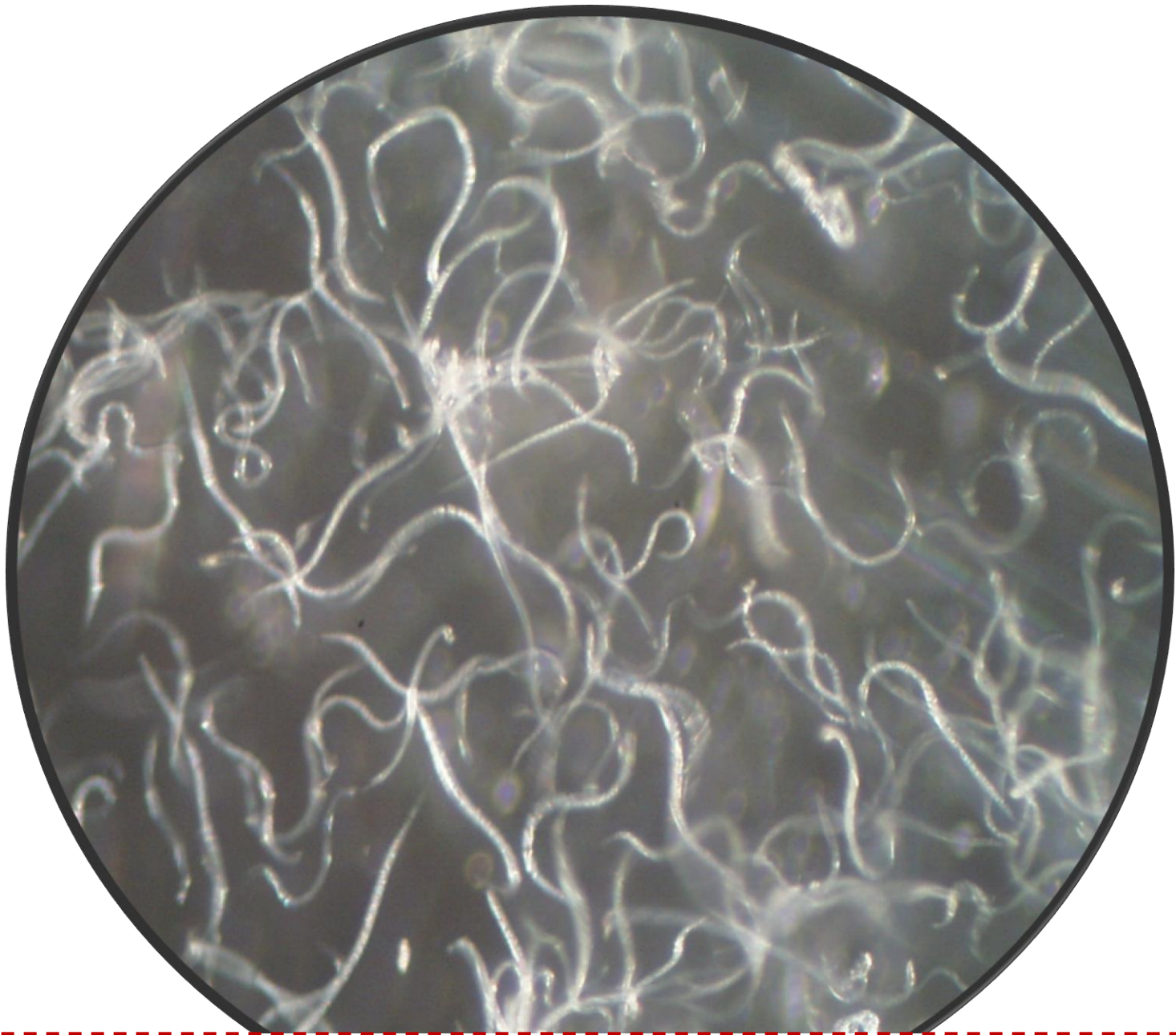
Lupa binocular
(luz transmitida)



microscópio

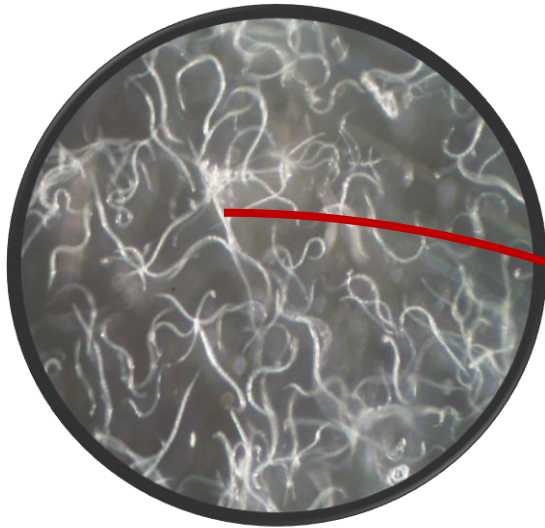


Observação de nemátodes à lupa

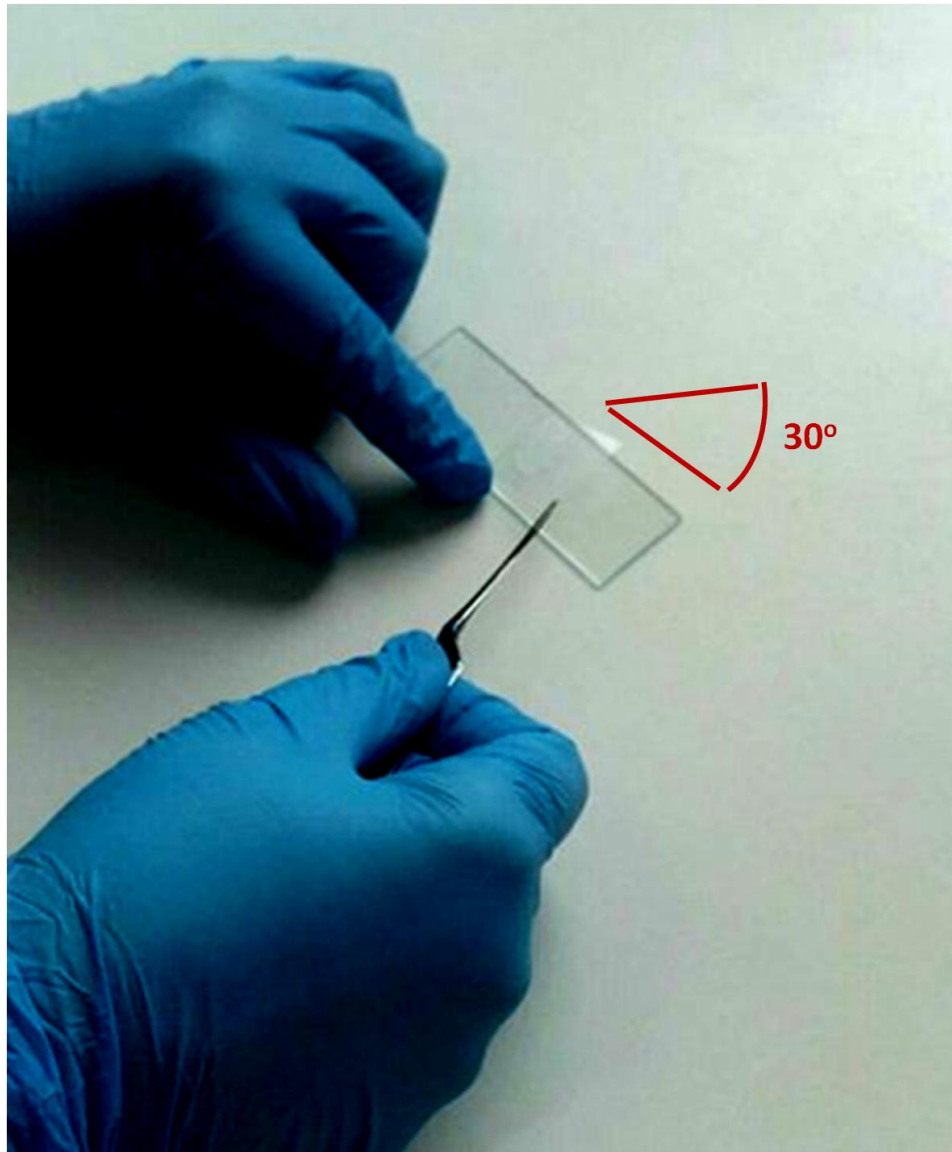


Suspensão de nemátodes vista à lupa

Pesca de nemátode com pestana



Preparação entre lâmina e lamela

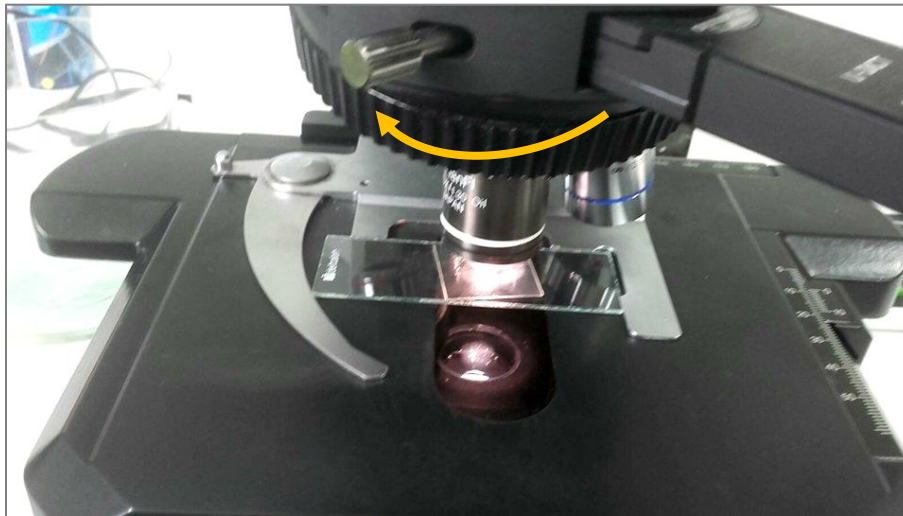


Preparação entre lâmina e lamela

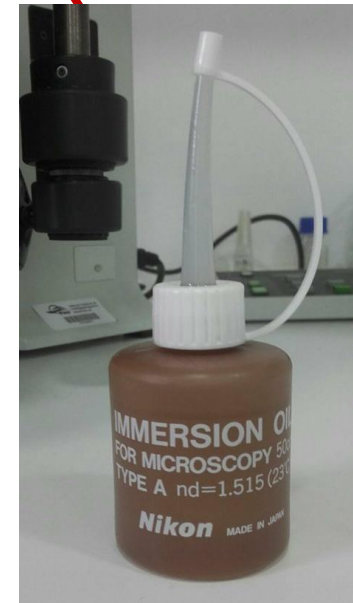


Observação de nemátodes ao microscópio

Oculares 10 x

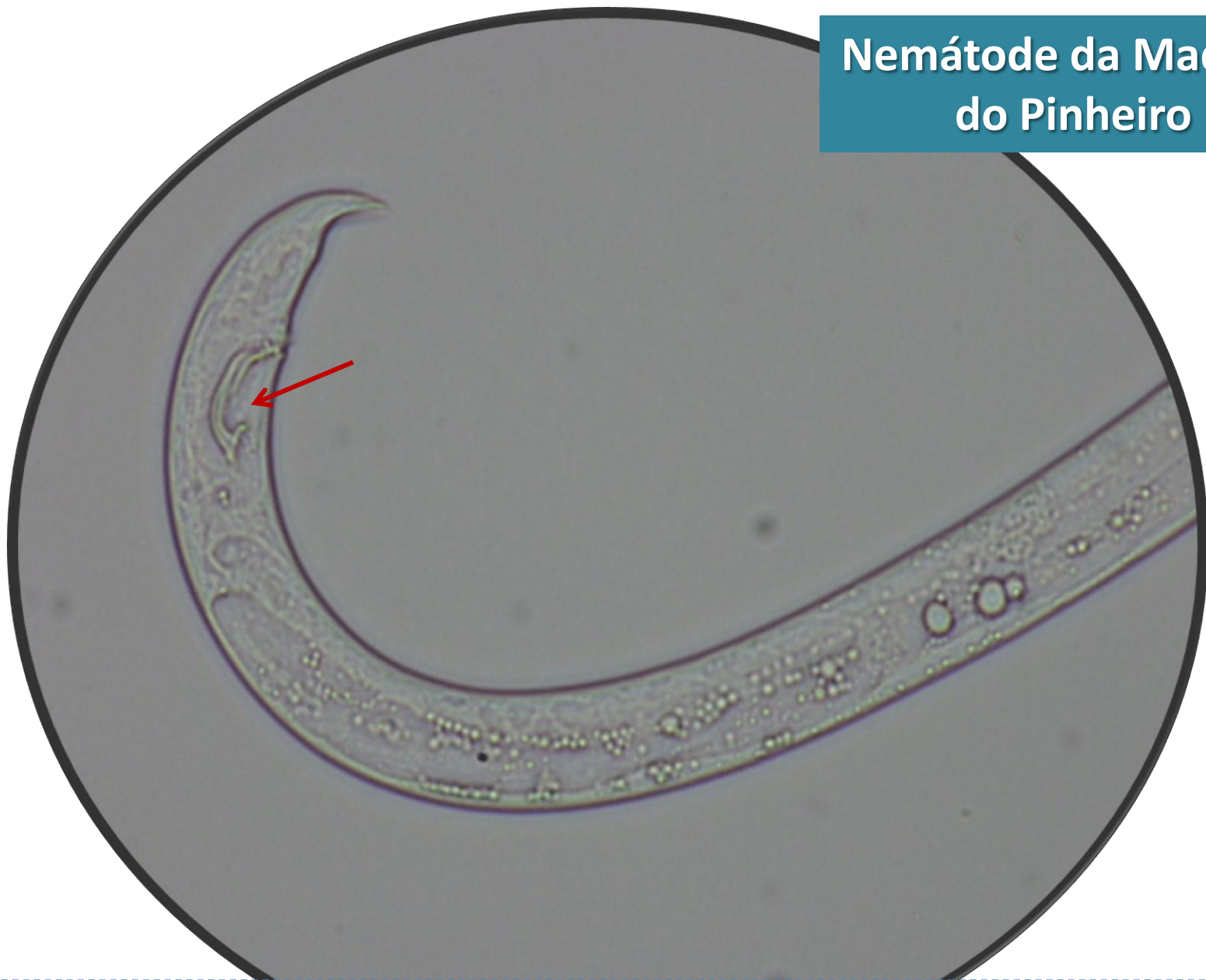


Obj x5



Obj x100

Nemátode da Madeira do Pinheiro



cauda do macho e espícula (orgão sexual →)

Nemátode da Madeira do Pinheiro



Nemátode em muda

Nemátode da Madeira do Pinheiro (NMP) *Bursaphelenchus xylophilus*

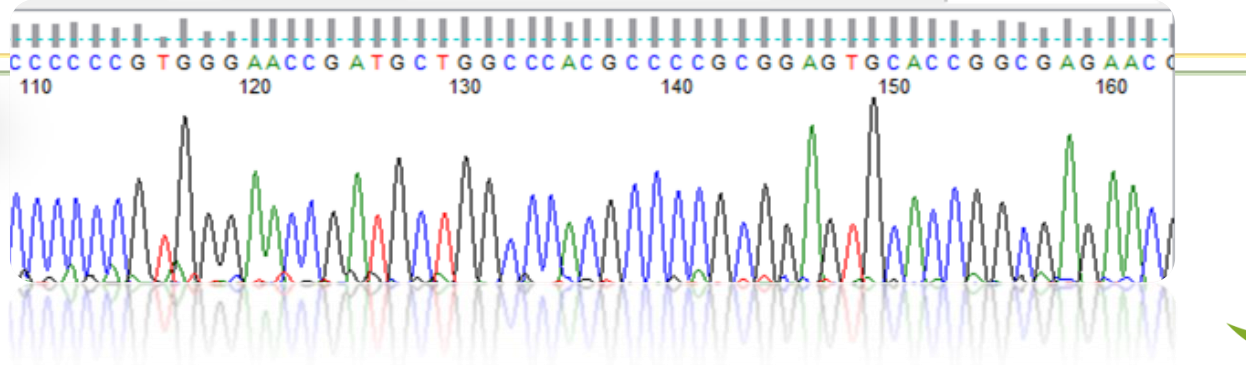


É avaliada a posição que os nemátodes assumem quando morrem “gentilmente” pelo calor e as diferentes características morfológicas de fêmeas e de machos:
(→) A – cabeça; B, C – fêmea (B - vulva, C - cauda) ; D – macho (espícula) [barra= 10 µm].

Confirmação por biologia molecular



Em caso de qualquer dúvida ou na ausência de machos e/ou fêmeas, os nemátodes seguem para biologia molecular: **em tubo eppendorf** 😊



Gestão de resíduos



Lavagem material



Visite-nos em:

<http://www.iniaiv.pt/menu-de-topo/quem-somos/unidades-de-investigacao-e-servicos/sistemas-agrarios-e-florestais-e-sanidade-vegetal/laboratorio-de-nematologia>



lurdes.inacio@iniaiv.pt / Tm 916626641

