



RESOLUCIÓN de 2 de diciembre de 2020, de la Secretaría General, por la que se da publicidad al Convenio de Colaboración entre Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio de la Junta de Extremadura y la Universidad de Extremadura (Centro Universitario de Plasencia, Ingeniería Forestal y del Medio Ambiente) para el desarrollo de protocolos que permitan la diagnosis molecular rápida de especies de insectos perforadores de la madera de quercíneas. (2020062734)

Habiéndose firmado el día 19 de noviembre de 2020, el Convenio de Colaboración entre Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio de la Junta de Extremadura y la Universidad de Extremadura (Centro Universitario de Plasencia, Ingeniería Forestal y del Medio Ambiente) para el desarrollo de protocolos que permitan la diagnosis molecular rápida de especies de insectos perforadores de la madera de quercíneas, de conformidad con lo previsto en el artículo 8.º del Decreto 217/2013, de 19 de noviembre, por el que se regula el Registro General de Convenios de la Administración de la Comunidad Autónoma de Extremadura,

RESUELVO :

La publicación en el Diario Oficial de Extremadura del convenio que figura como anexo de la presente resolución.

Mérida, 2 de diciembre de 2020.

La Secretaria General,
PD, La Jefa de Servicio de Legislación
y Documentación
(Resolución de 24/07/2020,
DOE n.º 147, de 30 de julio),
M.ª MERCEDES ARGUETA MILLÁN

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE CONSEJERÍA DE
AGRICULTURA, DESARROLLO RURAL, POBLACIÓN Y
TERRITORIO DE LA JUNTA DE EXTREMADURA Y LA
UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (CENTRO
UNIVERSITARIO DE PLASENCIA, INGENIERÍA FORESTAL
Y DEL MEDIO AMBIENTE) PARA EL DESARROLLO DE
PROTOCOLOS QUE PERMITAN LA DIAGNOSIS
MOLECULAR RÁPIDA DE ESPECIES DE INSECTOS
PERFORADORES DE LA MADERA DE QUERCÍNIAS

Mérida, a 19 de noviembre de 2020.

REUNIDOS

De una parte, María Curiel Muñoz, Secretaria General de la Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio, nombrada por Decreto 71/2019, de 16 de julio (DOE n.º 137, de 21 de julio de 2019) que interviene en nombre y representación de la Junta de Extremadura, en virtud de la delegación de firma otorgada por Resolución de 23 de julio de 2019, de la Consejera, por la que se delegan determinadas competencias, así como la firma de resoluciones y actos en los órganos administrativos de la Consejería (DOE n.º 144 de 26 de julio de 2019).

De otra parte, Antonio Hidalgo García, Rector Magnífico de la Universidad de Extremadura, en representación de la misma, nombrado por Decreto 2/2019, de 8 de enero por el que se nombra Rector Magnífico de la Universidad de Extremadura (DOE n.º 6, de 10 de enero de 2019), que interviene en nombre y representación de la Universidad de Extremadura en virtud de la Resolución del Rector n.º 44/2019 de fecha 22 de enero de 2019 de lo dispuesto en el artículo 91 de los Estatutos de la Universidad de Extremadura, aprobados por Decreto

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

65/2003, de 8 de Mayo, modificado por Decreto 190/2010, de 1 de octubre, previa aprobación del Convenio, por Consejo de Gobierno de la Universidad, en su sesión del 27 de julio de 2020, a tenor del artículo 87.2 apartado j), de los citados estatutos.

Ambos en representación de las instituciones a las que pertenecen y en uso de las facultades que por sus cargos tienen conferidas, reconociéndose mutuamente con capacidad y competencia suficiente para intervenir en la representación que ostentan y, al efecto,

MANIFIESTAN

Primero. La Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio tiene asumidas las competencias en materia de prevención, erradicación, contención y medios de defensa frente a plagas vegetales en entornos agrícolas, forestales y en el medio natural, a través de la Dirección General de Agricultura y Ganadería, que le atribuye el Decreto 164/2019, de 29 de octubre, por el que se establece la estructura orgánica de la Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio y se modifica el Decreto 87/2019, de 2 de agosto, por el que se establece la estructura orgánica básica de la administración de la Comunidad Autónoma de Extremadura.

Segundo. La Dirección General de Agricultura y Ganadería concurrió a la segunda convocatoria para la presentación de proyectos del programa INTERREG V-A España – Portugal (POCTEP) 2014-2020 junto con la Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte y la Universidade de Tras-Os-Montes e Alto Douro, siendo esta última entidad el beneficiario principal.

El Comité de Gestión de dicho programa, mediante decisión de 28/03/2019 aprobó el proyecto del que forma parte la Dirección General de Agricultura y Ganadería denominado "Sistema integrado transregional de apoyo al control de plagas y enfermedades en la agricultura: SIAPD", con código 0655_SIAPD_6_P

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

El citado proyecto incluye la caracterización específica de cerambícidos mediante barcoding (gen COI) como herramienta diagnóstica de larvas y sus restos de serrín ("frass") empleando para ello elementos de diagnóstico molecular.

El Servicio de Sanidad Vegetal, como servicio gestor perteneciente a la Dirección General de Agricultura y Ganadería, carece de los medios y personal adecuados para el desarrollo de las técnicas citadas, por lo que en el proyecto SIAPD, aprobado dentro del programa INTERREG VA (POCTEP), se incluían fondos destinados a "Expertos y Servicios Externos" para el desarrollo de los modelos de técnicas moleculares para el barcoding del DNA de los cerambícidos.

Tercero. La Universidad de Extremadura, mediante el artículo 87 Decreto 65/2003, de 8 de mayo, modificado por Decreto 190/2010, de 1 de octubre, previa aprobación del Convenio, por Consejo de Gobierno de la Universidad, en su sesión del día 21 de diciembre de 2011, regula las funciones del Consejo de Gobierno de la Universidad, estableciendo como funciones de esta aprobar, a propuesta del Rectorado, el establecimiento de convenios con entes Públicos y privados.

La Universidad de Extremadura es un organismo público de carácter multisectorial y pluridisciplinario que desarrolla actividades de docencia, investigación y desarrollo científico y tecnológico, contemplando entre sus fines el desarrollo social, económico y cultural, de acuerdo con lo dispuesto en la Ley Orgánica 6/2001, de 21 de diciembre, de Universidades, para lo cual resulta necesaria la colaboración con otras instituciones.

El Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal, en el Centro Universitario de Plasencia, y concretamente el laboratorio de genética del Grado de Ingeniería Forestal y del Medio Natural de la UEx, tiene experiencia en el desarrollo de las técnicas objeto de este convenio y ha trabajado con las especies incluidas en el estudio.

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

Cuarto. De acuerdo con lo expuesto, ambas partes están interesadas en colaborar en la realización de un proyecto para desarrollar protocolos que permitan la diagnosis molecular rápida de especies de insectos perforadores de la madera de quercinias.

Quinto. Los datos obtenidos a través del Convenio facilitarán al Servicio de Sanidad Vegetal de la Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio, el ejercicio de sus competencias, al disponer de una herramienta que permita conocer tanto la distribución de las diferentes especies como la adecuada identificación de las mismas, pues mientras que unas se comportan como plaga, otras están protegidas a nivel europeo.

Al finalizar el trabajo se habrá obtenido una colección de códigos de barras de ADN que se serán subidos a la base de datos internacional Barcoding of Life Datasystems.

En consecuencia, ambas partes acuerdan formalizar el siguiente Convenio de colaboración, de acuerdo con el artículo 49 de la Ley 1/2002, de 28 de febrero, del Gobierno y de la Administración de la Comunidad Autónoma de Extremadura, con arreglo a las siguientes,

ESTIPULACIONES***Primera. Objeto y ámbito de aplicación.***

El objeto de este Convenio es establecer un marco de colaboración entre la Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio a través de la Dirección General Agricultura y Ganadería y el Centro Universitario de Plasencia, Universidad de Extremadura, a través del Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal, para el desarrollo de protocolos que permitan la diagnosis molecular rápida de especies de insectos perforadores de la madera de las quercíneas.

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio**Segunda. Naturaleza.**

El presente Convenio tiene naturaleza administrativa y se encuentra entre los supuestos expresamente excluidos del ámbito de aplicación de la Ley 9/2017, de 8 de noviembre, de Contratos del Sector Público, por la que se transponen al ordenamiento jurídico español las Directivas del Parlamento Europeo y del Consejo 2014/23/UE y 2014/24/UE, de 26 de febrero de 2014.

Tercera. Compromisos.

Las dos partes aportarán los medios materiales y humanos necesarios para el desarrollo del Convenio y en concreto para la consecución de los fines que constituyen el objeto del presente convenio las partes se comprometen a:

1. A la Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio le corresponderá:
 - 1.1. Aportar la cantidad de diez mil novecientos noventa y ocho euros con noventa céntimos (10.998,90 €), en una única anualidad en 2020 destinados a financiar los gastos que generen los estudios analíticos y el desarrollo del resto de las actuaciones que se describen en el anexo al presente Convenio.
 - 1.2. Aportar el apoyo técnico necesario para la recogida de muestras y su envío al Centro Universitario de Plasencia de la Universidad de Extremadura para su investigación y análisis posterior.
2. A la Universidad de Extremadura, Centro Universitario de Plasencia, le corresponderá:
 - 2.1. Realizar todas las actuaciones descritas en el anexo adjunto a este Convenio (Memoria de actividades). En concreto, el Departamento de Ingeniería del Medio

**Interreg**
España - PortugalUNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIAFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

Agronómico y Forestal del Centro Universitario de Plasencia, en su Laboratorio de Genética del Grado de Ingeniería Forestal, aportará, para el desarrollo del Convenio, la utilización de las instalaciones científicas de la Universidad, el material de laboratorio y gabinete y los recursos humanos necesarios.

2.2. Elaborar una memoria donde se contendrá el conjunto de actuaciones realizadas y el resultado científico de las mismas, detallando:

- La identificación hasta el nivel de especie de todos los individuos (adultos o larvas). La identificación incluirá una explicación detallada de los pasos hasta llegar a la determinación: bases de datos de secuencias, árboles filogenéticos y asignación de las secuencias desconocidas a los clusters con secuencias de referencia de cada especie de Cerambícido.
- El análisis de la estructura genética de cada especie y la intensidad flujo genético entre las poblaciones de Extremadura. Se incluirán los gráficos y resultados generados por los programas STRUCTURE y ARLEQUIN a partir del genotipado con dos tipos de marcadores moleculares: ADN mitocondrial y los microsatélites de ADN (nuclear). Se generarán mapas que indiquen el grado de conectividad genética de las poblaciones de Extremadura a partir de los resultados.
- La cuantificación de la diversidad genética para las dos especies de Cerambyx en diferentes poblaciones muestreadas por toda Extremadura. Este apartado incluirá el cálculo de índices que permiten estimar si las poblaciones se encuentran en expansión local o retracción. Se aportarán análisis estadísticos y gráficas que relacionen los parámetros de diversidad genética con variables demográficas (p. ej. tamaños poblacionales) estimados a partir de los datos del Servicio de Sanidad Vegetal.

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio***Cuarta. Actuaciones.***

Las actuaciones del Convenio que corresponden a cada una de las partes, serán llevadas a cabo mediante los medios propios disponibles o mediante la suscripción contractual con terceros, respecto de aquellas acciones que resulten necesarias, siendo de exclusiva responsabilidad de cada parte y efectuándose a su riesgo y ventura.

Quinta. Duración.

El presente Convenio extenderá su vigencia desde el momento de su firma hasta el 15 de diciembre de 2020

Sexta. Seguimiento del Convenio.

El seguimiento del Convenio se realizará conjuntamente por parte de la Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio de la Junta de Extremadura, a través de la Dirección General de Agricultura y Ganadería y la Universidad de Extremadura.

Por parte de la Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio se designa como Director Técnico del Convenio al Jefe del Servicio de Sanidad Vegetal. Por parte de la Universidad de Extremadura el responsable será D. Manuel Bertomeu García, del Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal.

Séptima. Dotación presupuestaria y financiación.

- 1) La aportación económica de la Junta de Extremadura con una cuantía total de diez mil novecientos noventa y ocho euros con noventa céntimos (10.998,90 €) en una única

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvemento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

anualidad, de los presupuestos de la Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio, tienen la imputación presupuestaria siguiente:

ANUALIDAD	CENTRO GESTOR	POSICIÓN PRESUPUESTARIA	FONDO	PROYECTO
2020	120020000	G/312A/64100	CT14TFEP26	20190106 Cooperación Transfronteriza: SIAPD

2) La financiación de los conceptos presupuestarios expresados en el párrafo anterior se efectuará con arreglo a los siguientes términos:

El abono se realizará por certificación del Director técnico nombrado en virtud de la estipulación sexta de este convenio, por los trabajos ejecutados en base al anexo del Convenio, y que se realizará tras la elaboración de la memoria referida en la estipulación tercera que debe elaborar el Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal del Centro Universitario de Plasencia, de la Universidad de Extremadura en todo como máximo el 15 de diciembre de 2020.

Octava. Resolución.

El presente Convenio se resolverá por cualquiera de las siguientes causas:

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

- a) Por cumplimiento del objeto del mismo.
- b) Por vencimiento del plazo de vigencia.
- c) Por incumplimiento de cualquiera de las estipulaciones acordadas, por parte de la UEX, en cuyo caso se procederá al reintegro de las cantidades que hubiere recibido, así como de los intereses legales que hubieren devengado las citadas cantidades.

Novena. Información, confidencialidad y protección de datos.

Las informaciones que las partes puedan haberse revelado para la consecución del presente Convenio y referida a sus actividades, así como las que se revelen como consecuencia de su ejecución tendrá la consideración de confidencial debiendo las partes guardar secreto sobre toda la información a la que puedan tener acceso, todo ello con la salvedad de que la misma sea de dominio público o se conociera legal o legítimamente por la otra. El deber de confidencialidad permanecerá durante el plazo de vigencia del convenio y subsistirá tras su extinción, comprometiéndose las partes a devolverse o destruir la información confidencial a la que pudieran haber accedido sin que sea necesario previo requerimiento para ello.

Las partes se comprometen a cumplir lo establecido en las disposiciones en materia de protección de datos y especialmente lo estipulado por la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de datos Personales y garantía de los derechos digitales. «BOE» núm. 294, de 6 de diciembre de 2018, con el fin de la correcta gestión.

Décima. Jurisdicción.

Las partes se comprometen a resolver de mutuo acuerdo cualquier diferencia que sobre el presente convenio pueda surgir, y en el caso contrario, ambas acuerdan que todo litigio,

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

discrepancia, cuestión o reclamación de la ejecución o interpretación del convenio o relacionados con él, directa o indirectamente, se someterán a la Sala contencioso-administrativo del Tribunal Superior de Justicia de Extremadura, de conformidad con el artículo 10 de la Ley 29/1998, de 13 de julio, de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa.

Habiéndose leído el presente Convenio por las partes aquí reunidas y hallándose conforme lo firman por triplicado y a un solo efecto en el lugar y fecha indicado ut supra.

La Consejera de Agricultura, Desarrollo
Rural, Población y Territorio,
(PA), La Secretaria General
(Resolución de 23/07/2019;
DOE n.º 144, de 26/07/2019),

FDO.: MARÍA CURIEL MUÑOZ

El Rector Magnífico
de la Universidad
de Extremadura,

FDO.: ANTONIO HIDALGO GARCÍA

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio**ANEXO I**

MEMORIA DE ACTIVIDADES DEL CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE LA CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, DESARROLLO RURAL, POBLACIÓN Y TERRITORIO, DIRECCIÓN GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA (SERVICIO DE SANIDAD VEGETAL) DE LA JUNTA DE EXTREMADURA Y LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (LABORATORIO DE GENÉTICA DEL GRADO DE INGENIERÍA FORESTAL Y DEL MEDIO NATURAL, DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DEL MEDIO ANGRONÓMICO Y FORESTAL, DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE PLASENCIA) PARA EL DESARROLLO DE PROTOCOLOS QUE PERMITAN LA DIAGNOSIS MOLECULAR RÁPIDA DE ESPECIES DE INSECTOS PERFORADORES DE LA MADERA DE QUERCÍNIAS

1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS.

1.1. Contexto general del proyecto.

La dehesa es un sistema agroforestal ibérico de alto valor ecológico que se encuentra incluido en la Directiva de Hábitats Prioritarios de la Unión Europea (CEC 1992, Papanastis 2004, Buralho et al. 2011). Las dehesas tienen origen antrópico y combinan pastos y árboles, principalmente encinas (*Quercus ilex*) y alcornoques (*Quercus suber*). Su principal aprovechamiento es la ganadería extensiva y tienen una gran importancia socioeconómica en zonas de España como Extremadura, que con su casi millón y medio de hectáreas alberga el 35 % de toda la superficie nacional de dehesa (Montero et al. 1998, Pulido y Moreno 2009). La presencia de árboles es en buena medida responsable de la elevada biodiversidad que alberga este ecosistema, y sus

**Interreg**
España - PortugalUNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIAFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

frutos (las bellotas) el alimento esencial para producir carne de alta calidad, especialmente en el ganado porcino (Moreno y Pulido 2009). El valor económico y ecológico del arbolado hace, por tanto, que su conservación sea uno de los principales retos a los que se enfrentan los gestores de la dehesa. Sin embargo, encinas y alcornoques se enfrentan actualmente a una serie de problemas importantes, como el decaimiento e incluso la muerte de árboles provocados por algunos coleópteros xilófagos de la familia Cerambycidae (Coleoptera) (Torres-Vila 2017).

Estos cerambícidos que se alimentan de la madera de las quercíneas son de gran tamaño (imago de hasta 6 centímetros), siendo las especies más frecuentes *Cerambyx cerdo*, *Cerambyx welensii* y *Prinobius myardi* (Torres-Vila et al. 2017). Los adultos de estos insectos vuelan entre los meses de Mayo y Agosto, y las hembras realizan la puesta en grietas en la corteza, heridas de poda etc. Cuando los huevos eclosionan la larva se introduce en el interior del tronco, donde se desarrollará durante 3 o 4 años alimentándose de la madera. Al cabo de este tiempo la larva pupa antes del otoño y el adulto aún permanecerá todo el invierno dentro del tronco hasta emerger en Mayo-Junio del año siguiente (Torres-Vila y Bonal 2018).

Las larvas provocan importantes daños al perforar la madera, ya que debilitan la estructura de ramas y troncos haciéndolos vulnerables y quebradizos (Carrasco 2009, Torres-Vila et al. 2017). Asimismo, las perforaciones facilitan la colonización por hongos, y el debilitamiento puede contribuir a hacer al árbol más susceptible al ataque de otros patógenos, como el que provoca la enfermedad conocida como "la seca" (el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, Corcobado et al. 2013). No obstante, la severidad del daño depende de la especie que se considere. *Prinobius myardi* se alimenta de madera muerta, con lo cual las consecuencias son menos lesivas. *Cerambyx welensii*, por el contrario, lo hace de madera viva, siendo considerada una plaga de la dehesa con un impacto negativo creciente (Torres-Vila y Bonal 2018). Por último, *Cerambyx cerdo* se alimenta también de madera viva, lo que hace que su

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

gestión sea polémica ya que, si bien en determinadas zonas de España es abundante e incluso puede provocar daños (Torres-Vila et al. 2017), se trata de una especie que cuenta con protección a nivel de la Unión Europea (CEC 1992, IUCN 2010).

1.2. Justificación.

Desde el Servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Extremadura se lleva estudiando desde hace más de 10 años la ecología, comportamiento, distribución y especialmente el impacto de estos grandes cerambícidos en las masas de quercíneas extremeñas. Asimismo, se han llevado a cabo estudios de captura-recaptura para estimar la densidad poblacional y la capacidad de dispersión los adultos. Todo este trabajo previo ha dado una buena idea general de la distribución y corología de las especies en la Región y de su capacidad de dispersión a corta distancia. Sin embargo, nuevos estudios utilizando técnicas moleculares podrían aportar información adicional de gran relevancia para el manejo y/o control de estas especies.

Las técnicas moleculares permiten la determinación de las diferentes especies en fases del ciclo vital para las que no existen claves morfológicas, como es el estado de larva. Este estado es, además, en el que se producen los daños en los árboles. Las larvas de *C. cerdo* y *C. welensii*, por ejemplo, son morfológicamente indistinguibles y, para poder identificarlas, la única alternativa hasta ahora es criarlas en cautividad hasta que se hagan adultas, lo que puede llevar hasta 3 años. Aparte de la duración, este procedimiento tiene otros problemas, como que una mortalidad diferencial entre especies podría falsear la prevalencia real de cada cerambícido. Por ello, técnicas como el barcoding del DNA, que se realiza ya en el laboratorio de genética del Grado de Ingeniería Forestal de la UEX (Plasencia), contribuyen a solventar estos problemas. Por un lado, permitiría establecer relaciones cerambícido-árbol hospedador fiables a nivel de especie que no pueden conocerse a partir de las capturas de adultos. Además, permitiría conocer la incidencia real de cada una. Estas herramientas

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

son esenciales y deben ser implementadas como parte del trabajo habitual de diagnóstico en un Servicio de Sanidad Vegetal.

Respecto a la dispersión, la aplicación de las técnicas moleculares permitiría tener una información muy valiosa. La efectividad de cualquier medida de reducción local de una plaga depende en buena medida de su capacidad de recolonizar la zona en la que se ha realizado la actuación de manejo o control. Para ello es necesario conocer su movilidad a diferentes escalas espaciales. La movilidad en insectos puede estimarse mediante estudios de captura-recaptura de individuos marcados. Sin embargo, estos trabajos tienen sus limitaciones e impiden ir más allá de una escala local. La utilización de marcadores moleculares sí lo hace y, además, a partir de las características genéticas de las poblaciones, permite conocer variables relevantes de su dinámica poblacional.

1.3. Objetivos.

El objetivo general es desarrollar una serie de protocolos que permitan la diagnosis molecular rápida de estas especies de insectos perforadores de la madera en quercíneas, así como conocer el grado de conectividad y la dinámica de sus poblaciones en Extremadura. Los objetivos específicos serían:

- Obtener secuencias de ADN en diferentes genes de especímenes adultos que sirvan de referencia para la determinación de las larvas.
- Probar diferentes marcadores moleculares y elegir el que permite una mejor discriminación de las principales especies de Cerambícidos perforadores de quercíneas.

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

- Utilizar marcadores moleculares con diferente tasa de mutación para estimar, a partir del flujo genético, la conectividad entre poblaciones de estos insectos a diferentes escalas espaciales.
- Estimar la dinámica poblacional y diversidad genética de las poblaciones de *Cerambyx cerdo* y *Cerambyx welensii* a partir de marcadores moleculares.
- Profundizar en el conocimiento del comportamiento y reproducción de estas especie simpátricas.

2. METODOLOGÍA A EMPLEAR.**2.1. Extracción de ADN.**

El ADN se extraerá de larvas y adultos a partir de una muestra de tejido de 1 a 2 mm de longitud. Para la extracción se utilizarán kits comerciales de alta calidad. Una vez extraído, la concentración del ADN se cuantificará utilizando un dispositivo nanodrop y, aquellas muestras en las que fuese necesario, se diluirán con agua miliq para alcanzar unos valores que optimicen el éxito de la posterior PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con la que se amplificarán los genes seleccionados.

2.2. Amplificación de ADN.

Una vez extraído el ADN, se amplificarán en cada individuo diferentes genes mitocondriales y fragmentos de ADN nuclear (microsatélites) mediante PCR. El protocolo para la preparación de la Master Mix y las condiciones de la PCR fueron las especificadas en Hughes y Vogler (2004b). Se amplificará en todos los individuos un fragmento del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I de 658 pares de bases, conocido



**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

comúnmente como fragmento de Folmer. La secuencia de bases nucleotídicas de este gen es característica de cada especie, por lo que se le suele considerar como el código de barras de ADN para su identificación. Asimismo, en algunas larvas y adultos se secuenciará un segundo fragmento del mismo gen, pero de mayor longitud (824 pares de bases). Por último, se secuenciarán en una pequeña parte de los ejemplares otros dos genes que codifican para las proteínas ribosómicas de la mitocondria (el 12S y el 16S). El objetivo es saber si, aparte de los clásicos de la Citocromo Oxidasa (cox1), existen otros marcadores que pudiesen dar la suficiente variabilidad en todas las localidades de estudio.

Para todos estos genes mitocondriales existen primers (cebadores) que se han desarrollado con anterioridad para poder realizar la PCR. Lo mismo ocurre en el caso de los microsatélites, para los que se han descrito primers específicos que funcionan muy bien en cerambícidos. La secuenciación se hará utilizando la tecnología BigDye (Perkin-Elmer) y un secuenciador ABI3700. Los cromatogramas de las secuencias se alinearán y editarán utilizando el software SEQUENCHER 4.6 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA). Los microsatélites se editarán en GENEMAPPER.

2.3. Análisis de datos moleculares.

La delimitación de especies se realizará de acuerdo al Modelo Generalizado Yules-Coalescent (GMYC) implementado en el paquete de R 'splits', usando la opción de 'single threshold' (Pons et al., 2006). El primer árbol filogenético se construirá con el fragmento de Citocromo Oxidasa I según el método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML), aplicando el modelo de sustitución GTR+I+Gamma a un árbol ultramétrico construido con el software RAxML 7.0.4. El método GMYC analiza los patrones de ramificación del árbol filogenético y detecta la transición entre la ramificación "dentro de especie" y "entre especies", delimitando 'grupos (clusters) de ADN

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

mitocondrial que evolucionan independientemente (Pons et al. 2006). Estos grupos reciben el nombre de 'especies GMYC' y, cuando incluyen secuencias de especímenes identificados morfológicamente hasta el nivel de especie (individuos adultos), pueden servir para determinar especímenes no identificables morfológicamente, como son las larvas de estos coleópteros.

Los análisis de estructura genética intra-específica se harán incluyendo todas aquellas poblaciones extremeñas en las haya al menos 8 individuos por especie (adultos o larvas identificadas mediante código de barras de ADN -ver arriba-). El software POPART (Leigh y Bryant 2015) se usará para ilustrar la distribución de los diferentes haplotipos de cada especie. Se realizarán análisis de la varianza molecular (AMOVA) utilizando el software ARLEQUIN (Excoffier et al. 2005) para ver qué porcentaje de la misma se explica por las diferencias entre poblaciones. Este mismo programa se utilizará para medir el flujo genético entre ellas y, de esta manera, saber a partir de qué distancia el flujo genético disminuye significativamente, indicando pues llegada limitada de insectos de fuera. Para las medidas de estructura y flujo genético inter-poblacional utilizaremos dos tipos de marcadores: genes mitocondriales y microsatélites de ADN. Los microsatélites de ADN son unos marcadores moleculares nucleares hipervariables (alta tasa de mutación) que permiten detectar diferencias entre poblaciones a escala de paisaje (de cientos de metros a pocos kilómetros). En este apartado del proyecto su utilización es necesaria para complementar los análisis con marcadores mitocondriales, de menor tasa de mutación y resolución espacial.

2.4. Diversidad genética y dinámica poblacional.

La diversidad nucleotídica y la diversidad genética haplotípica del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (cox1) se calculará utilizando el software ARLEQUIN

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

(Excoffier et al. 2005) para todas las especies que tengan al menos 8 conespecíficos por población. Con el mismo software se calculará la D de Tajima (Tajima 1989). Este parámetro aporta información acerca de la dinámica poblacional en el caso de marcadores neutros como el *cox1*. En el caso de los microsatélite de ADN, que al ser marcadores nucleares tienen dos copias, se analizará el grado de heterocigosidad (diversidad genética) a nivel individual y de población. Estas medidas de diversidad genética individual suelen estar relacionadas con la eficacia biológica del individuo. Asimismo, las medidas a nivel de población (en este caso con genes mitocondriales y nucleares) darán información acerca de variables importantes de cada una de estas poblaciones en Extremadura: expansiones demográficas, dinámicas temporales etc.

3. DESGLOSE DE GASTOS.

Basándonos en las actividades descritas, los fondos para financiar estos trabajos destinarán a los siguientes conceptos, pudiendo incrementar o minorar la imputación del gasto de cada partida a petición del Laboratorio de genética del Grado de Ingeniería Forestal y de manera justificada, con el visto bueno del Director Técnico del Convenio, que se describen:

3.1. Gastos de personal UEX.

— 3.750,00 €.

Trabajo de laboratorio de un técnico de apoyo durante un mes y medio (coste para la Uex incluyendo cuotas sociales).

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

**JUNTA DE EXTREMADURA**Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

3.2. Coste de laboratorio (material fungible).

— 2.581,00 €.

Costes de extracción y amplificación de ADN mitocondrial y nuclear (microsatélites de ADN) para 500 muestras de insectos.

El coste incluye:

- La compra de 3 kits de extracción de ADN de la marca OMEGA biotek E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit.
- Puntas para pipeta de 10, 200 y 1000 microlitros.
- Placas para PCR marca Eppendorff.
- Tubos y placas para almacenaje de ADN marca Eppendorff.
- Kits de polimerasa para PCR con sus correspondientes reactivos accesorios (MgCl₂ y NH₄ Buffer) de la marca Quiagen.

— 1.250,00 €.

Costes de secuenciación genes mitocondriales para 500 muestras a 2.5 € por muestra, según costes estándar de la empresa de biotecnología Macrogen.

— 600,00 €.

Costes de genotipado de microsatélites de ADN para una selección de 200 individuos, a 3 € por muestra, según costes estándar de la empresa de biotecnología Secugen S. L.

**Interreg**
España - PortugalFondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento RegionalUNIÓN EUROPEA
UNIÃO EUROPEIA

**JUNTA DE EXTREMADURA**

Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural,
Población y Territorio

**3.3. Costes indirectos.**

— 909,00 €.

Costes indirectos de la Universidad de Extremadura, como parte proporcional del proyecto dedicada a sufragar el uso de instalaciones

3.4. Total con IVA.

— 3.750,00 + 2.581,00 + 1.250,00 + 600,00 + 909,00 + 1.908,90 (IVA) = 10 998,90 €