

María Menéndez Gutiérrez^{1,2}

Raquel Díaz Vázquez^{1,2}, Margarita Fernández Alonso¹

¹ Centro de Investigación Forestal de Lourizán. Ctra Marín km 3.5, Pontevedra 36080, España

² Departamento de Ingeniería de los Recursos Naturales y Medio Ambiente. Universidad de Vigo,

36310 Vigo, España



INTRODUCCIÓN

La enfermedad del marchitamiento del pino (Pine wilt disease), causada por el organismo de cuarentena *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle, ha ocasionado importantes pérdidas económicas y ecológicas en Asia oriental y Portugal. Actualmente en España, se encuentran cuatro focos de la enfermedad bajo erradicación.

Una de las estrategias de lucha contra la enfermedad es la mejora genética para la obtención de individuos tolerantes o resistentes a *B. xylophilus*. El procedimiento de inoculación en plántula para la determinación del grado de susceptibilidad del material vegetal es un procedimiento que requiere gran cantidad de medios y tiempo.

Este trabajo pretende estudiar la validez de metodologías más rápidas y sencillas basadas en:

- La capacidad de multiplicación de *B. xylophilus* en diferente material vegetal
- La atracción de *B. xylophilus* por distinto material vegetal

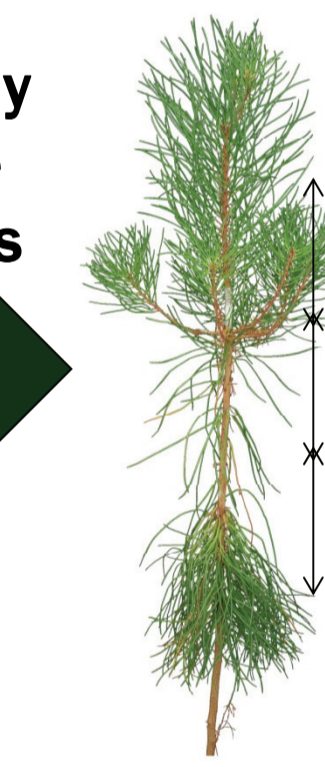
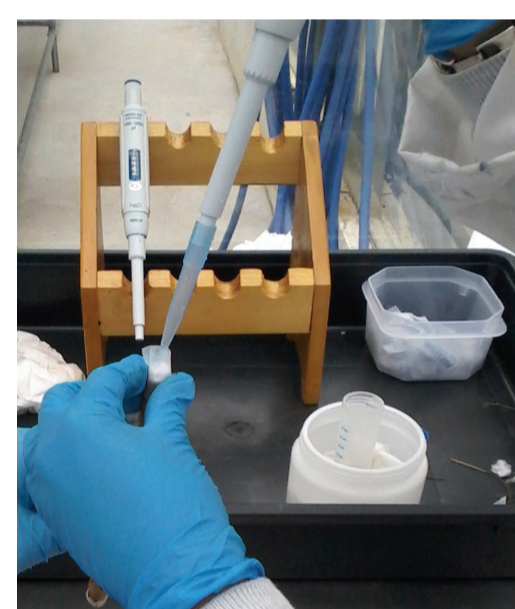


METODOLOGÍA

Ensayos rama cortada – Multiplicación

Experimento 1 (Julio 2014)

- Plántulas 3 años
- *P. sylvestris*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. halepensis*
- Hm= 96,3 ± 1,4 cm, Dm = 11,9 ± 0,2 mm

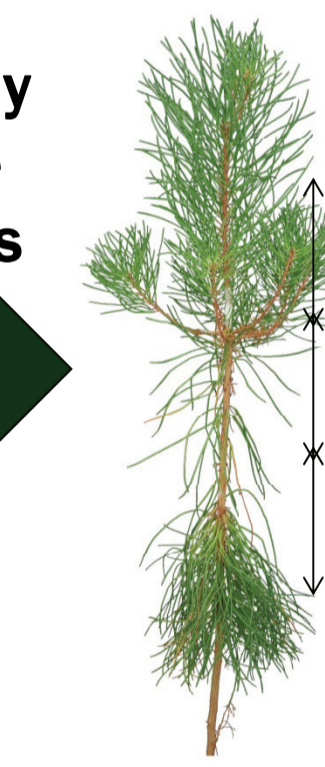


- 1ª semana tras la inoculación
- 2ª semana tras la inoculación
- 3ª semana tras la inoculación

- Cada plántula se dividió en 3 segmentos de 20cm, inoculados con *B. xylophilus* en su extremo superior.

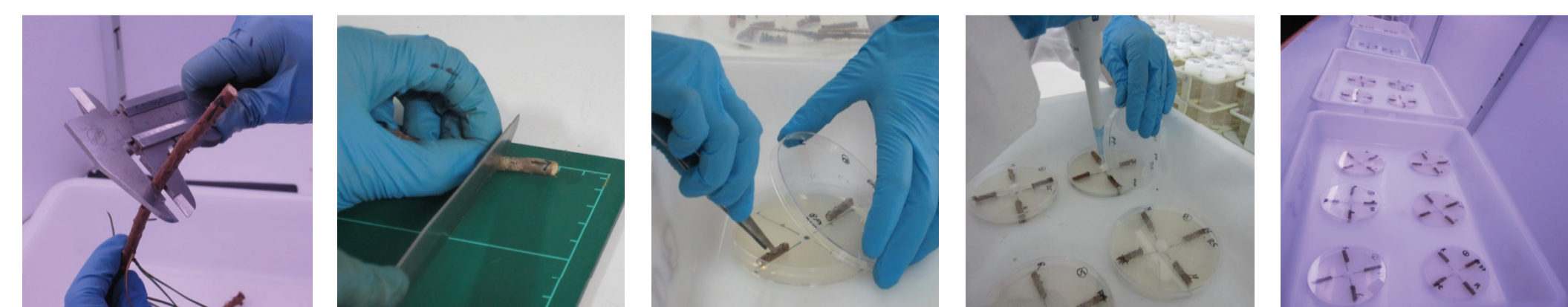
- Los segmentos se mantuvieron en oscuridad 25 °C dentro de bolsas de plástico

Extracción y conteo de nematodos



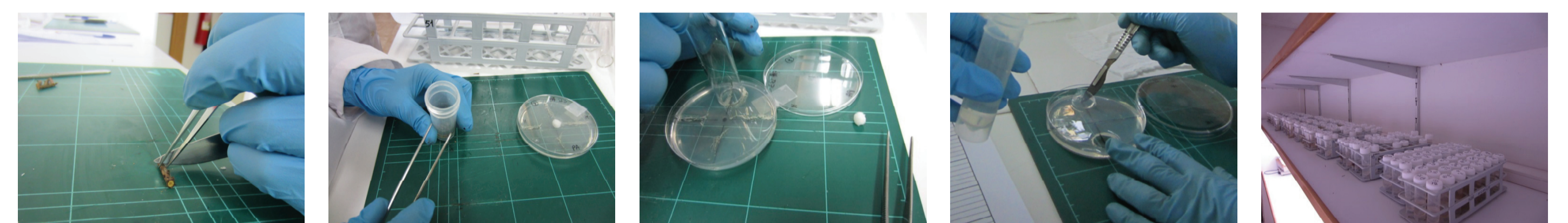
- 1ª semana tras la inoculación
- 2ª semana tras la inoculación
- 3ª semana tras la inoculación

Bioensayo doble elección – Atracción



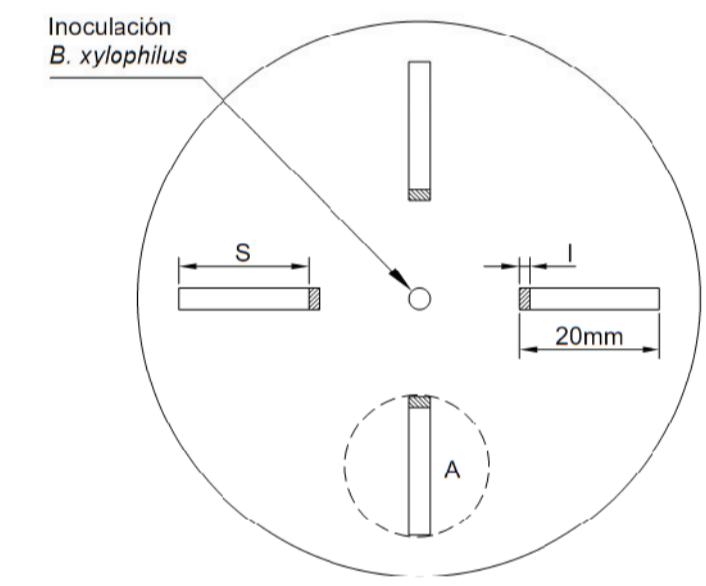
- Segmentos de ramillos: D = 0,3 – 0,4 mm, L = 2 cm
- Especies: *P. pinaster*, *P. radiata*, *P. pinea*, *P. halepensis*

Cuatro segmentos de similar diámetro, dos por especie, se dispusieron de forma alterna en placas Petri con agar, inoculando en el centro una dosis de 1500 nematodos. Se mantuvieron en oscuridad a 25 °C durante 12 horas.



Después se realizó la extracción de nematodos separadamente de:

- Porción de 3 mm de la parte inferior de cada segmento de ramillo (I)
- 17 mm restantes de cada ramillo (S)
- Disco de agar de 21 mm de diámetro retirado debajo de cada uno de los segmentos (A)



Para la determinación de la tasa de invasión por especie se aplicó la siguiente fórmula:

$$TI = (S / (I + S + A)) \times 100 (\%)$$

RESULTADOS

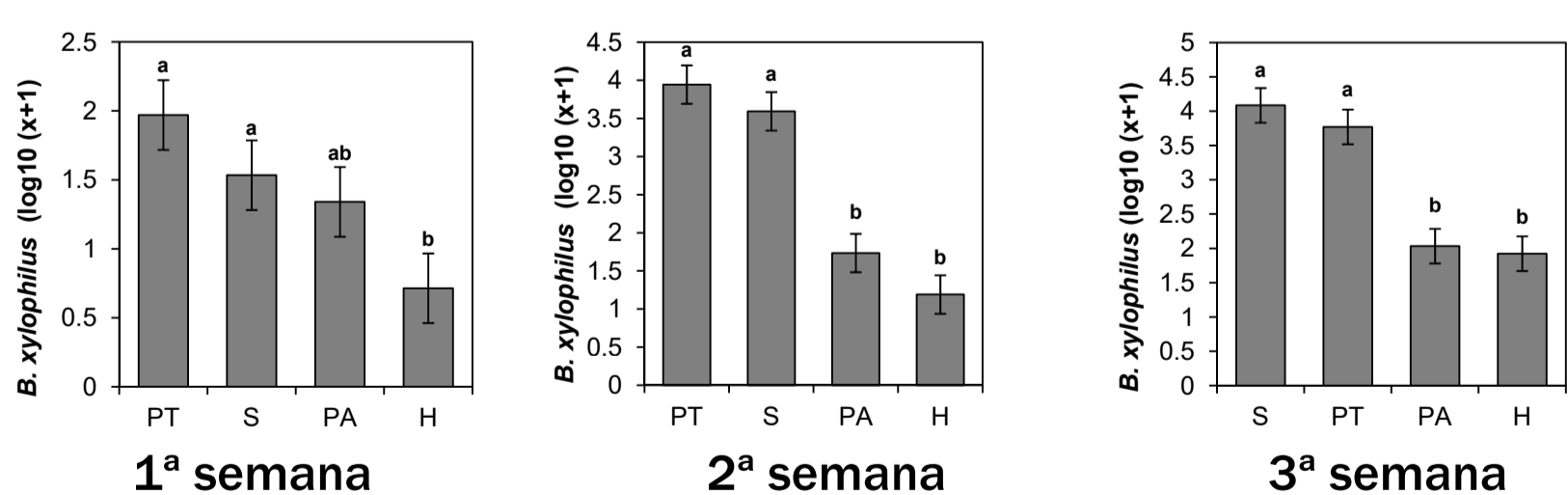
Ensayos rama cortada – Multiplicación

Experimento 1

Diferencias significativas:

- Fechas de conteo de nematodos $F_{2,32} = 33,59$ $p < 0,0001$
- Especies $F_{3,16} = 22,68$ $p < 0,0001$
- Interacción fecha x especie $F_{6,32} < 3,75$ $p = 0,0061$

Tras dos y tres semanas desde la inoculación, la multiplicación de nematodos fue significativamente mayor en *P. sylvestris* (S) y *P. pinaster* (PT) que en *P. Pinea* (PA) y *P. halepensis* (H). Tras una semana el número de nematodos en *P. pinea* no difirió significativamente de los recuperados en *P. pinaster* y *P. sylvestris*.



Todas las especies presentaron un mayor número de nematodos tras 3 semanas desde la inoculación, excepto *P. pinaster* que a las 2 semanas alcanzó el número máximo.

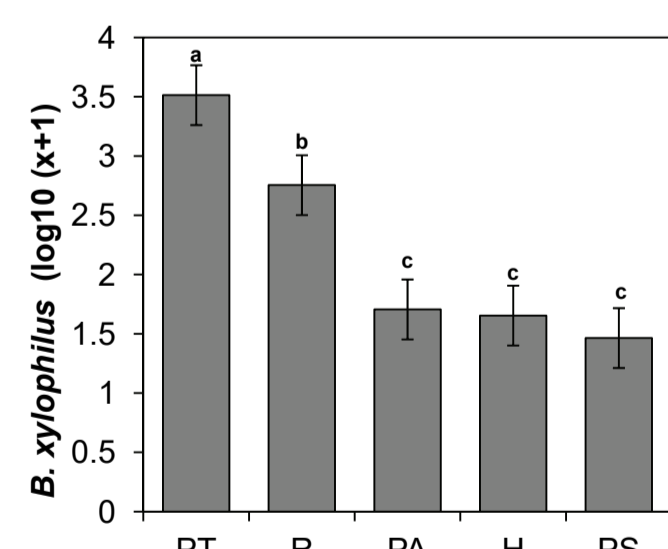
Especie	Ranking de tolerancia*	Ensayo	1 semana		2 semanas		3 semanas				
			Mediana	Mín.	Máx.	Mediana	Mín.	Máx.	Mediana	Mín.	Máx.
<i>P. pinaster</i>	2	Exp 1	116	22	371	9.37	6.272	12.475	6.525	3.380	11.625
		Exp 2	54	1	1.005	21.22	13.565	111.846	22.965	3.570	88.244
<i>P. halepensis</i>	4	Exp 1	4	2	9	8	5	249	316	0	2.225
		Exp 2	2	1	22	9	3	471	2.210	27	4.723
<i>P. pinea</i>	4	Exp 1	21	7	41	52	5	331	228	1	3.158
		Exp 2	2	1	51	15	4	1.868	3.302	4	16.776
<i>P. sylvestris</i>	1	Exp 1	77	3	116	4.61	1.413	7.456	12.450	6.875	19.680
<i>P. radiata</i>	3	Exp 2	3	2	11	2.53	78	26.470	15.881	4.721	27.537
<i>P. menziesii</i>	4	Exp 2	5	1	18	20	0	38.750	27	18	2.938

* 1-4, de más a menos susceptible

Experimento 2

Diferencias significativas:

- Fechas de conteo $F_{2,32} = 33,59$ $p < 0,0001$
- Especies $F_{4,20} = 12,21$ $p = 0,0006$

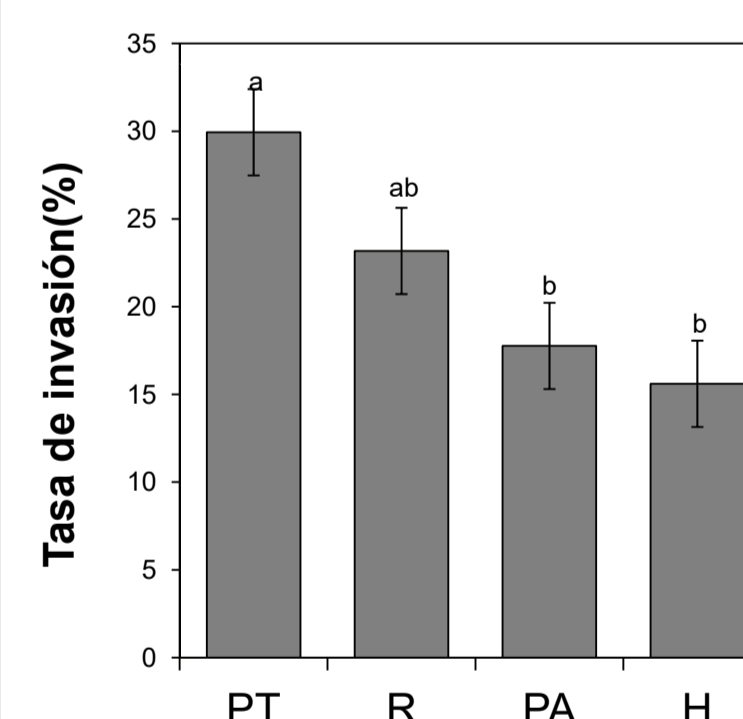


Correlación significativa a nivel especie entre multiplicación y clase de tolerancia derivada de anteriores ensayos.

Mejor ajuste a las 3 semanas en el Exp. 1 ($\rho = -0,90$, $p < 0,0001$) y a las 2 semanas en el Exp 2 ($\rho = -0,84$, $p < 0,0001$).

Bioensayo doble elección – Atracción

-Diferencias significativas entre especies $F_{3,8} = 6,76$ $p < 0,01$



-Dos grupos significativamente distintos en cuanto a tasa de invasión: 1. formado por *P. pinaster* (PT) con mayor tasa, 2. formado por *P. pinea* (PA) y *P. halepensis* (H), con una tasa menor. *Pinus radiata* (R) se encuentra en una situación intermedia entre ambos grupos, no siendo significativamente distinto a ninguno de ellos.

CONCLUSIONES

- *Pinus pinaster* además de ser una de las especies con una mayor tasa de multiplicación, es la especie con mayor tasa de invasión en el bioensayo de atracción, aunque en este caso no se aprecian diferencias significativas con *P. radiata*.
- La determinación de la capacidad de multiplicación de *B. xylophilus* en rama cortada podría ser utilizado como un método rápido y sencillo para la realización de una evaluación inicial de susceptibilidad de individuos tolerantes a la enfermedad del marchitamiento del pino. Sería importante determinar el estado fisiológico más apropiado, la densidad del inóculo, la cepa de nematodos y la temperatura.
- Por otro lado, la metodología del bioensayo a priori, parece ser menos adecuada para establecer diferencias de susceptibilidad entre especies, al no haber una diferencia preferencial de *B. xylophilus* entre *P. radiata*, *P. pinea* y *P. halepensis*; si bien, se debería seguir investigando al respecto y llegar a establecer los parámetros más adecuados para la realización de este tipo de ensayos.

