

Diagramas Eh-pH en extractos de xilema de especies de pino y susceptibilidad al nematodo del marchitamiento del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*)

Margarita Alonso Santos¹

María Menéndez Gutiérrez¹; Raquel Díaz Vázquez^{1,2}; María Francisca Ignacio Quinteiro¹; Enrique Jiménez Carmona¹; Pedro Pérez-Gorostiaga Rívoro¹; Adela Abelleira Argibay³; José Pedro Mansilla Vázquez³; Pilar Mosquera Veiga³; Gabriel Toval Hernández¹.

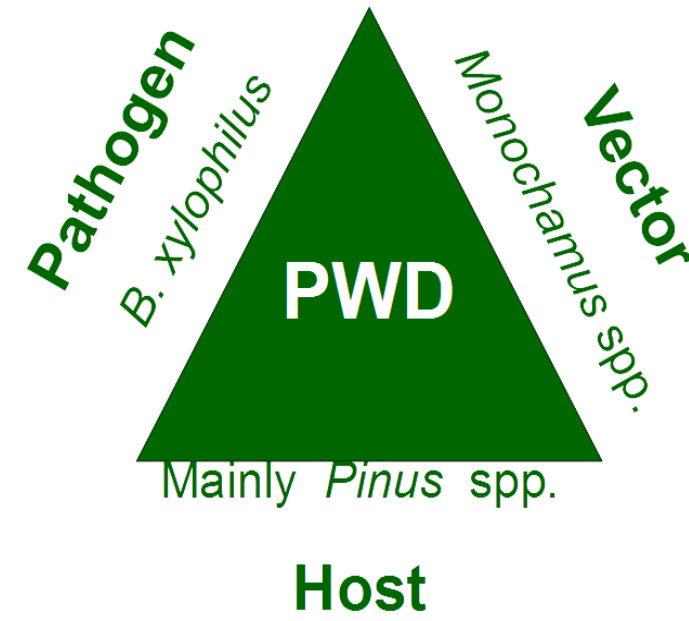
- 1 Centro de Investigación Forestal de Lourizán. Secretaría Xeral de Medio Rural e Montes. Consellería do Medio Rural e do mar. Xunta de Galicia. Ctra. Marín, km 4. 36153 Pontevedra.
- 2 Universidad de Vigo. Departamento de Ingeniería de los Recursos Naturales y Medioambiente, 36310 Vigo.
- 3 Estación Fitopatológica Areiro. Subida a la Robleda s/n, 36153 Pontevedra.



INTRODUCCIÓN

Bursaphelenchus xylophilus es un nematodo considerado organismo de cuarentena en la Unión Europea, causando la muerte de gran número de especies de coníferas. El pH de las maderas infectadas con él es diferente al de las maderas sanas. Por este motivo, la medida del pH o la utilización de colorantes indicadores de pH son algunos de los test utilizados para identificar positivos en maderas en cuarentena (ZHAO 2008, YOU et al. 1994, WANG et al. 2001). Junto con el pH, la conductividad también se ha utilizado para diferenciar maderas sanas de afectadas por PWN (CHEN et al., 2010). De igual forma, las condiciones redox en las plantas, después de un estrés biótico, también cambian (FOYER & NOCTOR, 2013). Dentro del ensayo que actualmente nos ocupa, datos publicados en un artículo anterior (MENENDEZ et al. 2017) indicaron la existencia de tres grupos de especies de pino en relación a la susceptibilidad al PWN (*Bursaphelenchus xylophilus*): nada o poco susceptibles (*P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. taeda* y *P. pinea*), susceptibles (*P. pinaster* y *P. radiata*), y muy susceptible (*P. sylvestris*).

El objetivo de este trabajo es analizar los cambios originados por efecto de la inoculación de *B. xylophilus* en parámetros básicos como pH, Eh y conductividad, en la primera zona de contacto en especies de pino poco o nada susceptibles al nematodo, en especies susceptibles, y en una especie muy susceptible. Estudiar la evolución de esos cambios con el tiempo para cada grupo de susceptibilidad.



MATERIAL Y MÉTODOS

Inoculación

Plantas de 2 años de edad de las siete especies mencionadas se inocularon el 18 de junio del 2013, en invernadero. El inóculo con *B. xylophilus* fue obtenido en la Estación Fitopatológica de Areiro, extraído de un *P. pinaster* procedente de As Neves, Pontevedra. Los nematodos fueron reproducidos en un medio de PDA con *Botrytis cynera*, y un día antes de la inoculación se extrajeron los nematodos por el método del embudo de Baermann (THORNE, 1961), y las diluciones se prepararon con agua destilada. Para el ensayo se utilizaron 525 plantas, 10 plantas por especie y bloque fueron inoculadas con *B. xylophilus* y 5 con agua destilada (controles). Todas las plantas se colocaron al azar dentro de los bloques. La Tª media del invernadero fue de 24°C, con una oscilación térmica de 17 a 35°C debido a los cambios entre día y noche. El riego fue por goteo 2 veces por semana.



Muestreo de xilema en la zona de inoculación.

A los 14, 30, 46 y 90 días después de la inoculación se muestreó una planta por especie, bloque y tratamiento para la determinación de compuestos químicos en distintos tejidos, excepto a los 90 días que solo se muestrearon las especies nada o poco susceptibles, pues la mayoría de las plantas del resto de las especies habían muerto ya. En 4 de esas 5 plantas, tanto inoculadas con nematodo como controles (con H2O), se extrajo un cilindro de tallo de aproximadamente 3 cm de longitud que incluía la zona de inoculación. Una vez descortezado, la madera del xilema se hizo lascas con un sacapuntas de acero inoxidable, congelando a -18°C este material hasta la fecha de análisis.



Metodología

Los extractos acuosos (0.5 g/ 25ml) de la muestra descongelada de xilema se obtuvieron con un homogeneizador triturador (POLITRON). La medida de pH y Eh se llevó a cabo en un pHmetro (713 pHmeter Methrom), en un baño termostático a 25°C (RTE 110 NESLAB), y con. El electrodo de referencia utilizado en ambas medidas fue un Methrom 6.0786.100 Ag, AgCl 3M KCl. Para la medida de pH se utilizó un electrodo de vidrio Methrom 6.0123.100 pH, calibrando con buffer a pH 4 y 7. La medida del Eh se realizó según el procedimiento descrito por NORDSTROM (1998), bajo burbujeo de N₂, con electrodo de platino Methrom 6.0351.100 Pt; la calibración con disolución de ZoBell. El valor del Eh se corrigió añadiéndole el potencial del electrodo de referencia respecto al electrodo estándar de hidrógeno (209 mV). Debido a la dependencia del Eh con el pH, se calculó el valor del Eh a un pH determinado, en este caso 5.35, $Eh_{5.35} = Eh + (pH - 5.35) * 59$ (MEGONIGAL et al., 1993), siendo 5.35 el valor promedio de pH del extracto acuoso del xilema de las especies consideradas. La conductividad eléctrica del extracto se midió con un conductímetro tipo CDM3, en celda de 1cm (Radiometer, Copenhagen, Denmark).

El análisis estadístico de los datos se realizó con el software SPSS v. 13.0 (SPSS Inc., Chicago IL, USA), en base a resultados de susceptibilidad de las especies, obtenidos previamente del mismo ensayo (MENENDEZ et al., 2017). Se aplicó el siguiente modelo a los grupos de especies susceptibles y poco o nada susceptibles, en cada fecha de muestreo después de la inoculación,

$$X = \mu + Sp_i + I_j + (Sp \times I)_{ij} + \xi_{k(ij)}$$

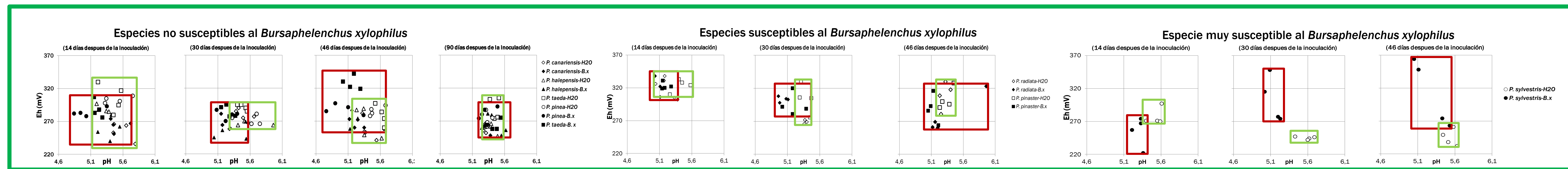
donde Sp es la especie e I el tipo de inóculo (H₂O o *Bursaphelenchus xylophilus*); mientras que al grupo de muy susceptible, con una sola especie, se aplicó el modelo

$$X = \mu + I_j + \xi_{k(i)}$$

Para la comparación de medias se usó el test de Duncan.

RESULTADOS

Diagramas Eh-pH del extracto de xilema en la zona de inoculación, para los tres grupos de especies según su susceptibilidad.



Variación de los parámetros analizados, a los 14, 30, 45 y 90 días después de la inoculación de las plantas con *B. xylophilus* o H₂O, en los grupos de especie según su susceptibilidad. Letras distintas en una misma fecha indica diferencias significativas entre plantas inoculadas con *B. xylophilus* y plantas control (inoculadas con agua).

Componentes de la varianza de los parámetros analizados, para cada grupo de especies según su susceptibilidad al nematodo del pino (*B. xylophilus*).

	Especies no susceptibles						Especies susceptibles						Especie muy susceptible		
	Sp	I	Sp * I	Sp	I	Sp * I	Sp	I	Sp * I	Sp	I	Sp * I	F _{1,8}	Pr>F	
pH	14	5.1	0.007	8.7	0.007	4.7	0.010	5.0	0.045	4.5	0.056	3.1	0.106	15.7	0.007
	30	0.8	0.513	23.9	0.000	0.2	0.911	2.4	0.149	25.6	0.000	2.2	0.164	37.4	0.001
	46	0.8	0.517	28.1	0.000	3.3	0.037	0.9	0.350	0.5	0.488	1.6	0.225	4.3	0.083
	90	4.9	0.008	0.5	0.493	1.0	0.408								
Eh a pH 5.35	14	4.9	0.008	20.2	0.000	4.0	0.019	3.2	0.096	4.3	0.060	0.2	0.655	6.6	0.000
	30	5.7	0.004	34.9	0.000	1.3	0.289	6.3	0.029	0.2	0.700	5.2	0.044	4.2	0.086
	46	18.8	0.000	0.2	0.695	4.6	0.011	0.0	0.846	2.7	0.124	0.0	0.972	6.9	0.039
	90	8.4	0.001	0.0	0.838	5.1	0.007								
Conductividad	14	8.9	0.000	0.0	0.983	0.7	0.533	0.1	0.782	0.2	0.630	2.9	0.117	3.4	0.116
	30	6.1	0.003	2.6	0.121	0.4	0.773	0.4	0.547	1.1	0.308	2.9	0.116	24.8	0.002
	46	9.1	0.000	1.1	0.306	1.4	0.299	0.2	0.685	11.6	0.005	0.9	0.371	1.9	0.213
	90	12.5	0.000	12.1	0.002	0.2	0.867								

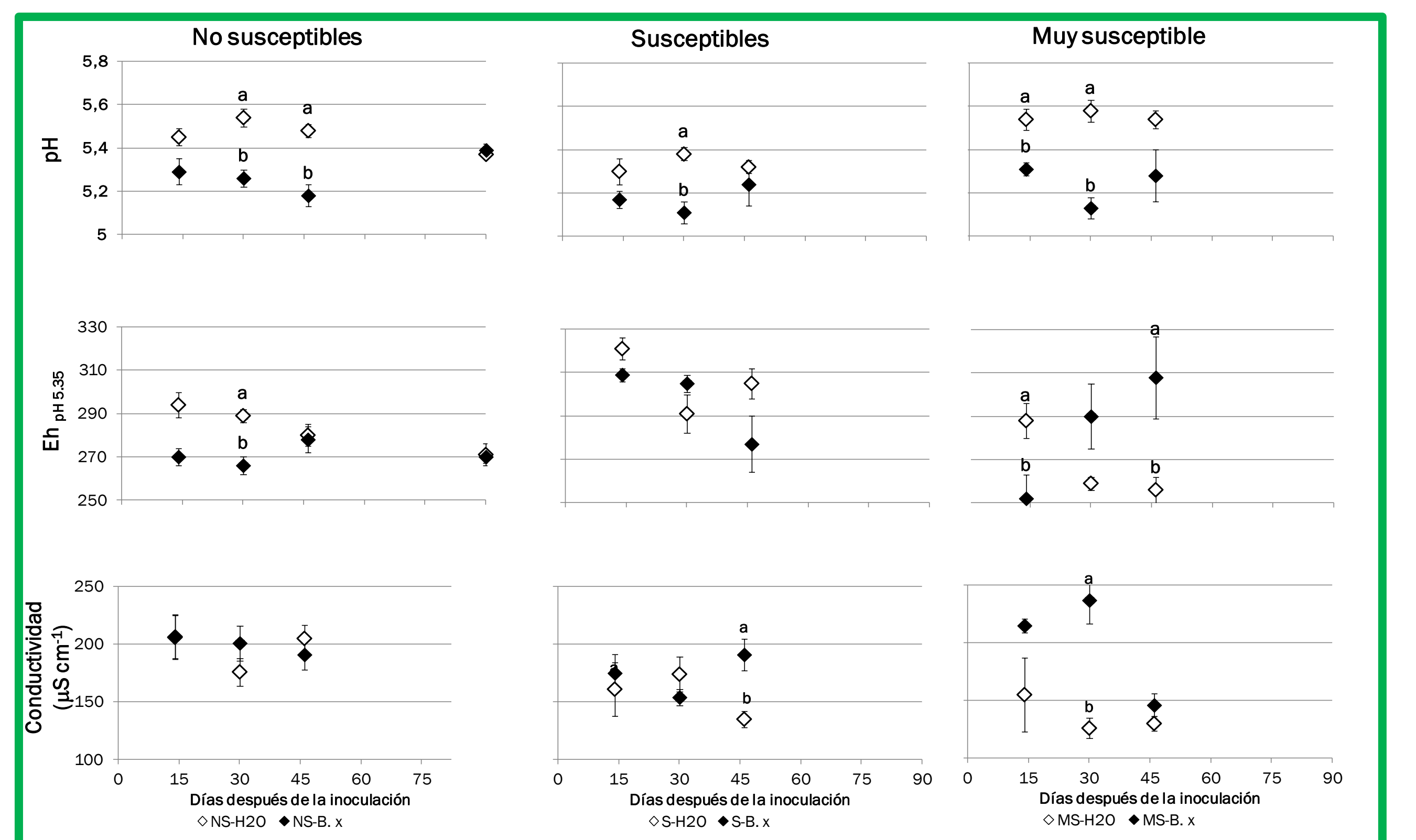
CONCLUSIONES

Independientemente de la susceptibilidad al nematodo del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*), el tejido xilemático de plántulas de 2 años de edad, situado alrededor de la zona de inoculación en las especies estudiadas, incrementa su acidez después de la inoculación, produciéndose este hecho primero en la especie muy susceptible.

La especie muy susceptible (*P. sylvestris*), se diferencia de los demás grupos de susceptibilidad en que después de un descenso inicial del potencial redox, éste incrementa rápidamente de forma significativa, pudiendo este hecho estar relacionado con una pronta oxidación de estos tejidos.

Los incrementos de conductividad después de la inoculación con *B. xylophilus* son observados primero en la especie muy susceptible, luego en las especies susceptibles y más tardíamente en las no susceptibles, posiblemente indicando, en este mismo orden, un bloqueo en la movilización de solutos a través del tallo.

Agradecemos al INIA la financiación del proyecto RTA2011-00069-C03-01, y a Ricardo Ferradás, Maribel Juncal y Belén Aramburu por su colaboración.



Bibliografía

- CHEN, Y.; ZHAO, N.; NING, X.; LIU, J. 2010. The difference of conductivity and pH value between healthy and pine wilt diseased woods of *Pinus kesiya* var. *langbianensis*. Journal of Nanjing Forestry 59-62.
- CLARK, W. M.; 1961. Oxidation-reduction Potential of organic systems. Williams and Wilkins, Baltimore.
- FOYER, C.; NOCTOR, G. 2013. Redox signaling in plants. Antioxid Redox Signal 18 (16): 2087-2090.
- MEGONIGAL, J.P.; PATRICK, W.H. & FAULKNER, S.P.; 1993. Wetland identification in seasonally flooded forest soil: soil morphology and redox dynamic. Soil Sci. Soc. Am. J. 57(1): 140-149.
- MENENDEZ, M.; ALONSO, M.; JIMENEZ, E.; TOVAL, G.; MANSILLA, P.; ABELLEIRA, A.; ABELLEIRA-SANMARTIN, A.; DIAZ, R. 2017. Interspecific variation of constitutive chemical compounds in *Pinus* spp xylem and susceptibility to pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). European Journal of Forest Pathology. En prensa.
- NORDSTROM, D.K. & WILDE, F.D.; 1998. Reduction-oxidation potential (electrode method). In: F.D. Wilde, D.B. Radtke, J. Gibs & R.T. Iwatsubo (eds.), National Field Manual for the Collection of Water-Quality Data, U.S. Geological Survey Techniques in Water-Resources Investigations Book 9, Handbooks for water-Resources Investigations, A6.5.
- THORNE, G. 1961. Principles of Nematology. New York: McGraw-Hill Book Company Inc.
- WANG, Y. Y.; LI, H. V.; SHU, C. R.; GUO, Z. H. 2001. A study on difference of pH between healthy and pine wilt diseased woods of several pine species. Acta Phytopathologica Sinica 31: 342-348.
- YOU, J. X.; SONG, Z.; HE, W.; WANG, Y. Y.; SONG, Y. S. 1994. Study on distinguishing between pine wilt diseased wood and sound wood. Scientia Silvae Sinicae 30: 145-150.
- ZHAO, B. G. 2008. Pine wilt disease in China. En: ZHAO, B. G.; FUTAI, K.; SUTHERLAND, J. R.; TAKEUCHI, Y. (Eds). Pine Wilt Disease. 18-25. Springer. Japan.

