



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-477

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Metodologías para la determinación del grado de susceptibilidad de *Pinus* spp. frente a *Bursaphelenchus xylophilus*

MENÉNDEZ GUTIÉRREZ, M.^{1, 2}, DÍAZ VÁZQUEZ, R.^{1, 2} y FERNÁNDEZ ALONSO, M.¹

¹ Centro de Investigación Forestal de Lourizán, Carretera de Marín, Km. 4, 36080 Pontevedra.

² Universidad de Vigo, Departamento de Ingeniería de los Recursos Naturales y Medioambiente, 36310 Vigo.

Resumen

Para la determinación del grado de susceptibilidad a la enfermedad del marchitamiento del pino en una determinada especie es necesaria la realización de ensayos de inoculación en plántulas. Este trabajo pretende estudiar la validez de metodologías más rápidas y sencillas para dicho fin. Los resultados obtenidos en ensayos de inoculación en planta entera transcurridos varios meses desde su inoculación fueron comparados con los resultados derivados de ensayos realizados en ramas cortadas y de un bioensayo de doble elección. En los ensayos de rama cortada, cada planta fue dividida en 4 segmentos de 20 cm, inoculados en el extremo superior, manteniéndose a 25 °C. Transcurridas 1, 2 y 3 semanas se realizó un conteo de nematodos. En el bioensayo, 2 segmentos de tallo por especie de 2 cm se dispusieron en placas Petri con agar, situándose en el centro el inóculo. Transcurridas 12 horas, se estimó la tasa de invasión en cada especie.

Los resultados muestran una misma clasificación de las especies en cuanto a susceptibilidad en los ensayos de inoculación en planta, los ensayos en rama cortada y los bioensayos. Cabe destacar la relación significativa encontrada en los ensayos de rama cortada entre el grado de tolerancia de las especies y la capacidad de multiplicación de *B. xylophilus* en éstas. Sin embargo, los bioensayos no mostraron una clara preferencia de *B. xylophilus* por las especies más susceptibles.

Palabras clave

Nematodo de la madera del pino, bioensayo, inoculación, ramas cortadas.

1. Introducción

La enfermedad del marchitamiento del pino (Pine wilt disease), causada por el organismo de cuarentena *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle, nematodo de la madera del pino (NMP), ha ocasionado importantes pérdidas económicas y ecológicas en aquellos países en los que ha sido introducido. Actualmente, se encuentra ampliamente distribuido en varios países de Asia oriental, como Japón, China, Corea y Taiwán; y en Europa, por el momento han sido afectados Portugal, que en 2008 declaró todo su territorio continental zona demarcada (MOTA *et al.*, 2009), y España, donde apareció el primer foco ese mismo año en «Sierra de Dios Padre» (Extremadura). Aunque en 2013 este foco fue declarado erradicado, en la actualidad otros cuatro focos se encuentran aún activos, apareciendo el último en Junio de 2016 en Salvaterra do Miño (Galicia) (SÁNCHEZ, 2016).

Las estrategias en España para manejo de la enfermedad se han centrado en muestreos visuales en todo el territorio español, estableciendo además una recogida de muestras en las zonas de alto riesgo (20 km desde la frontera con Portugal) y riesgo medio (80 km desde el final de la zona de alto riesgo); en la eliminación de material hospedante sintomático; y en la reducción de la población del insecto vector (SÁNCHEZ, 2016). El manejo de esta enfermedad es especialmente complejo, principalmente porque no existen medidas efectivas para acabar con el patógeno. En los países asiáticos para la lucha directa contra la enfermedad se utilizan métodos químicos como la

inyección de sustancias nematocidas en los troncos o la fumigación de insecticidas con métodos aéreos, pero estos métodos tienen efectos medioambientales adversos, son de difícil aplicación a escala forestal y no son capaces de solucionar completamente el problema (MOTA *et al.*, 2009). Sin embargo, la mejora genética encaminada a la obtención de individuos tolerantes parece ser una medida fundamental para la protección de las masas de pinos frente a *B. xylophilus*. De hecho, en países como Japón, China y Portugal se están llevando a cabo programas de mejora con este fin (NOSE & SHIRAIISHI, 2008; SOUSA *et al.*, 2016). En Japón, el primer programa de mejora comenzó en 1978 y en la actualidad disponen de 225 y 171 clones de *P. densiflora* y *P. thunbergii* respectivamente seleccionados como resistentes (HOSHI, 2016), siendo estas especies altamente susceptibles. En Galicia, tras confirmar la susceptibilidad de *P. pinaster* mediante varios ensayos de inoculación en invernadero (MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2017), se comenzaron a evaluar las familias de Plan de Mejora Genética de *P. pinaster* en Galicia.

La susceptibilidad frente a *B. xylophilus* es generalmente evaluada a través de ensayos de inoculación bajo condiciones de invernadero. Este método requiere un gran número de plántulas y, por tanto, espacio en invernadero, un periodo de tiempo relativamente largo y un elevado número de personal. Por consiguiente, con el presente trabajo se pretende evaluar la validez de otras metodologías más sencillas y rápidas que permitan seleccionar individuos tolerantes a la enfermedad del marchitamiento del pino. El mecanismo de infección de *B. xylophilus* tras la entrada en los canales resiníferos está determinado por la migración y multiplicación dentro del huésped (FUKUDA *et al.*, 1992; MAMIYA, 1983). La capacidad de migración ya ha sido estudiada como una herramienta importante para la clasificación de árboles en clases de tolerancia con resultados prometedores (MATSUNAGA *et al.*, 2011). Sin embargo, otros estudios dan mayor importancia a la capacidad de multiplicación (SON & MOON, 2013; WOO *et al.*, 2010). Por otro lado, hay estudios que determinan que las señales semioquímicas y la quimiotaxis de *B. xylophilus* juegan un papel importante tanto en su supervivencia como en su dispersión, sugiriendo que los volátiles producidos por el árbol huésped podrían ser la base de una relación químico-ecológica entre planta, insecto vector y nematodo (YUN *et al.*, 2012).

En este trabajo se realizaron ensayos para determinar la capacidad de multiplicación de *B. xylophilus* (ensayos de rama cortada) y la atracción de éste por distintas especies (bioensayos de doble elección), con el apoyo de resultados obtenidos en ensayos previos de inoculación en planta entera realizados en diferentes especies de pino bajo condiciones controladas en invernadero. En estos ensayos las especies se clasificaron en 3 grupos en función de los daños: altamente susceptibles, *P. sylvestris*; susceptibles, *P. pinaster* y *P. radiata*; no susceptibles o ligeramente susceptibles, *P. pinea* y *P. halepensis*; incluso el grupo de susceptibles se dividió en dos atendiendo a los datos de mortalidad (MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son: 1) evaluar bajo condiciones controladas la capacidad de multiplicación de *B. xylophilus* en diferentes especies de pino; 2) evaluar la existencia de una distinta atracción de *B. xylophilus* por madera de distintas especies de pino; y 3) determinar la validez de las metodologías aplicadas para la evaluación de la susceptibilidad de distintas especies de pino frente a la *B. xylophilus*.

3. Metodología

En este trabajo se realizaron dos tipos de ensayos:

Ensayos en rama cortada

Para evaluar la proliferación de *B. xylophilus* en distintas especies de pino se realizaron dos experimentos utilizando segmentos de tallo de 5 plantas por especie, el Experimento 1 se llevó a cabo con plántulas de tres años de *Pinus sylvestris*, *P. pinaster*, *P. pinea* y *P. halepensis* en Julio de 2014 (Hm = 96.26 ± 1.39 cm, Dm = 11.88 ± 0.23 mm); mientras que el Experimento 2 fue realizado con plantas de cuatro años de *P. radiata*, *P. pinaster*, *P. pinea* y *Pseudotsuga menziesii* en Octubre de 2015 (Hm = 112.20 ± 2.13 cm, Dm = 12.4 ± 0.74 mm). Cada una de las plantas se dividió en tres segmentos de 20 cm y el extremo superior de cada uno de los segmentos fue inoculado con una dosis de 600 nematodos. Los segmentos se introdujeron en bolsas de plástico cerradas herméticamente para evitar la desecación de los tejidos y se mantuvieron a 25 °C en condiciones de oscuridad. Un segmento por planta fue procesado transcurridas 1, 2 y 3 semanas para la extracción y conteo de nematodos.

Bioensayo de doble elección

Para determinar la atracción de *B. xylophilus* a diferentes especies de pino se realizó un bioensayo *in vitro* en placas Petri. Consistió en una prueba de doble elección (two choice) en la que se ofrecieron segmentos de ramillos de 0.3 - 04 mm de diámetro y 2 cm de longitud de plantas de *P. pinaster*, *P. radiata*, *P. pinea* y *P. halepensis* de cuatro años. Se realizaron 8 repeticiones por combinación de especies.

En placas Petri con 25 ml de agar al 1.5% se dispusieron cuatro segmentos de similar diámetro; dos por especie, colocados de forma alterna con una separación de 90°. En el centro de cada una de las placas se inoculó una dosis de 1500 nematodos.

Transcurridas 12 h de incubación en oscuridad a 25°C, se realizó la extracción de nematodos por separado de una porción de 3 mm de la parte inferior de cada segmento de ramillo (I), de los 17 mm restantes de cada ramillo (S) y de un disco de agar de 21 mm de diámetro retirado debajo de cada uno de los segmentos (A) (Figura 1). Para la determinación de la tasa de invasión por especie se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de invasión} = (S / (I + S + A)) \times 100 (\%)$$

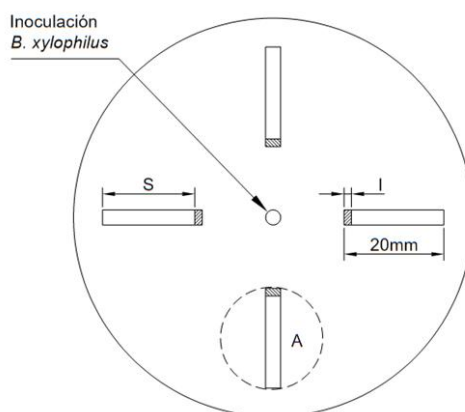


Figura1 . Diseño del bioensayo de doble elección. El conteo de nematodos se realiza de forma separada por especie en: A: discos de agar de 21mm de diámetro bajo los segmentos de ramillos, I: sección de 3mm de los ramillos, S: sección de 17mm de los ramillos.

Cultivo y conteo del nematodo

La cepa de *B. xylophilus* utilizada en todos los experimentos se obtuvo del foco de *P. pinaster* declarado en As Neves, Pontevedra en 2010 (ABELLEIRA *et al.* 2011). La cría del nematodo se llevó a cabo en *Botrytis cinerea* sobre el medio de cultivo PDA (Potato Dextrosa Agar). El día anterior a la inoculación, los nematodos se extrajeron mediante el método del embudo de Baermann y se preparó el inóculo ajustando la suspensión con agua destilada para obtener la concentración adecuada.

El conteo de nematodos se realizó empleando un estéreo microscopio (Olympus Co., Ltd., Tokyo, Japan) tras la extracción de los mismos durante 48 horas mediante el método Baermann.

Análisis estadístico

El bioensayo de doble elección y los ensayos de rama cortada fueron analizados usando un modelo mixto de medidas repetidas mediante el procedimiento MIXED del programa estadístico SAS 9.2 (SAS Institute, Inc., Cary NC, USA), utilizando el algoritmo restringido de máxima verosimilitud (REML). En los ensayos en rama cortada, la especie, fecha y la interacción de ambas fueron considerados factores de efectos fijos. Asimismo, las especies comunes en los dos experimentos *P. pinaster*, *P. pinea* y *P. halepensis*, fueron analizadas conjuntamente añadiendo el factor experimento al modelo. Cuando los factores fueron significativos ($P < 0,05$), las diferencias entre las medias fueron testadas con las LSMeans (Least Square Means). Se realizó la transformación logarítmica $\log_{10}(x + 1)$ para el análisis del número de nematodos.

En el bioensayo de doble elección, la especie, pareja y la interacción de ambas fueron considerados factores de efectos fijos, mientras que el bloque fue considerado al azar.

Los coeficientes de correlación de Spearman se calcularon para determinar la relación entre el número de nematodos y un ranking de tolerancia (1 - 4, de más a menos susceptible). Esta clasificación de la tolerancia al NMP se realizó en base a los resultados obtenidos en varios ensayos de inoculación previos a este trabajo. 1- *P. sylvestris*, 2- *P. pinaster*, 3- *P. radiata*, 4- resto de especies (MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

4. Resultados

Los resultados en los ensayos de rama cortada muestran diferencias significativas entre las distintas fechas en las que se realizó el conteo de nematodos (Experimento 1, $F_{2,32} = 33.59$ Pr < 0.0001; Experimento 2, $F_{2,40} = 47.46$ Pr < 0.0001) y entre especies en ambos ensayos (Experimento 1, $F_{3,16} = 22.68$ Pr < 0.0001; Experimento 2, $F_{4,20} = 12.21$ Pr = 0.0006). Además, en el Experimento 1, la interacción fecha por especie también fue significativa ($F_{6,32} = 3.75$ Pr = 0.0061). En este experimento, a las dos y tres semanas de la inoculación, la multiplicación de nematodos fue significativamente mayor en *P. sylvestris* y *P. pinaster* que en *P. pinea* y *P. halepensis* (Figura 2b, 2c), aunque tras una semana desde la inoculación el número de nematodos en *P. pinea* no difirió significativamente de los recuperados en *P. pinaster* y *P. sylvestris* (Figura 2a).

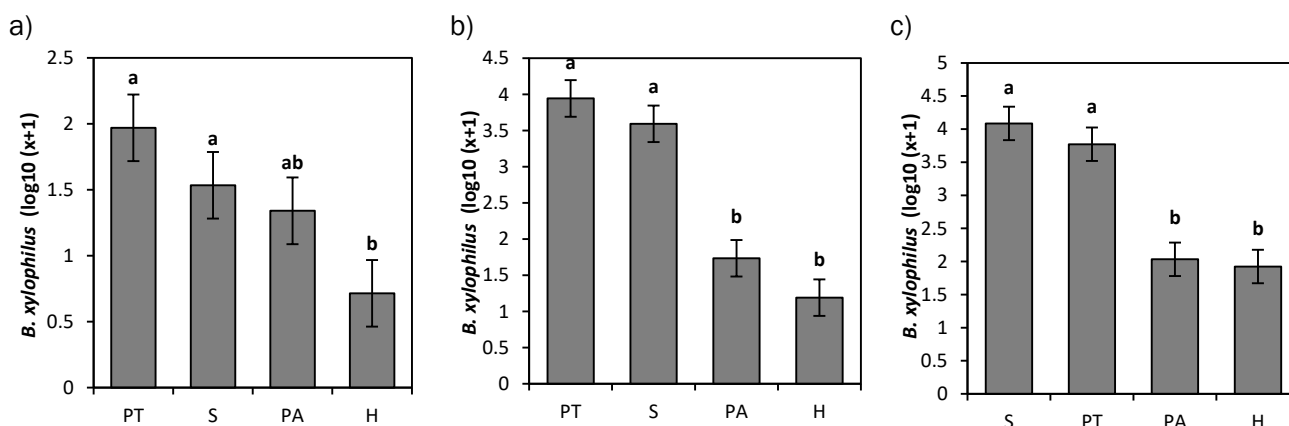


Figura 2. LSMeans del número de nematodos recuperados en el Experimento 1 por especie en segmentos de 20 cm, transformados con $\log_{10}(x+1)$. a) Transcurrida 1 semana desde la inoculación, b) Transcurridas 2 semanas desde la inoculación, c) Transcurridas 3 semanas desde la inoculación. PT: *Pinus pinaster*, S: *P. sylvestris*, PA: *P. pinea*, H: *P. halepensis*.

En el Experimento 2, destacaron *P. pinaster* con un número significativamente mayor nematodos que el resto de especies y *P. halepensis* con el menor número de nematodos, aunque sin diferencias significativas con *P. pinea* y *Pseudotsuga menziesii* (Figura 3).

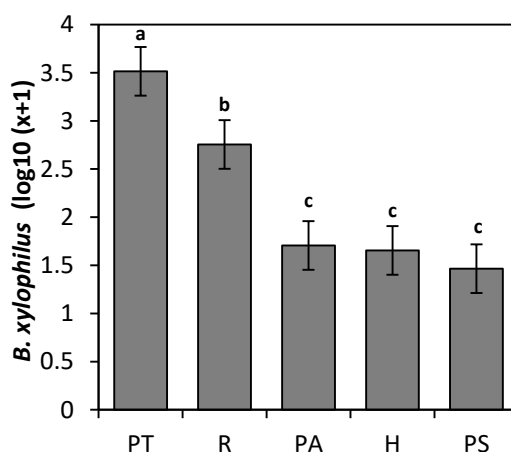


Figura 3. LSMeans del número de nematodos recuperados en el Experimento 2 por especie en segmentos de 20 cm, transformados con $\log_{10}(x+1)$. PT: *Pinus pinaster*, R: *P. radiata*, PA: *P. pinea*, H: *P. halepensis*, PS: *Pseudotsuga menziesii*.

Al analizar conjuntamente las especies comunes en los dos experimentos de rama cortada, *P. pinaster*, *P. halepensis* y *P. pinea*, también se encontraron diferencias significativas entre especies ($F_{2,24} < 45.2$ Pr = < 0.0001) y entre fechas ($F_{2,48} < 39.95$ Pr = < 0.0001), pero no entre experimentos; y al igual que en los análisis de los experimentos por separado, el número de nematodos en *P. pinaster* fue significativamente mayor que en *P. pinea* y *P. halepensis*.

En estas especies, transcurridas 3 semanas desde la inoculación tanto la mediana como el máximo número de nematodos fue mayor en el Experimento 2, destacando que la mediana en *P. pinea* fue 15 veces mayor en el Experimento 2. Todas las especies presentaron un mayor número de nematodos tras 3 semanas desde la inoculación con la excepción de *P. pinaster* que a las 2 semanas alcanzó el número máximo de nematodos (Tabla 1).

Tabla 1. Número máximo (Máx), mínimo (Mín) y mediana del número de nematodos transcurridas 1, 2 y 3 semanas tras la inoculación en el experimento realizado en 2014 (Exp 1) y el experimento realizado en 2015 (Exp 2).

Especie	Ensayo	1 semana			2 semanas			3 semanas		
		Mediana	Mín.	Máx.	Mediana	Mín.	Máx.	Mediana	Mín.	Máx.
<i>P. pinaster</i>	Exp 1	116	22	371	9.367	6.272	12.475	6.525	3.380	11.625
	Exp 2	54	1	1,005	21.222	13.565	111.846	22.965	3.570	88.244
<i>P. halepensis</i>	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>	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>	Exp 1	77	3	116	4.613	1.413	7.456	12.450	6.875	19.680
<i>P. radiata</i>	Exp 2	3	2	11	2.526	78	26.470	15.881	4.721	27.537
<i>P. menziesii</i>	Exp 2	5	1	18	20	0	38.750	27	18	2.938

Se ha determinado una correlación significativa entre el número de nematodos multiplicados en una determinada especie y su clasificación de grado de tolerancia derivada de anteriores experimentos. Esta correlación es significativa (datos no mostrados) en los dos experimentos de tallo cortado y en las distintas fechas de determinación de la multiplicación de nematodos, 1, 2 y 3 semanas. Sin embargo, el mayor ajuste se produce a las 3 semanas en el experimento 1 ($\rho = -90$, $P < 0.0001$) y a las 2 semanas en el experimento 2 ($\rho = -84$, $P < 0.0001$).

En el bioensayo de doble elección también se han encontrado diferencias significativas entre especies ($F_{3,8} = 6.76$ $Pr < 0.01$, Figura 4). Se pueden hacer 2 grupos significativamente distintos en cuanto a la tasa de invasión, el formado por *P. pinaster* con mayor tasa, y otro formado por *P. pinea* y *P. halepensis*, con una tasa menor. La especie *P. radiata* se encuentra en una situación intermedia entre ambos grupos, no siendo significativamente distinto a ninguno de ellos.

El *P. 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*.

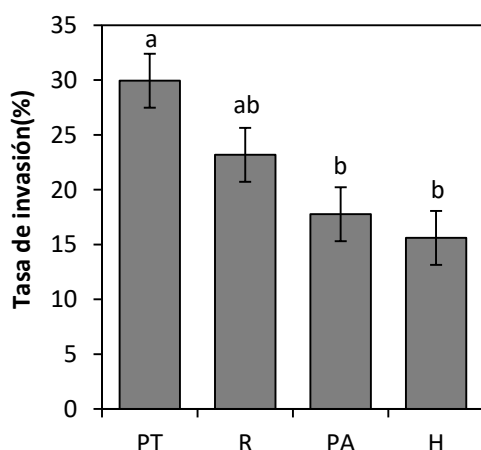


Figura 4. LSMMeans de la tasa de invasión de nematodos (%) en segmentos de ramillos de 2 cm ofrecidos en un bioensayo de doble elección. PT: *Pinus pinaster*, R: *P. radiata*, PA: *P. pinea*, H: *P. halepensis*.

5. Discusión

En los ensayos de inoculación en plántula, las especies que sufrieron mayores daños por la enfermedad del marchitamiento del pino y las que obtuvieron mayores porcentajes de mortalidad fueron *P. sylvestris*, *P. pinaster* y *P. radiata*. *Pinus sylvestris* fue la especie más afectada con un 80% de mortalidad, seguida de *P. pinaster* con un 65% y *P. radiata* con un 40% (MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ et al. 2017). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una alta tasa de multiplicación de *B. xylophilus* en estas mismas especies. Del mismo modo, en el ensayo realizado por Abelleira et al. (2016a) en el que se estudia la tasa de multiplicación una semana tras la inoculación, *P. radiata* y *P. pinaster* son las únicas especies en las que se produce multiplicación de *B. xylophilus*. Esto apoya la idea de que una mayor capacidad de multiplicación, indica una mayor susceptibilidad ante la mayor capacidad de reproducción en los tejidos de estas especies. Además, son varios los trabajos que señalan una inhibición de la multiplicación del NMP en los individuos tolerantes (MATSUNAGA et al. 2011; MORI et al., 2008;) algunas hipótesis apuntan a que la inhibición de la proliferación puede estar producida por determinadas sustancias con actividad nematocida (SUGA et al., 1993), mientras que otras barajan la idea de compuestos específicos que interfirieran en el ciclo de reproducción del nematodo (MORI et al., 2008).

Otro aspecto a destacar es la mayor tasa de multiplicación de nematodos en el Experimento 2 con respecto al Experimento 1, pudiendo estas diferencias estar determinadas por factores como las diferentes condiciones la cepa de *B. xylophilus* y/o la fecha de inoculación. El Experimento 1 fue inoculado en el mes de Julio de 2014, mientras que el Experimento 2 se inoculó en Octubre de 2015, y por tanto el estado fisiológico de las plantas en el momento de la inoculación era diferente. En el Experimento 1, las plantas podrían haberse encontrado en parón vegetativo por exceso de calor, provocando una menor multiplicación de *B. xylophilus* en éstas; mientras que el estado fisiológico de las plantas sometidas a las suaves temperaturas del mes de Octubre registradas en Pontevedra pueden haber favorecido la multiplicación. En Abelleira et al. (2016b) también se señala un diferente grado de susceptibilidad en función de factores como la cepa de nematodo, densidad, especie de pino y temperatura. A la vista de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, consideramos que sería importante profundizar en el estudio de la influencia del estado fisiológico de las plantas en la incidencia de la enfermedad del marchitamiento del pino.

Por otro lado, en el bioensayo de doble elección, se muestra la misma clasificación que en los ensayos en rama cortada o en planta entera, siendo *P. pinaster* la especie más atraída. Sin embargo, *P. radiata* no se clasifica del mismo modo que en los ensayos en planta entera o en rama cortada, la atracción de *B. xylophilus* hacia *P. radiata*, *P. pinea* y *P. halepensis* no fue significativamente diferente, así como tampoco hay diferencias entre *P. pinaster* y *P. radiata*. Estos resultados no están en total acuerdo con los obtenidos por FUTAI (2003) en un trabajo en el que se estudian ocho especies de pino con diferente nivel de resistencia y en el que no se vio reflejada una respuesta preferencial del nematodo hacia las especies más susceptibles; de hecho *B. xylophilus* presentó una gran preferencia por la savia de *P. taeda*, especie considerada altamente tolerante a la enfermedad. Sin embargo, sí se ha detectado una mayor preferencia por extractos de éter etílico de la corteza y madera de pino que por extractos en agua, indicando que la resistencia en algunas especies puede estar condicionada por repelentes hidrofílicos en estos tejidos (FUTAI, 1980). Otros trabajos señalan la gran atracción de *B. xylophilus* por el monoterpeno β -mirceno, compuesto que juega un papel importante en el paso del nematodo de larva a adulto así como en su multiplicación (ISHIKAWA et al., 1986; HINODE et al., 1987); siendo su contenido es significativamente mayor en las especies susceptibles, por lo que hay autores que indican que el análisis del contenido de β -mirceno podría utilizarse para la detección de árboles resistentes (ISHIKAWA et al., 1987).

6. Conclusiones

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. Sin embargo,

para ello sería importante determinar el estado fisiológico de la planta más apropiado en cada especie; así como otros factores como la densidad del inóculo, cepa de nematodos y 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*, pero pensamos se debería seguir investigando al respecto y llegar a establecer los parámetros más adecuados para la realización de este tipo de ensayos.

7. Agradecimientos

Este estudio se ha financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través de los proyectos NEMOPIN (RTA2011-0069-C03-01) y NEMOCONTROL (RTA2014-0042-C02-01). y, así como, ha sido cofinanciado por FEDER, INDITEX y Plan de Mejora e Innovación Forestal de Galicia (2010-2020).

8. Bibliografía

ABELLEIRA, A.; PICOAGA, A.; MANSILLA, J. P.; AGUIN, O.; 2011. Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, causal agent of pine wilt disease on *Pinus pinaster* in Northwestern Spain. *Plant disease* 95: 776

ABELLEIRA, A; ABELLEIRA-SANMARTIN, A.; PRADO, A.; CASTRO, Y.; PIÑON, P. AND MANSILLA, P.; 2016a. Variability of results in studies migration and multiplication of *Bursaphelenchus xylophilus* studies in pine stem cuttings. En: Proceedings of 32nd Symposium of the European Society of Nematologist. pp 183. Braga

ABELLEIRA, A; ABELLEIRA-SANMARTIN, A.; PRADO, A.; CASTRO, Y.; PIÑON, P. AND MANSILLA, P.; 2016b. Migration and multiplication of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus kilymensis* in five pine species. En: Proceedings of 32nd Symposium of the European Society of Nematologist. pp 183. Braga

FUKUDA, K; HOGETSU, T; SUZUKI, K; 1992. Cavitation and cytological changes in xylem of pine seedlings inoculated with virulent and avirulent isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. *J Jpn For Soc* 74:1-8.

FUTAI, K.; 1980. Host preference of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda:Aphelenchoididae) and *B. mucronatus* shown by their aggregation to pine saps. *Appl Ent. Zool.* 15(3):193 - 197.

FUTAI, K.; 2003. Pine Wilt Disease: Various Biological Relationships and Resulting Events. En: Proceedings: IUFRO International Symposium "Forest Insect Population Dynamics and Host Influences" pp 1 - 5. Kanazawa.

HINODE, Y.; SHUTO, Y.; WATANABE, H.; 1987. Stimulating Effects of β -Myrcene on Molting and Multiplication of the Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Agric and Biol Chem* 51(5): 1393-1396.

HOSHI, H.; 2016. Pine wilt disease in Japan. IUFRO Pine Wilt Disease International Working Party 7.02.10. pp 57-60.

- ISHIKAWA, M; KANEKO, A; KASHIWA, T.; WATANABE, H.; 1987. Participation of Beta-myrcene in the susceptibility and/or resistance of pine trees to the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Agric and Biol Chem* 51(12):3187–3191.
- ISHIKAWA, M.; SHUTO, Y. ; WATANABE, H.; 1986. β -Myrcene , a Potent Attractant Component of Pine Wood for the Pine Wood Nematode , *Bursaphelenchus xylophilus*. *Agric and Biol Chem* 50(7):1863–1866.
- MAMIYA, Y.; 1983; Pathology of the Pine Wilt Disease Caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annu Rev Phytopathol* 21:201–220.
- MATSUNAGA, K.; MAEZONO, H.; TAMAKI, S.; TOGASHI, K.; 2011. Inhibition response of *Pinus densiflora* clones to *Bursaphelenchus xylophilus* systemic dispersal and their resistance to pine wilt disease. *Nematology* 13(6):653–659.
- MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ, M.; ALONSO, M.; JIMENEZ, E; TOVAL, P.; ABELLEIRA, A.; ABELLEIRA-SANMARTÍN, A.; DÍAZ, R.; 2017. Interspecific variation of constitutive chemical compounds in *Pinus* spp xylem and susceptibility to pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Eur J Plant Pathol*. aceptado.
- MORI, Y.; MIYAHARA, F.; TSUTSUMI, Y.; KONDO, R.; 2008. Relationship between resistance to pine wilt disease and the migration or proliferation of pine wood nematodes. *Eur J Plant Pathol*. 122(4):529–538.
- MOTA, M.; FUTAI, K.; VIEIRA, P.; 2009. Pine wilt disease and the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. En: CIANCIO, A.; MUKERJI, K. G. (eds.): *Integrated Management of Fruit Crops Nematodes*. 253-274. Springer. Netherlands, Dordrecht.
- NAVES, P.; BONIFÁCIO, L.; & DE SOUSA, E.; 2016. The Pine Wood Nematode and Its Local Vectors in the Mediterranean Basin. En PAINE, T. D. & LIEUTIER, F. (eds.): *Insects and Diseases of Mediterranean Forest Systems*. Springer International Publishing.
- NOSE, M. & SHIRAISHI, S.; 2008. Breeding for Resistance to Pine Wilt Disease. En ZHAO, B. G. *et al.*, EDS. *Pine wilt disease*. 334-350. Springer. Japan, Tokyo.
- SÁNCHEZ, G.; 2016. Pine wilt disease in Spain. IUFRO Pine Wilt Disease International Working Party 7.02.10. pp 46–56.
- SON, J. A. & MOON, Y.; 2013. Migrations and Multiplications of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* in *Pinus thunbergii* in Relation to Their Pathogenicity. *Plant Pathol J* 29:116–122.
- SUGA, T.; OHTA, S.; MUNESADA, K.; IDE, N., KUROKAWA, M.; SHIMIZU, M.; & OHTA, E; 1993. Endogenous pine wood nematocidal substances in pines, *Pinus massoniana*, *P. strobus* and *P. palustris*. *Phytochemistry* 33(6): 1395–1401.

WOO, K.; YOON, J.; WOO S. Y.; LEE, S. H.; HAN, S.; HAN, H.; 2010. Comparison in disease development and gas exchange rate of *Pinus densiflora* seedlings artificially inoculated with *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. *Forest Sci Technol* 6:110–117.

YUN J.E.; KIM J.; PARK C.G.; 2012. Rapid Diagnosis of the Infection of Pine Tree with Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) by Use of Host-Tree Volatiles. *J Agric Food Chem* 60(30):7392–7397.

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

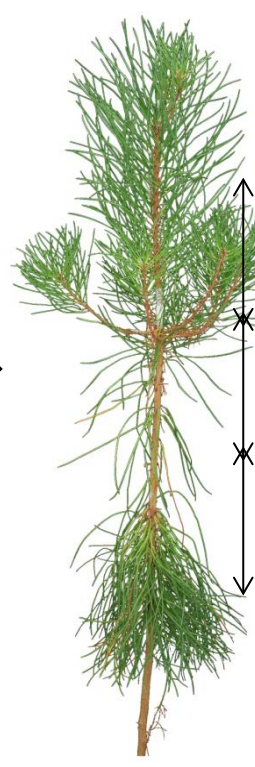
Ensayos rama cortada – Multiplicación

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



Extracción y conteo de nematodos



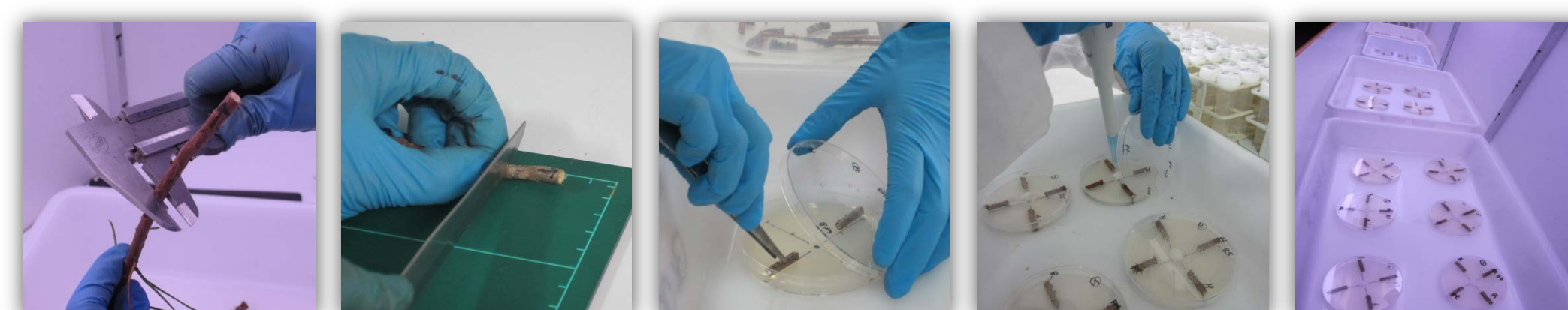
- 1ª semana tras la inoculación
- 2ª semana tras la inoculación
- 3ª semana tras la inoculación

- 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

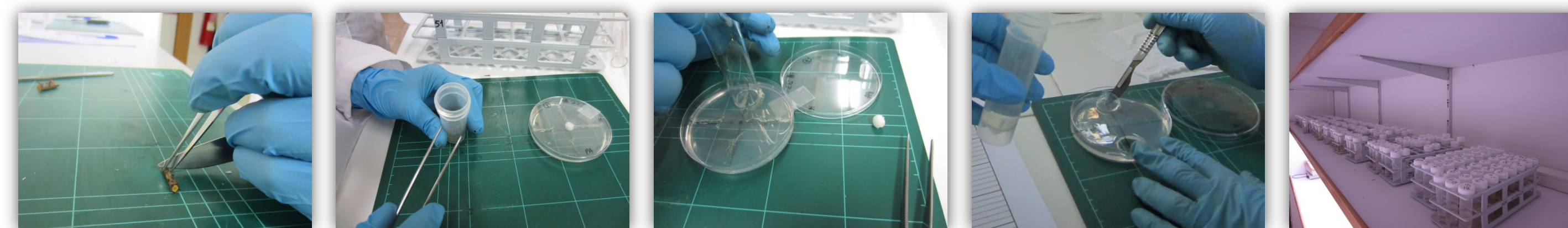
*

Bioensayo doble elección – Atracción



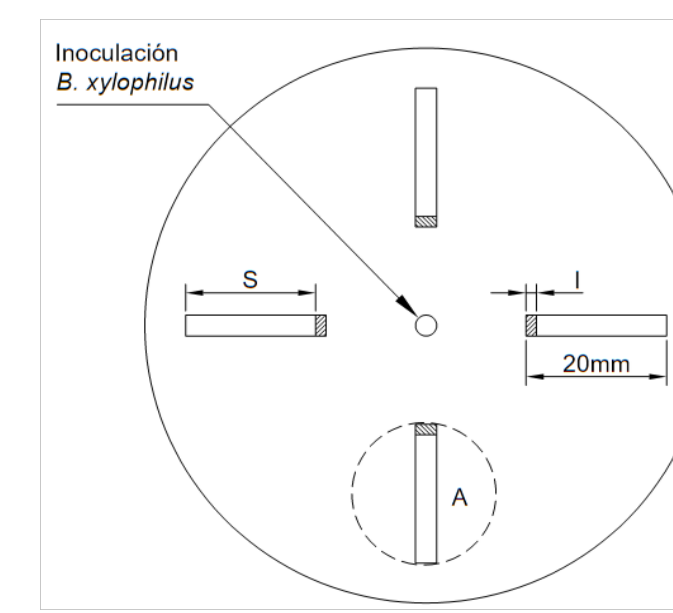
- Segmentos de ramillos: D = 0,3 – 0,4 mm, L = 2 cm
- Especies: *P. pinaster*, *P. radiata*, *P. pinea*, *P. halepensis*

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

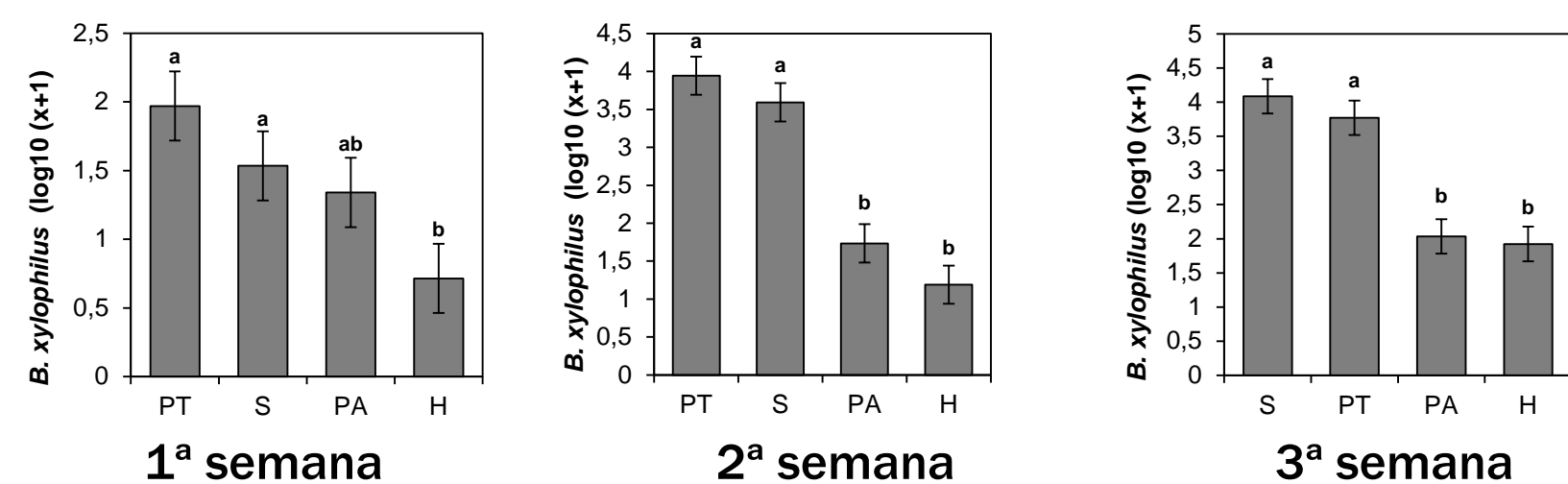
Ensayos rama cortada – Multiplicación

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.

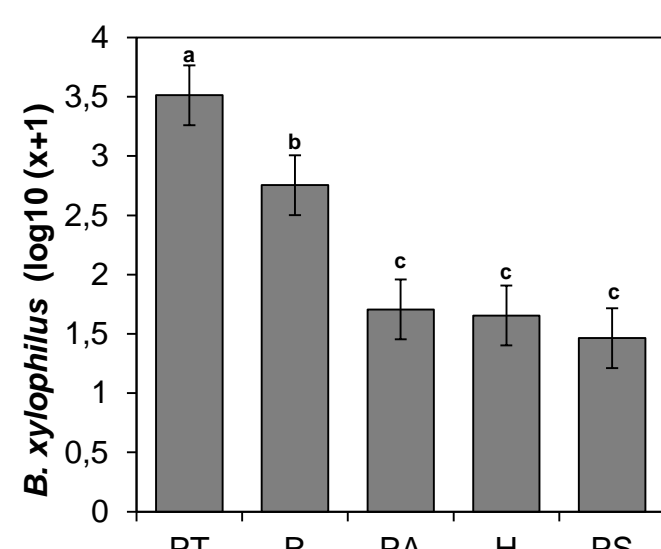
Especie	Ranking de tolerancia*	Ensayo	1 semana		2 semanas		3 semanas				
			Mediana	Mín.	Máx.	Mediana	Mín.	Máx.	Mediana	Mín.	Máx.
<i>P. pinaster</i>	2	Exp 1	116	22	371	9.37	6.272	12.475	6.525	3.380	11.625
		Exp 2	54	1	1.005	21.22	13.565	111.846	22.965	3.570	88.244
<i>P. halepensis</i>	4	Exp 1	4	2	9	8	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 $F_{4,20} = 12,21$ $p = 0,0006$

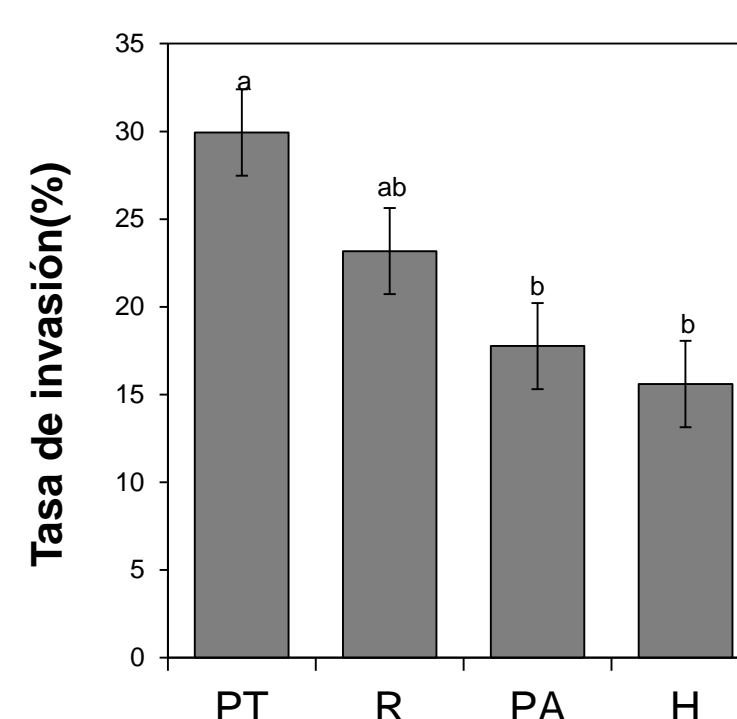


Correlación significativa a nivel especie entre multiplicación y clase de tolerancia derivada de anteriores ensayos.

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 establecer los parámetros más adecuados para la realización de este tipo de ensayos.

