

La mejora genética como herramienta de control frente al nematodo del pino. Primeros pinos tolerantes catalogados en España

Raquel Díaz Vázquez,
María Menéndez Gutiérrez,
Eva Prada Ojea

Centro de Investigación Forestal de Lourizán

El nematodo del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*) es un organismo que causa graves daños en pinares asiáticos y del suroeste de Europa. El manejo de las masas y de los insectos vectores de este nematodo es muy importante para frenar su evolución. La mejora genética, a través de la obtención de genotipos resistentes, se presenta como la principal herramienta a medio o largo plazo.

Desde 2013 el Centro de Investigación Forestal (CIF) de Lourizán desarrolla una línea de mejora genética de resistencia a este nematodo como parte del programa gallego de mejora genética de *Pinus pinaster*. Todos los estudios realizados indican que, si bien el pino marítimo es una especie muy vulnerable a la enfermedad, la resistencia al nematodo es un carácter heredable y susceptible de mejora. Recientemente se han incluido en el Catálogo Nacional de Materiales de Base un grupo de familias de este programa como progenitores de familia en la categoría de material cualificado. Estos progenitores han tenido una supervivencia un 25 % superior al resto de los genotipos evaluados, lo que indica que la mejora genética es una herramienta clave a la hora de combatir la enfermedad del marchitamiento del pino, causada por este nematodo. El manejo integrado de la enfermedad mediante el empleo de pinos resistentes, unido al manejo de los pinares y de los insectos vector, será clave para contener la expansión de esta enfermedad.

LA ENFERMEDAD DEL NEMATODO DEL PINO Y SU IMPACTO

La enfermedad del marchitamiento del pino (EMP) es causada por el nematodo *Bursaphelenchus xylophilus*, originario de Norteamérica, donde la mayor parte de las especies de pinos son resistentes a la enfermedad. Sin embargo, en los países en los que

este patógeno ha sido introducido la enfermedad está teniendo una gran virulencia, produciendo la muerte de los árboles y, como consecuencia, grandes pérdidas económicas y ecológicas. En la Unión Europea este nematodo es considerado organismo de cuarentena por el gran riesgo que puede suponer su dispersión y por los importantes per-

juicios que puede ocasionar.

Desde el siglo pasado este organismo ha causado graves daños en pinares de Japón, China, Taiwán y Corea del Sur. En Europa apareció por primera vez en 1999 (Mota et al., 1999), llegando a extenderse prácticamente por todo el país actualmente (Fig. 1). En 2008 se detectó en España, y hoy en día hay tres focos activos localizados en Galicia, Castilla y León y Extremadura. Las especies afectadas hasta la fecha en Europa son *Pinus pinaster*, *P. radiata* y *P. nigra*, si bien la inmensa mayoría de positivos se han detectado en la primera.

Los daños económicos derivados de esta enfermedad son muy acusados en todos los países afectados. En Japón las pérdidas ascendieron a un millón de m³ anuales en la década de 1980 (Hoshi, 2016) y en Taiwán más de 500 millones de pinos habían muerto hasta 2011 (Cang-Sang, 2011). En Portugal se cortaron entre 2008 y 2014 más de siete millones de árboles sintomáticos (Bonifácio, 2016) para evitar la expansión de la enfermedad al resto de Europa. Si bien no hay datos sobre el impacto en España, cabe esperar que las pérdidas económicas puedan ser elevadas. Un estudio destaca el gran impacto que ya ha tenido la enfermedad en zonas de la Red Natura portuguesa pobladas por coníferas, donde hasta 2016 había afectado a un 49 % de ellas (de la Fuente y Beck, 2018).

Tanto en los países asiáticos como en Portugal la evolución de la enfermedad ha sido semejante. En todos los casos, a pesar de las fuertes medidas de contención que se tomaron, la enfermedad acabó expandiéndose. Además, aunque los vectores naturales que transmiten el nematodo son cerambícidos del género *Monochamus*, la expansión de la enfermedad está potenciada por el hombre, que actúa como dispersor mediante el transporte y comercialización de la madera, justificando así la aparición de focos a grandes distancias en poco tiempo.

LA MEJORA GENÉTICA COMO MEDIDA DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD

Diversos son los métodos de manejo y control que se están empleando para la contención de la en-



Figura 1. Distribución de la enfermedad del marchitamiento del pino en la península ibérica



Figura 2. A) Ensayos de inoculación dentro del programa de mejora genética de *Pinus thunbergii* en Japón. B) Evaluación de injertos con púas del programa de mejora genética de *P. thunbergii* (Kyushu Regional Breeding office, Forest tree breeding Center). C) *P. thunbergii* afectado por *Bursaphelenchus xylophilus* (Kumamoto, Japón)

fermedad. Una de las medidas más efectivas para luchar contra las plagas y enfermedades es emplear árboles resistentes en las nuevas plantaciones. Se ha comprobado la existencia de especies de coníferas resistentes a la enfermedad del marchitamiento del pino, como es el caso de *Pinus halepensis* o *P. taeda*. Sin embargo, un cambio de especie solo se debería realizar en el caso de estar bien estudiada su adaptación al lugar de plantación, así como su comportamiento ante posibles enfermedades allí existentes.

Una alternativa más viable es desarrollar líneas de mejora genética dentro de los programas de las especies de

interés, ya sea por su importancia económica o ecológica. Con esta alternativa se tiene prácticamente asegurada su adaptación al lugar de plantación, así como su comportamiento ante las plagas y enfermedades ya existentes. Son diversos los ejemplos en los que se han desarrollado líneas de mejora en especies forestales con éxito en la lucha contra plagas y enfermedades de gran impacto: *Eucalyptus globulus* resistente a *Phoracantha semipunctata* empleado en el sur de España; *Pinus taeda* resistente a *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* en Estados Unidos; *Pinus radiata* resistente a *Dothistroma pini* en Nueva Zelanda,...

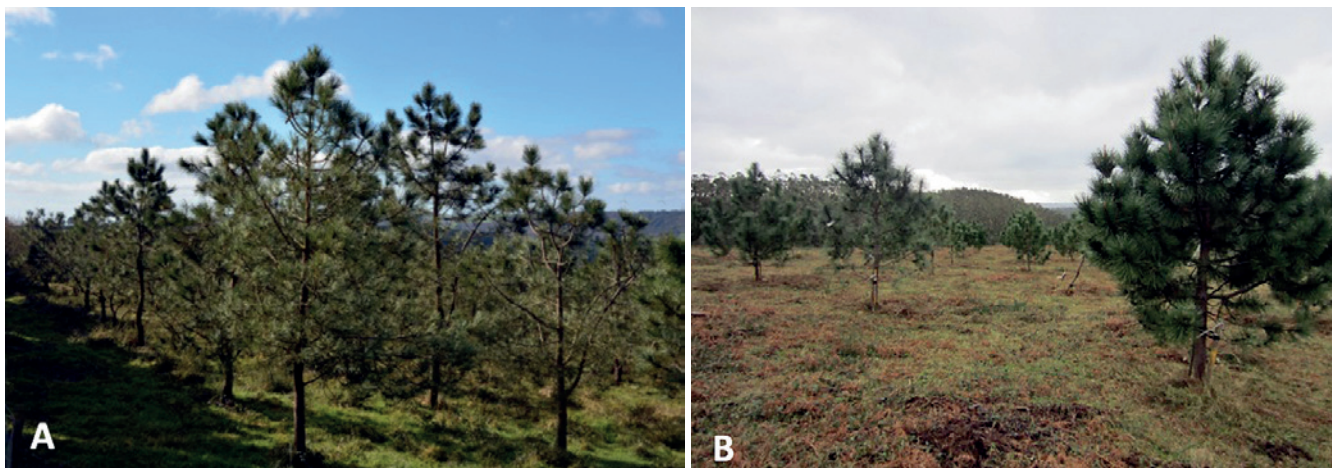


Figura 3. Huertos semilleros del programa de mejora gallego de *Pinus pinaster*. A) A Braxe. B) Monfero.

En todos estos casos se consiguieron árboles resistentes que permitieron minimizar o incluso eliminar el fuerte impacto ecológico y económico que podría haber supuesto la pérdida de estas especies. En Japón el gobierno comenzó una línea de mejora genética para *Pinus thunbergii* y *P. densiflora* en 1978 para combatir la enfermedad del marchitamiento del pino. Uno de los primeros estudios que realizaron fue evaluar si los insectos vectores asiáticos tenían preferencia alimenticia por unos genotipos de pino frente a otros, y no encontraron diferencias significativas. Así, la línea de mejora se centró en la búsqueda de árboles resistentes. En primer lugar, y debido a la existencia de diferencias en la patogenicidad de cepas de *B. xylophilus*, se seleccionó una cepa con gran agresividad para emplearla en los ensayos. Actualmente los programas de mejora japoneses cuentan con 183 y 246 ejemplares de *P. thunbergii* y *P. densiflora* respectivamente seleccionados por su resistencia (Matsunaga, com. pers.; Fig. 2). En particular en ese país, se han instalado decenas de huertos semilleros de primera generación (con estos clones) y de segunda (a partir de una selección hecha con semilla obtenida de dichos clones). En 2016 se plantaron en Japón más de 400.000 plantas de *P. densiflora* y 700.000 de *P. thunbergii* procedentes de estos huertos semilleros de árboles resistentes.

A raíz de la aparición de la enfermedad en España, el CIF Lourizán consideró de gran importancia iniciar una línea de mejora genética frente al nematodo dentro del programa de

mejora genética del pino marítimo y el pino de Monterrey. Esta línea comenzó a estar operativa en 2013.

PROGRAMA DE MEJORA GENÉTICA DE *Pinus pinaster* del CIF LOURIZÁN

El programa de mejora genética del pino marítimo del CIF Lourizán se inició en Galicia entre las décadas de 1980 y 1990. Un estudio había revelado previamente la superioridad en crecimiento de los pinos gallegos. El objetivo principal era aumentar la producción de madera para apoyar e impulsar al sector forestal gallego. En esas décadas se seleccionaron 116 árboles superiores, los cuales se escogieron por tener mayor crecimiento, troncos más rectos y menor espesor de corteza. Con púas de estos árboles superiores se establecieron dos huertos semilleros clonales (Sergude y Monfero; Fig. 3A), que fueron incluidos en el Catálogo Nacional de Materiales de Base (CNMB) en 2001 y 2007, respectivamente. Asimismo, con semilla recogida de estos árboles, el centro de Lourizán realizó 19 ensayos de progenies entre 1995 y 2005. Estos ensayos se distribuyeron por toda Galicia para estudiar diversos caracteres como crecimiento, forma y resistencia a enfermedades, entre otros.

El análisis de los datos de los cuatro ensayos más antiguos dio lugar a la catalogación en 2009 de un nuevo huerto semillero clonal (A Braxe; Fig. 3B) en la categoría de controlado. La planta que se obtiene a partir de este huerto tiene una ganancia en rectitud del 3 % con respecto a los huertos se-

milleros cualificados catalogados anteriormente. Posteriormente, el análisis de datos de diez de los ensayos de progenie permitió convertir tres de los ensayos más antiguos en huertos semilleros de brinzales (As Neves, Gome-sende y Lalín), incluidos en el CNMB en 2016 y 2019. La planta de estos huertos de brinzales tiene una mejora en crecimiento y rectitud con respecto a la procedente de fuentes semilleras identificadas gallegas de un 5,3 y 2,9 %, respectivamente. Si se compara con respecto a los huertos semilleros cualificados, la mejora estimada es de 3,1 y 0,6 %, respectivamente.

En los últimos años además de catalogar nuevos huertos semilleros para ofrecer planta mejorada por crecimiento y rectitud, se ha iniciado una línea de mejora genética frente al nematodo. También se han comenzado a estudiar parámetros relacionados con la calidad de madera (densidad básica y módulo de elasticidad) en los ensayos de progenie y se ha iniciado un programa de mejora silvícola en colaboración con la empresa maderera Finsa, a partir del cual se tratarán de determinar las labores silvícolas más adecuadas para estos pinos mejorados.

LÍNEA DE MEJORA GENÉTICA DEL CIF LOURIZÁN

La aparición de la enfermedad del marchitamiento del pino en España en 2008, motivó la decisión de iniciar una línea de resistencia o tolerancia a la enfermedad dentro de este programa de mejora. Tras la adecuación de las instalaciones para el trabajo con el nematodo, al ser un organismo de



Figura 4. Ensayos de inoculación de *Bursaphelenchus xylophilus* en las instalaciones del CIF Lourizán. A, B) Evaluación de la susceptibilidad de especies de coníferas. C) Evaluación de la susceptibilidad de las familias del programa de mejora genética de *Pinus pinaster*. D) Evaluación de la virulencia de cepas de *B. xylophilus* con distintos orígenes en *P. radiata* y *P. pinaster*

cuarentena, en 2013 se iniciaron los ensayos de inoculación en invernadero bajo condiciones controladas. Desde entonces se han realizado ensayos todos los años para profundizar en el conocimiento de la enfermedad, así como para obtener genotipos resistentes. La evaluación de distintas especies de coníferas mostró que *Pinus sylvestris*, *P. pinaster* y *P. radiata* eran las especies más susceptibles (80, 65 y 40 % de mortalidad, respectivamente), mientras que otras especies como *Pinus canariensis*, *P. halepensis*, *Cryptomeria japonica*, *Sequoia sempervirens* y *Thuja plicata* fueron totalmente resistentes (0 % de mortalidad). Otras especies, como *Pinus pinea*, mostraron ser muy poco susceptibles, presentando tan solo un 15 % de mortalidad (Díaz et al., 2017; Menéndez et al., 2018b; Fig. 4A, B).

Ensayos intraespecíficos en *P. pinaster* mostraron diferencias significativas entre procedencias de esta espe-

cie, siendo la procedencia gallega una de las más susceptibles (Menéndez et al., 2017). Ante esta situación se decidió evaluar las familias del programa de mejora del CIF Lourizán en busca de material mejorado por crecimiento y rectitud que mostrase una mayor resistencia a la enfermedad (Fig. 4C). El resultado de estos ensayos mostró que existen diferencias significativas entre familias, siendo por tanto este carácter heredable ($h^2 = 0.25$; Menéndez et al., 2018a). Esto indica que la mejora genética por dicho carácter en esta especie puede ser una herramienta clave en el control de la enfermedad, al igual que sucedió en Japón para las especies asiáticas *P. thunbergii* y *P. densiflora*.

Autores asiáticos mostraron que la patogenicidad de distintas cepas de nematodo es muy variable, con cepas que causan el 100 % de mortalidad en los pinos asiáticos, mientras que otras son avirulentas (Aikawa y Kiku-

chi, 2007). Estudios de patogenicidad realizados recientemente en España con distintas cepas de *B. xylophilus* de orígenes diversos (Estados Unidos, Japón, Portugal y España; Fig. 4D) muestran que la cepa gallega empleada en los ensayos de inoculación para la obtención de genotipos resistentes en Galicia era, junto con una portuguesa, significativamente la más patógena. Esto indica que la cepa empleada hasta ahora en la línea de mejora por resistencia es suficientemente agresiva para el objetivo marcado, la obtención de pinos resistentes al nematodo.

NUEVOS MATERIALES FORESTALES DE REPRODUCCIÓN CUALIFICADOS: PROGENITORES DE FAMILIA TOLERANTES AL NEMATODO

Recientemente el análisis de datos de cinco ensayos de inoculación con familias del programa de mejora de *P. pinaster* del CIF Lourizán ha

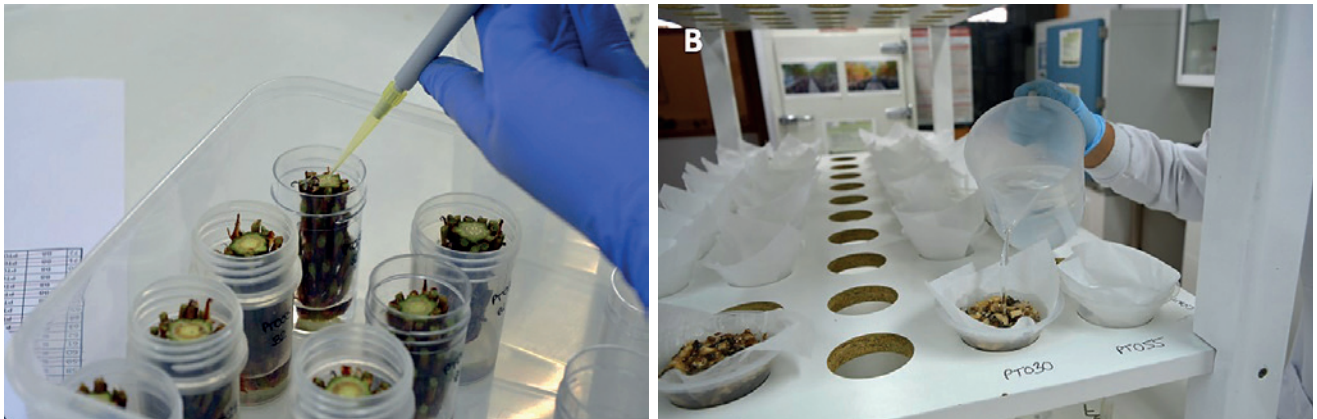


Figura 5. Ensayos de evaluación no destructivos en condiciones de laboratorio. A) Inoculación de ensayo de migración. B) Extracción de nematodos mediante el método de Baermann.

dado lugar a la catalogación de seis de ellas como progenitores de familia en la categoría de material cualificado. Estos progenitores (con códigos PF-Q-26/15/001 a PF-Q-26/15/006 en el CNMB) destacan por tener una supervivencia media de un 78 % en los ensayos de inoculación, un incremento superior al 25 % con respecto al resto de genotipos estudiados. Además, cabe destacar que estos progenitores siguen mostrando superioridad en otros caracteres de interés para la producción de madera como es el crecimiento en volumen. En este caso, la ganancia a obtener es de un 17 % si se compara con el crecimiento de fuentes semilleras identificadas gallegas. Estos pinos más resistentes ya se pueden encontrar en los viveros. No obstante hay que tener en cuenta que la resistencia encontrada ha sido demostrada en plántulas de dos a cuatro años en condiciones controladas de invernadero, no habiéndose podido evaluar en planta adulta en condiciones naturales por estar prohibidas las inoculaciones en campo, al ser este nematodo un organismo de cuarentena.

La línea de mejora frente al nematodo continúa avanzando. Actualmente se siguen realizando ensayos de inoculación en invernadero para seleccionar pinos todavía más resistentes. Además, se están haciendo cruces controlados entre los progenitores de familia catalogados, puesto que hay estudios que sugieren que esta técnica permite acumular genes resistentes; los cruces controlados podrían ser, por tanto, una herramienta muy interesante para incrementar la resistencia al nematodo. Al mismo tiempo, se están llevando a cabo estudios empleando

métodos no destructivos que permitan evaluar materiales genéticos de una manera más rápida que la inoculación en planta entera (Fig. 5). Si bien estos métodos han permitido diferenciar especies de pinos resistentes de las susceptibles, hasta la fecha estos métodos no han resultado eficaces para la diferenciación dentro de las especies europeas, es decir a nivel procedencia o familias. Sin embargo, estos métodos sí han sido empleados para diferenciar grados de susceptibilidad al nematodo en especies asiáticas, por lo que hay que seguir trabajando, tratando de depurar la metodología para las especies europeas.

En conclusión, la enfermedad del marchitamiento del pino es una gran amenaza ecológica y económica para muchos pinares españoles y europeos. Desde su aparición en Europa se aplican distintas herramientas para su contención y control, si bien es muy posible que con el tiempo siga expandiéndose. Sin embargo, la mejora genética ya se contempla como una herramienta real para la lucha contra esta enfermedad. El empleo de pinos resistentes a la enfermedad en las nuevas plantaciones, unido al manejo de los pinares ya existentes, permitirán mitigar el fuerte impacto que se prevé pueda tener la evolución de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Los estudios relacionados con el nematodo han sido financiados por los proyectos de financiación pública, RTA 2011-0069-C03 “Nemopin”, RTA2014-00042-C02-02 “Nemocontrol” y RTA2017-00012-C02-00, “Nemoplan” y por un convenio de colaboración con la empresa Inditex.

REFERENCIAS

- Aikawa T, Kikuchi T. 2007. Estimation of virulence of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) based on its reproductive ability. *Nematology* 9(3): 371–377.
- Bonifácio L. 2016. Pine wilt disease in Portugal. *IUFRO Pine Wilt Disease International Working Party*, 7.02.2010, pp. 72–81.
- Cang-Sang P. 2011. Development of studies on pinewood nematodes disease. *J. Xiamen Univ.* 50: 476–483.
- De la Fuente B, Beck PSA. 2018. Invasive species may disrupt protected area networks: insights from the pine wood nematode spread in Portugal. *Forest* 9: 282–297.
- Díaz R, Soutullo P, Molina B et al. 2017. Susceptibilidad de seis especies de coníferas al marchitamiento del pino causado por *Bursaphelenchus xylophilus*. *7º Congreso Forestal Español*. Plasencia, 26-30 junio 2017. 7CFE01-472.
- Hoshi H. 2016. Pine wilt disease in Japan. *IUFRO Pine Wilt Disease International Working Party* 7.02.2010, pp. 57–60.
- Menéndez-Gutiérrez M, Alonso M, Toval G et al. 2017. Variation in pinewood nematode susceptibility among *Pinus pinaster* Ait. provenances from the Iberian Peninsula and France. *An. For. Sci.* 74: 76.
- Menéndez-Gutiérrez M, Alonso M, Toval et al. 2018a. Testing of selected *Pinus pinaster* half-sib families for tolerance to pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Forestry* 91: 38–48.
- Menéndez-Gutiérrez M, Alonso M, Jiménez E et al. 2018b. Interspecific variation of constitutive chemical compounds in *Pinus* spp xylem and susceptibility to pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Eur. J. Plant Pathol.* 150: 939–953.
- Mota M, Braasch H, Bravo M. 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1: 727–734.