

## INFORME FINAL GRUPO OPERATIVO “DESARROLLO DE ELICITADORES DE DEFENSA EN CASTAÑO DEL PAÍS (GO DELICAS)”

### MEMORIA FORMATO LIBRE

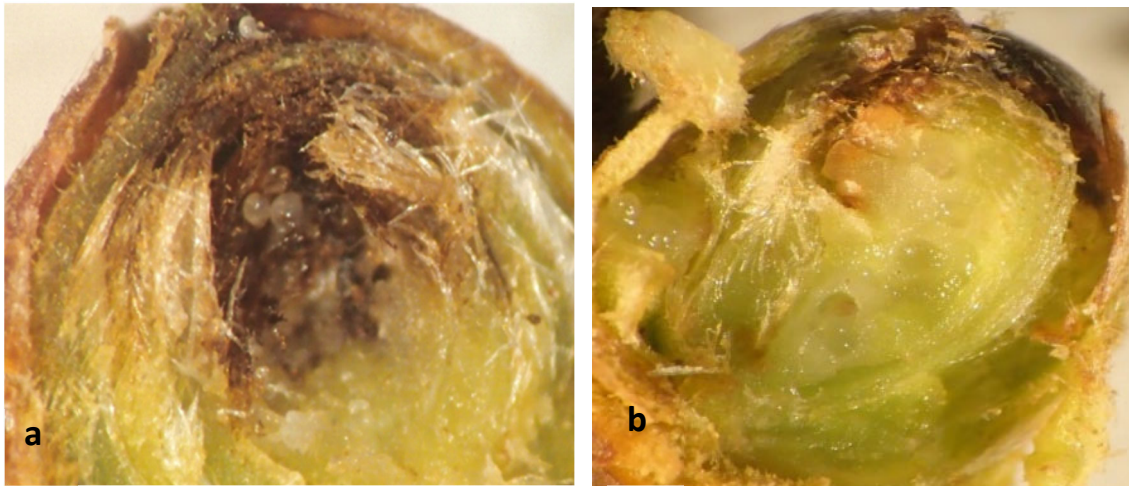
#### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La finalidad de este proyecto ha sido desarrollar un sistema de control alternativo contra la avispa del castaño (*Dryocosmus kuriphilus*) para los viveros productores de planta de castaño. Los viveros están obligados a vender planta sana, pero el sistema de control de la avispa en viveros no es fácil: una alternativa podría ser cubrir las plantas madre con malla anti-trips durante el período de vuelo del gallicola. Sin embargo, esto es difícil cuando la superficie de cultivo puede ser de varias hectáreas.

El control biológico de este insecto con el ectoparásitoide introducido *Torymus sinensis*, está dando buenos resultados en campo, pero no así en los viveros puesto que para mantener poblaciones activas del parásitoide se necesitarían masas naturales de castaño cercanas a los viveros que permitiesen el mantenimiento de su población. Este insecto pasa el invierno en agallas viejas de la avispa y emerge de las mismas en primavera cuando las nuevas agallas empiezan a ser visibles. Sin embargo, los viveros productores normalmente se sitúan lejos de masas naturales para minimizar el riesgo de transferencia de plagas o enfermedades de estas masas a los mismos. Además renuevan el ramaje de las cepas anualmente (acodos que se comercializan) con lo que no pueden mantener una población del parásitoide y sin embargo están expuestos a potenciales oviposiciones del parásito, y la infección sólo se haría evidente al año siguiente, en muchos casos ya con la planta en posesión del cliente.

Este proyecto se propuso aprovechar las defensas endógenas desarrolladas por la planta contra este insecto como sistema de control. La respuesta inmune de defensa se elicitaría con un compuesto de fácil aplicación externa, análoga al producido por el árbol en su mecanismo de defensa natural contra este insecto. Este compuesto actuaría como estimulante del proceso de muerte celular programada que se produce en el momento de la eclosión de los huevos en el interior de las yemas del castaño impidiendo, por tanto, el desarrollo de la agalla

Estudios previos muestran que prácticamente todos los genotipos de castaño son capaces de responder frente a un ataque de avispa con un mecanismo de muerte celular conocido como Reacción Hipersensible (HR) entorno a la masa de huevos durante el proceso eclosión de estos, evitando la formación de las agallas y causando, por tanto, la muerte de los huevos o larvas en el interior de la yema al no poder alimentarse (Lombardero et al. 2022). La diferencia entre genotipos susceptibles y resistentes está en que en estos últimos, prácticamente todas las yemas responden con HR mientras que en los susceptibles el número de yemas que responde es muy variable lo que se traduce en niveles de ataques muy diferente entre los diferentes clones y variedades. En individuos altamente susceptibles prácticamente todas las agallas sobreviven en el interior dando lugar a adultos viables, mientras que en individuos resistentes la gran mayoría de las agallas no llegarán a formarse (Figura 1). El elicitor propuesto en este trabajo actuaría incrementando el número de yemas capaz de responder con HR contra el insecto y por tanto reduciendo su población.



**Figura 1: (a)** Yema de castaño en invierno con HR en su interior, visible por una mancha necrótica entorno a la masa de huevos y larvas recién eclosionadas, causando la muerte de estas al no poder alimentarse. **(b)** Yema de castaño en invierno con una agalla desarrollándose en su interior

## OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en el proyecto fueron:

- 1. Identificar los genes implicados en la muerte celular programada del castaño, el mecanismo que utiliza la planta para inducirlo y el elicitor que lo desencadena**
  - Tarea 1.1 Entender la reprogramación transcripcional de castaños infestados
  - Tarea 1.2 Identificar procesos moleculares diferencialmente regulados entre variedades resistentes y susceptibles.
  - Tarea 1.3. Identificación del elicitor.
- 2. Conocer la capacidad de activar la ruta de señalización frente a la avispa de las principales variedades gallegas de modo natural y tras la aplicación de las sustancias identificadas.**
  - Tarea 2.1. Caracterizar la respuesta de las variedades autóctonas gallegas a la avispa.
  - Tarea 2.2. Cuantificación de HR de las variedades gallegas tras aplicación de elicitores
- 3. Caracterizar la dosis y concentración exacta de los elicitores dependiente de la variedad, determinar el momento óptimo de aplicación y promover su desarrollo a nivel comercial.**
  - Tarea 3.1. Determinación de dosis adecuada
  - Tarea 3.2. Determinar el momento de aplicación del elicitor en campo

## RESULTADOS

**OBJETIVO 1: IDENTIFICAR LOS GENES IMPLICADOS EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DEL CASTAÑO, EL MECANISMO QUE UTILIZA LA PLANTA PARA INDUCIRLO Y EL ELICITADOR QUE LO DESENCADENA**

*Este objetivo se ha conseguido en su totalidad*

### **Tarea 1.1 Entender la reprogramación transcripcional de castaños infestados**

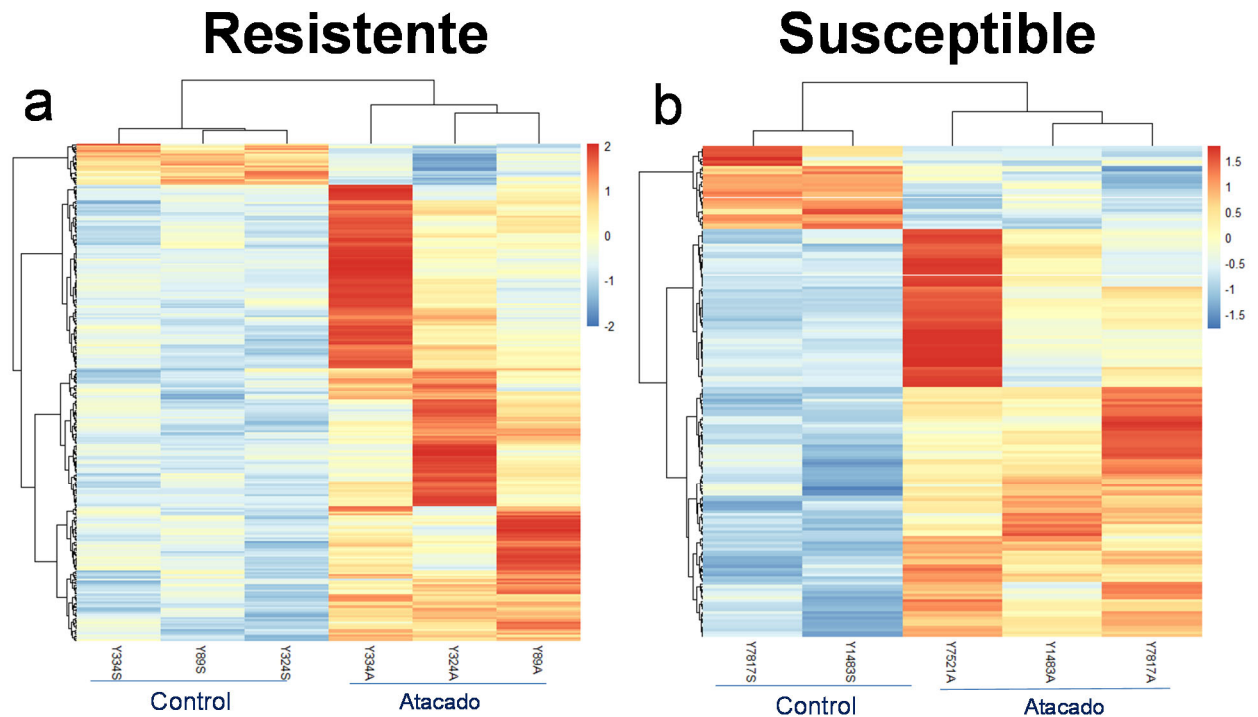
Para la obtención de este objetivo fue necesario establecer previamente varios protocolos ya que no se disponía de datos previos:

- Fue necesario establecer un protocolo de transporte del material vegetal desde el campo para evitar su deterioro y poder extraer el ARN con garantías.
- Se procedió a medir los diámetros de las yemas de los clones seleccionados para estandarizar la cantidad de material vegetal necesario (en torno a unos 30 mg) para la posterior extracción de ARN.
- Se propusieron varias opciones para optimizar la técnica de extracción de ARN en el material vegetal ya que la dureza y densidad sequedad de una yema invernal es muy superior a la de otros tejidos vegetales como hojas, usados normalmente en este tipo de extracciones.

Se procesaron 9.076 yemas de castaño recogidas en campo en 2022 en 12 genotipos de castaños resistentes y susceptibles a la avispa. Se realizaron 315 extracciones de ARN de yemas sanas (control), yemas con agalla (susceptibles) y yemas con HR (resistentes) en su interior.

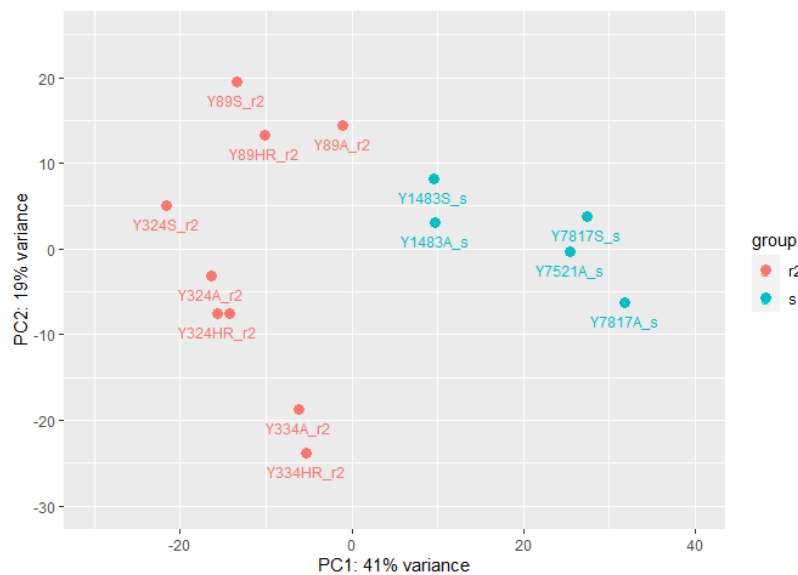
Se cuantificó la concentración ARN de cada muestra, se determinó su calidad con Bioanizador (RIN: "RNA integrity number") y se construyeron los pools de muestras por condición biológica para su envío para la secuenciación del RNA (RNAseq) a la plataforma NOVOGENE (Cambridge, Reino Unido).

Los resultados muestran una respuesta transcriptómica totalmente diferente entre genotipos Susceptibles y Resistentes, reflejados en los cambios de expresión génica observados en las yemas estudiadas (Figura 2). Las líneas azuladas representan genes que disminuyeron su expresión y las líneas rojizas los genes que se activan como respuesta a la presencia del insecto. Los resultados del Heatmap muestran una regulación transcripcional diferente entre las muestras susceptibles y resistentes. Los genes que se activan en un genotipo susceptible son diferentes a los de uno resistente, observándose la activación de 171 genes en muestras susceptibles frente a muestras no infectadas (p-valor 0.01) mientras que en los genotipos resistentes activaron 566 genes (p-valor 0.01).



**Figura 2.** Heatmap representando los cambios en la expresión génica entre yemas sanas (Control) y yemas con signos de HR en su interior (Atacadas) para árboles Resistentes (a) y yemas con agallas en su interior en árboles Susceptibles (b).

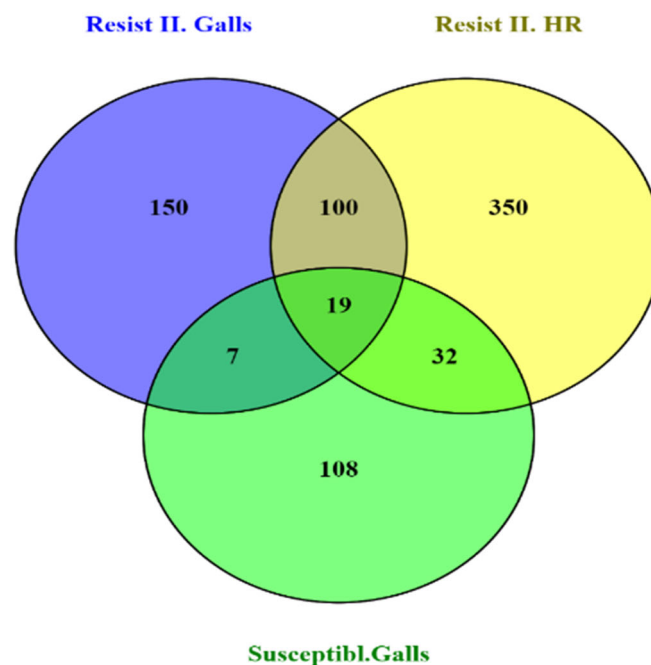
El análisis de componentes principales (PCA), explicó gran parte de la varianza en PC1 (Figura 3) y mostró un agrupamiento claro de genotipos susceptibles (en azul) por un lado y genotipos resistentes (rojo) por otro para los tres tipos de muestras analizadas.



**Figura 3.** Análisis de Componentes Principales (PCA) de la respuesta del castaño: en rojo genotipos resistentes y en azul genotipos susceptibles infectados por *Dryocosmus kuriphilus*. El gráfico representa muestras de yemas con HR, de yemas con agallas y yemas sanas no afectadas.

### Tarea 1.2 Identificar procesos moleculares diferencialmente regulados entre variedades resistentes y susceptibles.

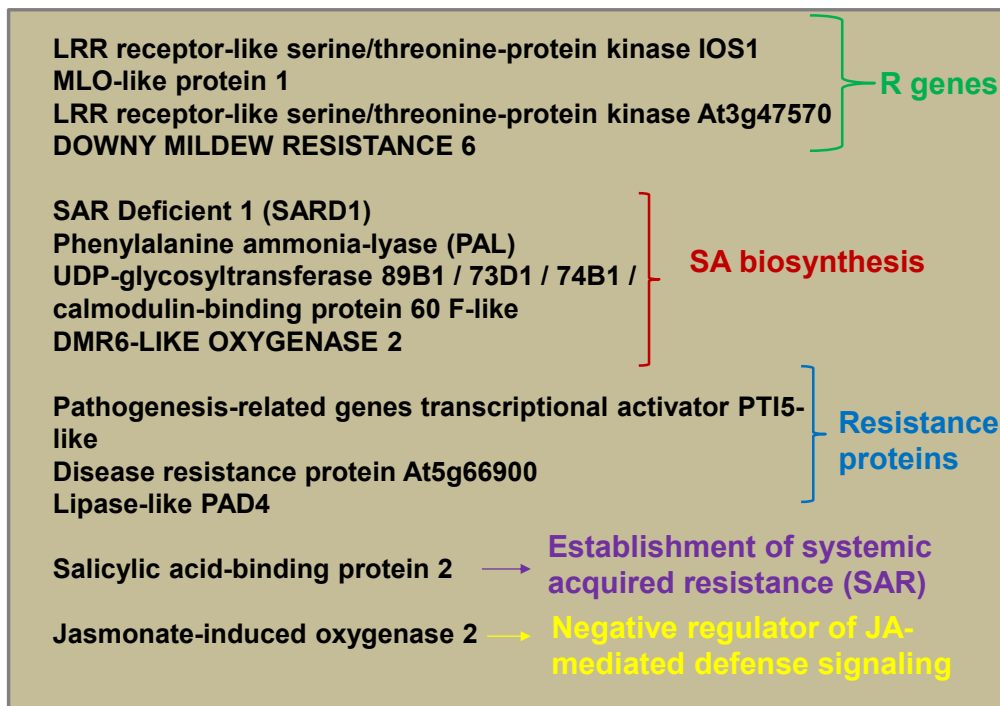
El número de genes que se expresan en los distintos genotipos estudiados es muy diferente (Figura 4). En las yemas de genotipos de castaño susceptibles donde se está desarrollando las agallas se detectaron 108 genes diferencialmente expresados (GDE) respecto de los controles no infectados (Figura 4, en verde). En yemas de genotipos resistentes que contienen agallas en su interior se identificaron 150 GDEs (Figura 4 en azul) y en aquellas yemas donde se está produciendo HR se identificaron 350 GDEs (Figura 4 en amarillo) que se expresan exclusivamente en estos genotipos resistentes. Recordemos que *Castanea sativa* contiene entre 36000 y 38000 genes codificadores de proteínas de su genoma (Bianco et al. 2024). El número de genes que se expresan en yemas que están desarrollando una agalla en su interior es muy similar entre individuos resistentes y susceptibles (150 vs 108; Figura 4), pero el número de genes que se expresa durante la respuesta defensiva es mucho mayor en los resistentes (350; Figura 4).



**Figura 4.** Número de genes que se expresan en castaños resistentes y susceptibles. En verde castaños susceptibles con formación de agallas; el amarillo castaños resistentes con respuesta HR.

Los genes identificados en los castaños resistentes se agrupan en 3 clases (Figura 5):

1. Genes relacionados con la resistencia (R genes)
2. Genes implicados en la síntesis de ácido salicílico. Esto implica que la ruta metabólica para este proceso es la del Ácido salicílico.
3. Genes relacionados con la producción de proteínas de resistencia, proteínas que suelen tener un efecto negativo sobre agentes patógenos.



**Figura 5.** Ejemplos de genes diferencialmente expresados (GDE) identificados en el proceso de respuesta defensiva del castaño frente a la avispa

Los genes R participan en la síntesis de proteínas que permiten identificar las sustancias segregadas por las larvas y detener la formación de la agalla. Las moléculas esenciales en el reconocimiento son los receptores de reconocimiento de patrones (LRR) que desempeñan un papel en la detección y el reconocimiento de efectores de patógenos, iniciando múltiples transducciones de señales dentro de la célula vegetal, estas transducciones de señales conducen a diferentes respuestas que ayudarán en la destrucción del insecto. Estas respuestas son:

- Producción de oxígeno reactivo (ROS)
- Síntesis de Ácido Salicílico
- Respuesta hipersensible (HR)
- Producción de diferentes compuestos químicos (terpenos, fenólicos, taninos, alcaloides, fitoalexinas)
- Producción de proteínas de resistencia

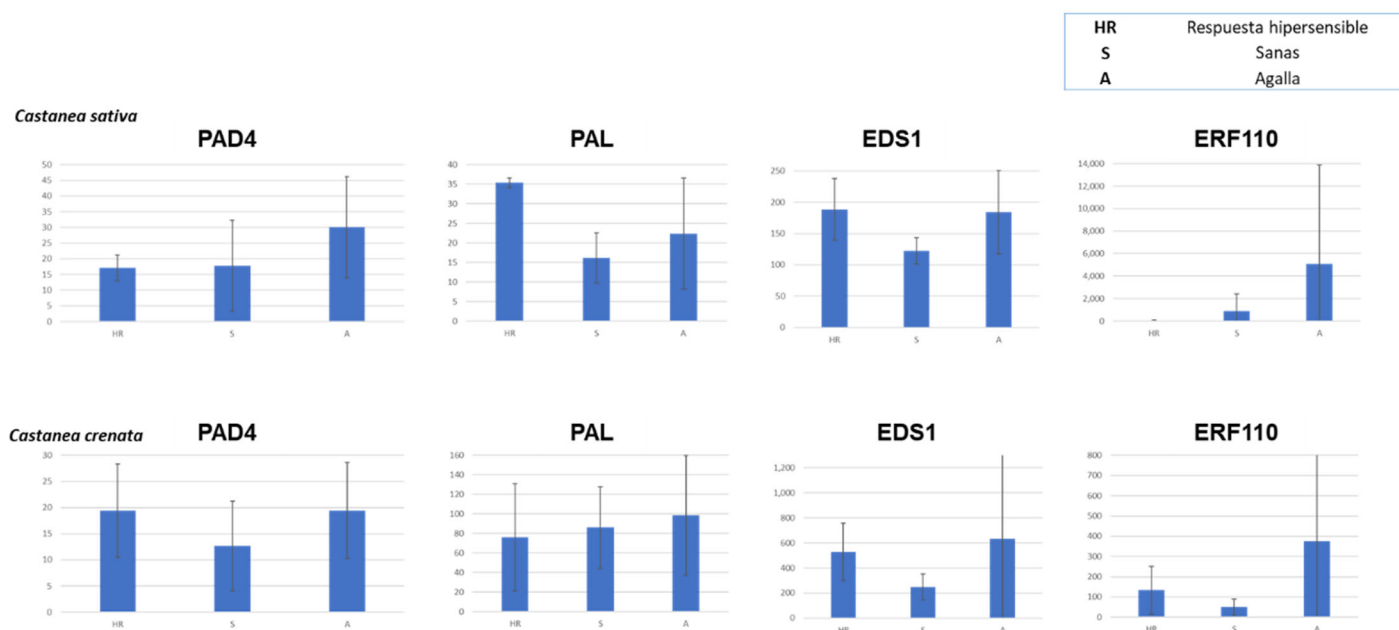
El hecho de que un grupo de genes esté implicado en la síntesis de ácido salicílico nos confirma que la ruta metabólica empleada por el castaño en su defensa contra la avispa es la ruta del ácido salicílico.

El Ácido salicílico parece jugar un papel esencial en la ruta de transducción de señales que conduce a la activación de genes que codifican no solo proteínas PR, sino también el establecimiento de la respuesta hipersensible (RH), así como en la resistencia sistémica adquirida (RSA). La ruta metabólica del ácido salicílico es empleada generalmente por las plantas contra organismos biotrofos, que necesitan tejidos vivos para desarrollarse. En el caso de la avispa el insecto necesita tejidos vivos para poder inducir la formación de agallas dentro de la yema del árbol y permitir así que las larvas puedan desarrollarse en su interior.

Dado que la ruta del salicílico es determinante en la respuesta de defensa del castaño resistente frente a la avispa, se seleccionaron los siguientes genes para la validación por PCR cuantitativa: los implicados en la síntesis (PAL); en el reconocimiento de efectores patógenos y activación de la ruta del salicílico (PAD4 & EDS1); y en la coactivación de la respuesta de defensa mediada por el etileno contra patógenos necrotrofos (ERF110):

- *Quercus robur* phenylalanine ammonia-lyase PAL (LOC126691855)
- *Quercus robur* lipase-like PAD4 (LOC126701396)
- *Quercus lobata* protein EDS1B-like (LOC115963413)
- *Quercus lobata* ethylene-responsive transcription factor ERF110-like (LOC115995189)

Los genes seleccionados no son activados en castaños susceptibles. ¿En qué momento son estos genes activados en los castaños resistentes? Para responder a esta pregunta, se ha comprobado el nivel de activación en los castaños parentales: *Castanea crenata* y *C. sativa*.



**Figura 6.** Resultados de PCR cuantitativa para los genes seleccionados en los castaños parentales: *Castanea crenata* y *C. sativa*. Las barras muestran la desviación estándar entre los tres grupos utilizados para cada experimento.

Los resultados de PCR cuantitativa muestran cierto grado de variabilidad, posiblemente debido a que se han utilizado grupos de muestras para incrementar la robustez del experimento. A pesar de la desviación estándar, se observa un patrón diferente de activación entre los castaños de las especies *C. crenata* y *C. sativa*, y las diferencias más evidentes se encuentran en ERF110.

Se ha demostrado que las vías de señalización mediadas por salicílico y etileno/jasmonico son esenciales para la respuesta inmune de las plantas contra los invasores

bióticos. En general, la respuesta de defensa mediada por salicílico juega un papel central en la resistencia adquirida (SAR) local y sistémica contra los patógenos biotróficos, que colonizan entre las células huésped al producir estructuras que absorben nutrientes mientras mantienen vivo al huésped. La respuesta mediada por etileno/jasmonico contribuye a la defensa contra los patógenos necrotróficos, que invaden y matan a los huéspedes para extraer sus nutrientes. Las vías de respuesta de defensa mediadas por salicílico y etileno/jasmonico son mutuamente antagónicas.

### **Tarea 1.3. Identificación del elicitor.**

Una vez identificada la ruta del salicílico como responsable del mecanismo de defensa se opta probar como elicitor una sal derivada del ácido salicílico, el Sodium Salicilato. Este compuesto está disponible comercialmente, y se ha utilizado con anterioridad para inducir una respuesta defensiva en plantas (Bab et al. 2014, Ham et el 2023).

**OBJETIVO 2. CONOCER LA CAPACIDAD DE ACTIVAR LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN FRENTE A LA AVISPILLA DE LAS PRINCIPALES VARIEDADES GALLEGAS DE MODO NATURAL Y TRAS LA APLICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS IDENTIFICADAS.**

*Este objetivo se ha conseguido en un 60 %: hemos obtenido datos representativos en las plantas madre de clones híbridos, pero la caracterización de las variedades se han ha conseguido solo en parte.*

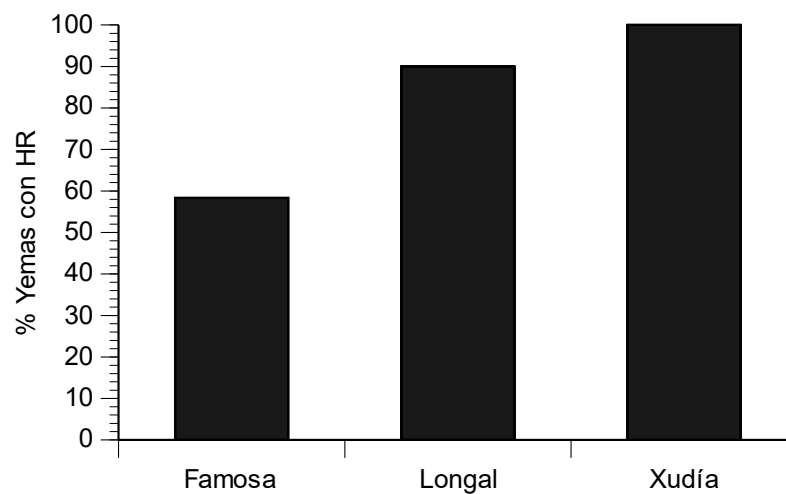
### **Tarea 2.1. Caracterizar la respuesta de las variedades autóctonas gallegas a la avispa.**

Este objetivo se ha visto limitado por el bajo nivel de ataque de avispa en campo durante los años 2023 y 2024, lo que dificultó los ensayos de inoculación de las variedades y los pies madres de los viveros.

En 2023 en el vivero de Maceda de TRAGSA se infestaron con avispa en condiciones controladas de vivero, 5 plantas de once variedades de castaño de interés comercial en Galicia: Amarelante, Blanca, De Parede, Famosa, Garrida, Inxerta, Longal, Negral, Rapada, Ventura y Xudía así como dos variedades de *Castanea sativa*, Pugnenga y Savoye, de origen italiano y francés respectivamente, conocidas por su resistencia. La inoculación se hizo añadiendo directamente agallas de avispa a los invernáculos que contenía cada variedad aisladamente. Sin embargo, por distintos motivos el número de hembras emergentes fue muy inferior a los esperado, por lo que el nivel de ataque resultante fue muy bajo.

En el mes de diciembre se recogieron todas las yemas de cada una de las 5 plantas de cada variedad que se llevaron al laboratorio donde fueron diseccionadas bajo lupa binocular para determinar si estaban atacadas y cuantificar las yemas con síntomas HR, compatible con la presencia de una mancha de tejidos necróticos en su interior y aquellas en las que se estaban

desarrollando agallas. Se detectó un número representativo de yemas atacadas en 3 de las variedades analizadas: Famosa, Longal y Xudía (Figura 7).

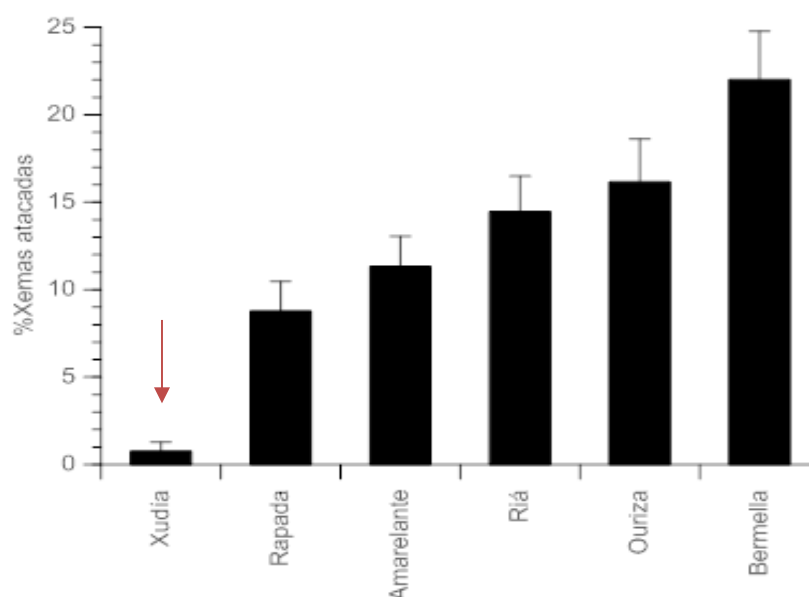


**Figura 7:** Porcentaje de yemas en las que se produce una respuesta hipersensible (HR) para tres variedades gallegas.

Estas tres variedades presentan un porcentaje de yemas capaces de producir HR que oscila entre un 59% en Famosa hasta un 92 % en Xudía. Existe una buena correlación entre los resultados obtenidos y los datos de nivel de ataque de estas variedades tanto en campo como en laboratorio.

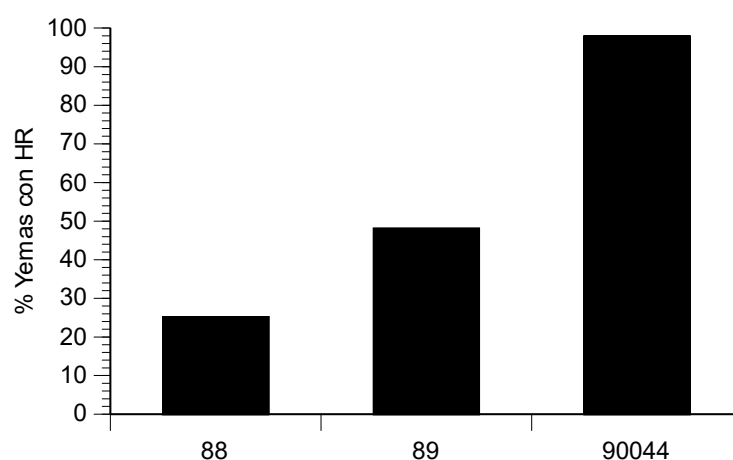
Xudía es la variedad que tiene una mayor capacidad de respuesta con más del 90 % de las yemas produciendo HR y por tanto matando al insecto en su interior. Esto es consecuente con lo pocos ataques observados en campo en esta variedad. La Figura 8 muestra los niveles de ataque de esta variedad en un estudio sobre susceptibilidad a la avispa de las variedades de la Ribeira Sacra (Álvarez, 2020). Tal y como se puede observar el nivel de ataque de esta variedad en campo es muy inferior al de otras variedades estudiadas de la zona.

Por su parte Longal ocupa una posición intermedia y Famosa muestra la menor capacidad de defensa contra la avispa de las tres. Estas dos variedades han sido clasificadas por Miguez et al. (2018) como elevada resistencia la avispa en el caso de Longal y resistencia media en el caso de Famosa, lo que coincide con su capacidad para producir HR y por tanto causar la muerte del insecto en las yemas y eso se manifiesta en un menor ataque en la copa.



**Figura 8.** Nivel de ataque en campo de 6 variedades de castaño que se cultivan en la zona de la Ribeira Sacra

Un ensayo similar se hizo con los pies madre de híbridos del vivero Boibel. En este caso la inoculación se hizo en tres clones en el verano de 2023: 88, 89 y 90044. En el mes de diciembre se recogieron las yemas en el vivero y se diseccionaron bajo lupa binocular un total 1,116 yemas: 267 del clon 88, 393 del 89 y 506 del 90044. El clon 90044 es el que nuestra una capacidad mayor de producir HR contra la avispa (Figura 9) lo que se corresponde con la total ausencia de agallas de esta especie en las plantas de campo. Sorprende sin embargo el bajo número de yemas con respuesta en los clones 88 y 89 con relación a los valores observados para esos mismos clones en estudios anteriores, valores que ascendían a 76,9% y 73,3 % de yemas con HR para el clon 88 y 89 respectivamente (Figura 9). Quizá estos resultados estén relacionados con el bajo nivel de población de la avispa y como consecuentemente el bajo nivel de ataque de las plantas como comentaremos posteriormente.



**Figura 9.** Porcentaje de yemas que responden con una HR ante un ataque de avispa en los híbridos estudiados en el vivero de Boibel

## Tarea 2.2. Cuantificación de HR de las variedades gallegas tras aplicación de elicitores

En julio de 2024 se volvieron a infestar las mismas variedades en el vivero de Maceda de TRAGSA, pero esta vez, 10 plantas de las once variedades de castaño de interés comercial en Galicia: Amarelante, Blanca, De Parede, Famosa, Garrida, Inxerta, Longal, Negral, Rapada, Ventura y Xudía, así como de las dos variedades de origen francés Pugnenga y Savoye.

La infección de variedades en el vivero de Hifas Foresta no fue posible por problemas en la emergencia de los insectos. Hifas Foresta recogió en la última semana de junio alrededor de 600 agallas en la zona de Lalín y Monterroso y en la primera semana de agosto alrededor de un millar.



**Figura 10.** Recogida de agallas en diferentes plantaciones en Lalín y Monterroso

Todas las agallas recolectadas fueron transportadas en frío durante el viaje en el vehículo y nada más llegar al destino se prepararon para la salida y captura de los adultos. Una parte de las agallas se introdujo en botes de vidrio tapados con un pequeño trozo de malla antitrips, la otra parte se introdujo en cajas de cartón, a las cuales se les recortaron unas salidas directas a tubos Falcon. De esta manera la luz atrae a las avispias emergentes y se capturan de manera sencilla. Se introdujo también un trozo de papel absorbente que se humedecía cada día.

A pesar de todos estos cuidados, al cabo de entre dos o tres semanas las agallas se resecaban y se endurecían, obteniendo de todas las recogidas un total de 10 avispias adultas.

Al no obtener insectos suficientes, se repitió el proceso un mes después, momento en el que las avispias estaban emergiendo por lo que no sería necesario que las agallas pasaran tiempo en los recipientes y se esperaba que la emergencia fuera en los siguientes días a la recogida de agallas. Se obtuvieron de nuevo muy pocas avispias adultas, por lo que no se pudo llevar a cabo la infestación. Se desconoce el motivo por el cual en estos casos las avispias no salieron, pues siguiendo el mismo protocolo en la USC sí se obtuvieron adultos suficientes.

En el caso de TRAGSA, se recogieron más de 4000 agallas en el mes de julio y agosto, en las mismas zonas, que se colocaron en cajas de cría de cartón en un lugar fresco y con luz (Figura 12). Diariamente se revisaban los tubos Falcon para recoger los adultos emergidos que se iban soltando en los insectarios, con el objetivo de soltar en proporción de un insecto por yema. Solo se obtuvieron 389 insectos, con lo que no se alcanzó el objetivo y el nivel de infección conseguido, por tanto, fue muy bajo.



**Figura 11.** Evolucionarios en los que se colocaron las agallas en Hifas Foresta



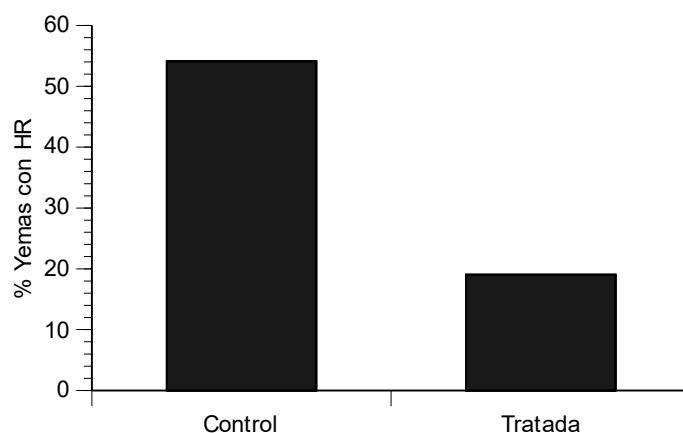
**Figura 12.** Cajas de cría en el Vivero de TRAGSA. Cada caja contenía 100 agallas

En 5 plantas de cada variedad se aplicó el elicitor seleccionado, Sodium salicilate a la dosis de 5 mM que fue la que dio mejores resultados en el ensayo de dosis (ver resultados del objetivo 3). La aplicación del elicitor se hizo en septiembre 50 días después de la inoculación, tiempo necesario para la eclosión de los huevos cuando los huevos (ver objetivo 3). A los 5-6 días se hizo una segunda aplicación del elicitor a la misma dosis. Las otras 5 plantas de cada variedad permanecieron como control. Las plantas control tenían una doble finalidad: por un lado, nos permiten ver diferencias de respuesta de las yemas con las plantas tratadas, y por otro nos permiten complementar el ensayo del año anterior y caracterizar la capacidad de respuesta natural de las distintas variedades. Todas las yemas de las plantas de ensayo se recogieron a principios de octubre y se diseccionaron en laboratorio bajo lupa binocular. Se diseccionaron 2.596 yemas de las cuales solo estaban atacadas 27 y 24 de ellas de pertenecían a la variedad Famosa. El nivel de ataque observado en estas yemas fue incluso inferior al del año anterior, probablemente, una vez más, debido al bajo nivel de emergencias de las agallas recogidas para inocular dichas plantas.

En el caso de la variedad Famosa, no se encontraron diferencias entre plantas tratadas con el elicitor y las plantas control no tratadas (Figura 14). El nivel de respuesta de las plantas control se mantiene respecto al año anterior, pero baja en las plantas tratadas con el elicitor. Esto puede estar relacionado con el nivel de ataque de las plantas. Solo 6 plantas mostraron ataques: 3 del grupo control y 3 del grupo tratados, pero una de las plantas tratadas tenía una única yema atacada, con una agalla en desarrollo en su interior, resultando un 0% de yemas con HR lo que arrastra la media a valores más bajos.



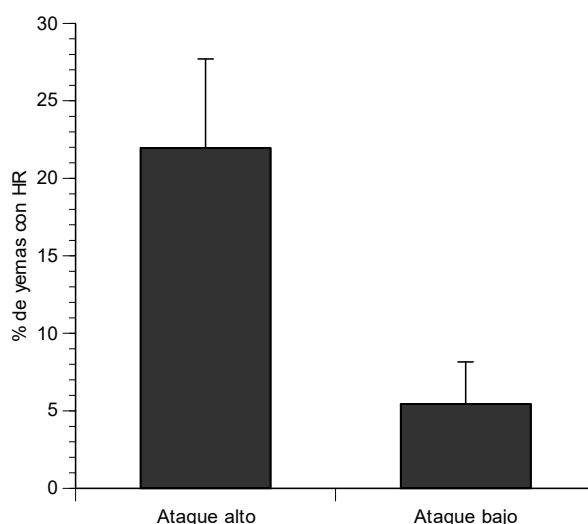
**Figura 13.** Insectarios montados en TRAGSA con separaciones para individualizar las variedades. En cada una de las separaciones se soltaron avispillas proporcionalmente al número de yemas que presentaban las plantas



**Figura 14.** Porcentaje de yemas que responde con HR en plantas de la variedad Famosa inoculadas con avispa con y sin tratamiento con el elicitor.

Estos resultados y los observados en el apartado anterior nos hace pensar que quizá el nivel de ataque del árbol esté relacionado con la capacidad de respuesta de la planta. Las defensas inducidas son costosas para la planta y supone una inversión de recursos. Es posible que las plantas recurran a este mecanismo de defensa solo cuando lo consideren necesario.

Para comprobar esto realizamos un nuevo muestreo recogiendo 1.106 yemas de 42 árboles con ataque intenso y 816 de 18 árboles con ataques bajos. Las yemas fueron diseccionadas para contabilizar cuantas producían HR. Los resultados muestran que efectivamente los árboles con niveles más altos de ataque presentaban también un nivel más alto de respuesta inducida (Figura 15).

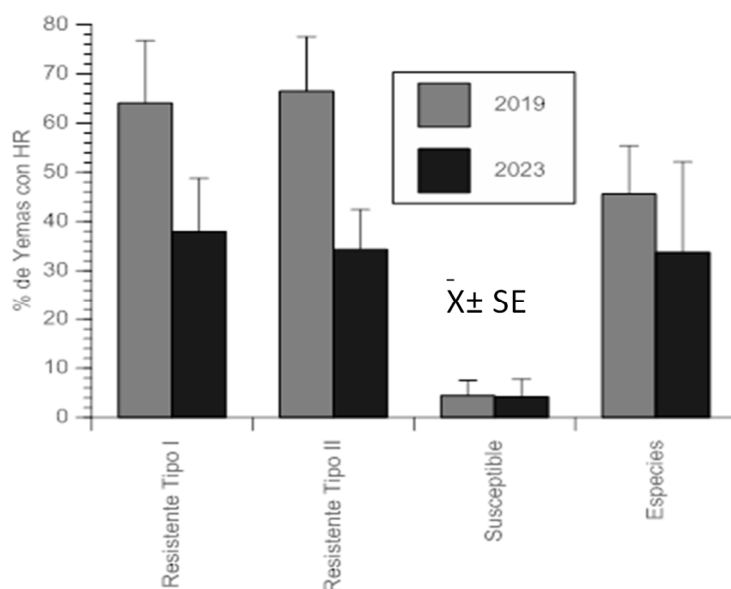


**Figura 15.** Porcentaje de yemas que responde en las que se observa HR en función del nivel de ataque del árbol

Para una segunda confirmación se volvió a comparar los niveles de respuesta de los árboles que habíamos analizado en 2019, cuando el nivel de avispa en campo era muy alto,

con la respuesta de esos mismos árboles en del año 2023, cuando la población del insecto había descendido al control del parásito con el ectoparasitoide *Torymus sisenensis*, y observamos que la capacidad de respuesta de esos árboles también había descendido (Figura 16).

Por tanto, parece que el nivel de ataque influye en la respuesta de la planta; con niveles de ataque alto la respuesta inducida es más fuerte, con niveles de ataque bajo es mucho menor. Esto podría explicar los resultados observados, al menos en parte.



**Figura 16.** Porcentaje de yemas en las que se observa HR en los mismos árboles muestreados en 2019 y 2023

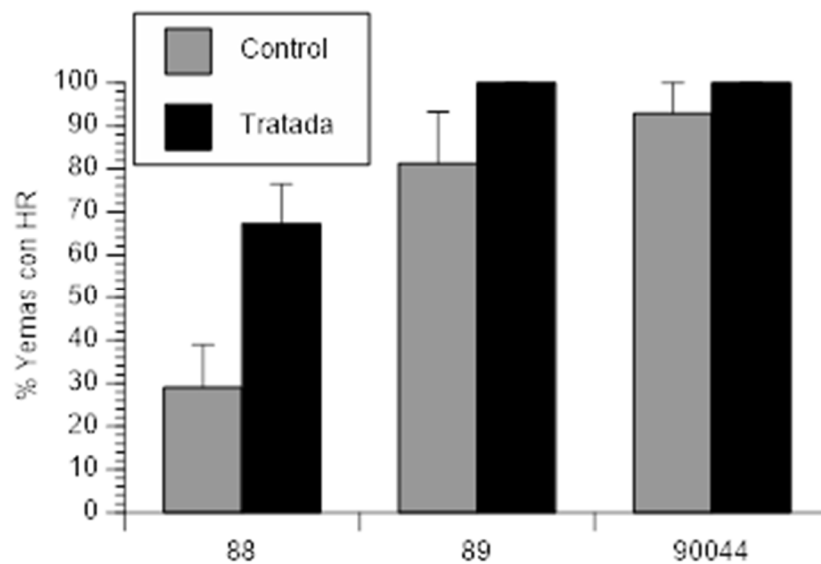
La eficacia del elicitor también se testó en un ensayo similar en esta anualidad con los mismos clones 88, 89 y 90044 del vivero de Boibel. Para ello el mes de julio de 2024 se recogieron 500 agallas de *Dryocosmus kuriphilus*, teniendo completado la recogida el 8 de julio. Se almacenaron en frío en nevera durante 15 días, para evitar la emergencia anticipada de los insectos. En todo los casos se comprobó con lupa si existía orificio de emergencia del insecto. En esos casos se rechazaba la agalla. De forma que todas las seleccionadas para el ensayo de inoculación, se correspondieran con insectos agallas viables.

Posteriormente se hizo la inoculación, mediante la suelta de los insectos en los clones de castaño objetivo, productores directos de castaña, los cuales se cubrieron con malla para evitar la salida de los insectos emergentes hacia el exterior. La inoculación se hizo el día 24 de julio de 2024. Las plantas también se dividieron en dos grupos: plantas tratadas y plantas control. La aplicación del elicitor y recogida de yemas se hizo en paralelo al seguimiento de las variedades.



**Figura 17.** Proceso de infestación con avispa de las cepas de acodo en el vivero de Boibel

En el caso de los híbridos, las plantas tratadas tuvieron una respuesta significativamente mayor que las plantas control (Figura 18). En este caso, el número de yemas atacadas ascendía a 150. En los clones 89 y 90044 la totalidad de las yemas atacadas respondieron con HR y en el clon 88 subió de un 29 a un 67 % de las yemas afectadas.



**Figura 18.** Porcentaje de yemas con respuesta hipersensible (HR) en clones híbridos con y sin aplicación del elicitor.

**OBJETIVO 3. CARACTERIZAR LA DOSIS Y CONCENTRACIÓN EXACTA DE LOS ELICITADORES DEPENDIENTE DE LA VARIEDAD, DETERMINAR EL MOMENTO ÓPTIMO DE APLICACIÓN Y PROMOVER SU DESARROLLO A NIVEL COMERCIAL.**

*Este objetivo no se ha conseguido en su totalidad, puesto que ha quedado pendiente el ensayo del elicitor en condiciones de campo.*

#### **Tarea 3.1. Determinación de dosis adecuada**

A principios del mes de julio de 2023 se procedió a recoger agallas en campo para realizar inoculaciones en los árboles de estudio para asegurar que las yemas estaban atacadas (Figura 19). Las agallas se mantuvieron en cámaras hasta la emergencia de los adultos.

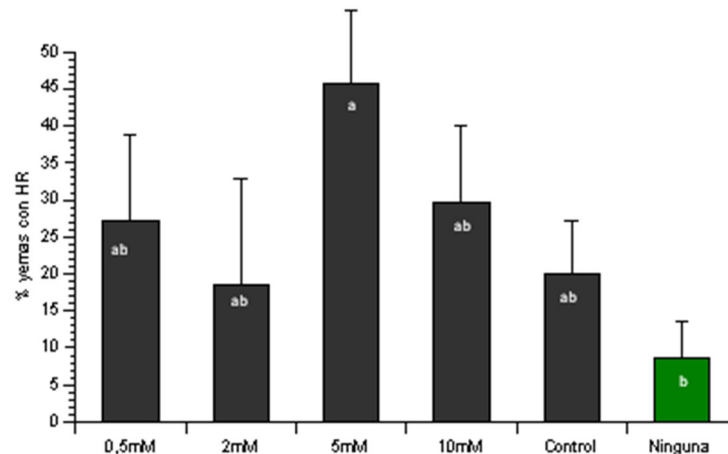
El 26 de julio, se inocularon 5 ramillos en 8 árboles donde se iba a ensayar el elicitor para asegurar el ataque y en otros 3 árboles diferentes en los que no se aplicó (true control). La inoculación se hizo por enjaulamiento de hembras recién emergidas en los ramillos seleccionados (Figura 19). Una semana más tarde se retiraron las bolsas, los ramillos permanecieron etiquetados con el número del árbol y la dosis que se iba a aplicar. Aparte se hicieron inoculaciones también en ramas control de otros 3 árboles diferentes en los que no se planea usar el elicitor por si se produjese una respuesta sistémica en toda la planta como consecuencia del elicitor.



**Figura 19.** Ensayo de dosis del elicitor. La figura muestra las ramas que fueron inoculadas en julio para asegurar el ataque del insecto en las yemas en las que se iba a aplicar el elicitor.

El 11 de septiembre se aplicaron las dosis 0.5 mM SA, 2mM SA, 5 mM SA y 10 mM SA de **Sodium salicilato** con un vaporizador en 4 de los ramillos de cada árbol estudiado, y el 5º ramillo inoculado permaneció como control. Se decidió ensayar las 4 dosis en los mismos árboles para evitar diferencias debidas a las características genéticas de las plantas, pero necesitábamos otros árboles no tratados (true control) por si había una respuesta sistémica en las plantas que interfiriese que afectase también a los controles. El 16 de septiembre se repitió el tratamiento sobre los mismos ramillos con las mismas dosis.

A mediados de octubre se recogieron los ramillos y se las yemas se diseccionaron bajo lupa binocular.



**Figura 20.** Porcentaje de yemas que respondieron con HR. En verde se muestran los árboles en los que se inoculó la avispa pero no se aplicó elicitor.

No se observaron diferencias significativas entre dosis ni con los ramillos control (en negro en la figura 20) por lo que no podemos descartar que se produjera una reacción sistémica en la planta. Sin embargo, la dosis de 5mM consiguió una respuesta significativamente mayor que los ramillos de árboles inoculados, pero no expuestos al elicitor. Esta fue la dosis seleccionada para el ensayo.



**Figura 20.** Quemaduras observadas en las hojas de algunos ramillos tratados con la dosis de 10mM.

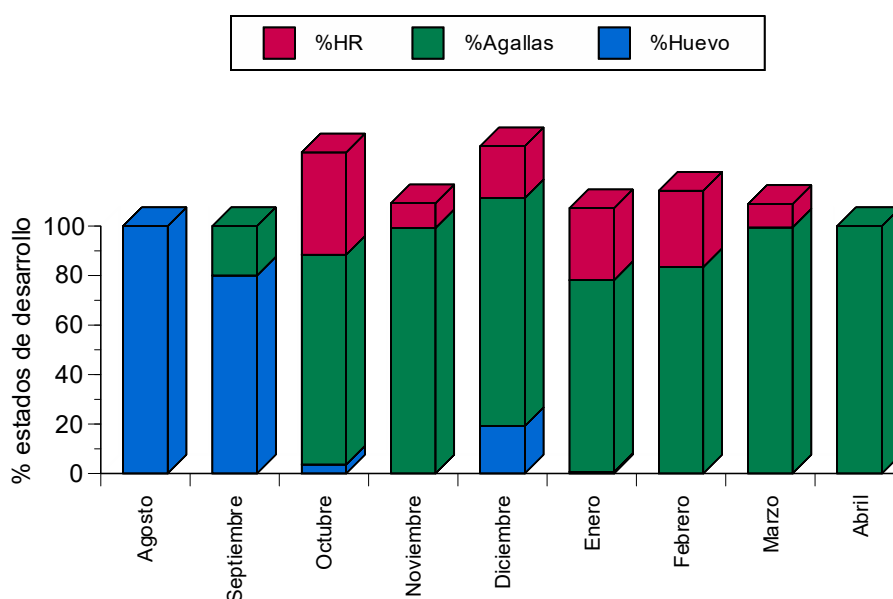
La dosis de 10mM parece causar algunas quemaduras en las plantas por lo que se descartó (Figura 16).

En 2024 se realizó un segundo ensayo de dosis en los mismos términos y una vez más, aunque no hubo diferencias significativas entre dosis, la que mejor resultados dio fue de nuevo la de 5mM con un 69,2 % de yemas con HR.

### Tarea 3.2. Determinar el momento de aplicación del elicitor en campo

Una duda que se nos planteó desde el primer momento era saber cuándo se produce la respuesta hipersensible (HR) en plantas, ya que no sabíamos si se producía contra los huevos en el momento de la oviposición de las hembras, o contra las larvas tras la eclosión de los huevos.

Para clarificar este punto se realizaron muestreos mensuales de ramillos de árboles resistentes en campo y se diseccionaron en laboratorio, para detectar la mancha necrótica característica y consecuencia de la muerte de los tejidos causadas por la respuesta defensiva de la planta.



**Figura 21.** Evolución mensual de la presencia de HR identificada por la presencia de tejido necrótico entorno a la puesta.

Tal y como se muestra en la Figura 21, las primeras manchas necróticas (HR) se producen en octubre, coincidiendo con los 40-50 días que precisan los huevos para eclosionar y por tanto la respuesta se produce contra las larvas. Ello sugiere que la aplicación del elicitor debe de realizarse unos 40-50 días después de la puesta. Algunas yemas pueden ser visitadas por más de una hembra por lo que pueden contener a la vez HR, huevos o agallas. De ahí que el porcentaje de los estados de desarrollo observados en su interior en ocasiones supere el 100%.

## CONCLUSIONES

- Se han identificado 350 genes implicados en los mecanismos de defensa contra la avispa
- Se ha identificado la ruta del salicílico como una vía metabólica esencial implicada en este proceso
- En consecuencia, se ha ensayado como elicitador un derivado comercial sodium salicilato
- La dosis de uso recomendada de este producto es de 5 mM
- Hemos probado que la HR se produce contra las larvas en el momento de la eclosión de los huevos, por tanto la aplicación del elicitador debe hacerse unos 40-50 días después de la puesta del insecto
- El elicitador aumentó significativamente la respuesta en castaños híbridos
- No tenemos datos conclusivos con las variedades de castaño por un problema experimental debido al bajo nivel de ataque de las plantas ensayadas
- La respuesta de la planta depende del nivel de ataque
- Esto tienen sentido porque las respuestas inducidas son costosas para la planta y parece necesitar alcanzar un cierto umbral de estimulación (ataque) para responder.

## REFERENCIAS

- Álvarez, M. 2020. Susceptibilidad das variedades de castiñeiro da Ribeira Sacra a *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu. Proyecto fin de grado USC.
- Babb M.E., Kang C.H., Brinkman M.A., Lee, C. . 2014. Argentine Worker Ant (Hymenoptera: Formicidae) Mortality Response to Sodium Salicylate and Sodium Cinnamate. *Journal of Entomological Science*, 49 (4): 342-351.
- Bianco L., Fontana P., Marchesini A., Torre S., Moser M., Piazza S. et al. 2024. The de novo, chromosome-level genome assembly of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Cv. Marrone Di Chiusa Pesio. *BMC Genomic Data* 25(1):64. <https://doi.org/10.1186/s12863-024-01245-7>
- Han A., Wang C., Li J. Xu L., Guo X., Li W., Zhou F., Liu, R. 2023. Physiological mechanism of sodium salicylate and folcisteine on alleviating salt stress in wheat seedlings. *Scientific Report*, 13 (1):22869.
- Lombardero, M.J., Ayres, M.P., Álvarez-Álvarez, P., Castedo-Dorado, F. 2022. Defensive patterns of chestnut genotypes (*Castanea* spp.) against the gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus*. *Frontiers in Forests and Global Change* 5:1046606. doi: 10.3389/ffgc.2022.1046606

## TRASFERENCIA DE RESULTADOS

### COMUNICACIONES A CONGRESOS:

- Cuenca B., Orosa B. Alonso C., Romay-Río M.F., Veloso J., Martínez P., Lombardero M.J. 2023. Genes activated during the defensive response of resistnat chestnut genotypes against *Dryocosmus kuriphilus*. VII International Chestnut Symposium. Lugo, Fecha: 26-29 de Junio de 2023
- Romay-Río M.F, Martínez P., Alonso C., Veloso J., **Lombardero M.J.**, Cuenca B., Orosa B. 2024. Genes activados durante la respuesta defensiva de castaños resistentes a *Dryocosmus kuriphilus* V Reunión de Sanidad Forestal (SEF). Albacete, 19-21 de junio de 2024
- Lombardero M.J., Alonso C., Romay-Río M.F., Veloso J., Cuenca B., Martínez P., Orosa B. 2024. Chestnut defense genes against the invasive gall maker *Dryocosmus kuriphilus*. IUFRO World Congress. Estocolmo. Suecia, 23-29 de junio de 2024
- 

### PRESENTACIONES EN JORNADAS TÉCNICAS:

- Cuenca Valera B., Lombardero M.J., Orosa B. 2022. Presentación del Grupo Operativo Delicas. Desarrollo de elicitores (sustancias naturales o minerales) de defensa del castaño del país. BIOCASTANEA. Jornadas Científico-Técnicas. Ponferrada, 17-18 de noviembre 2022
- Lombardero, M.J. 2024. Interacciones entre la especie invasora *Dryocosmus kuriphilus* y el castaño en Galicia. I Jornada Técnica. Laboratorio Nacional de Sanidad Vegetal (INSC - MAPA)- Campus Terra Universidad de Santiago de Compostela. Lugo, Fecha: 19 de marzo de 2024.
- Lombardero, M.J. 2024. Desenvolvemento de elicitadores de defensa no castiñeiro do país. Castiñeiro Arte e Investigación na Escola Politécnica Superior de Enxeñaría. Campus Terra Universidad de Santiago de Compostela. Lugo, 6 de novembro de 2024.
-