

1 VARIACIÓN NOS CONDUTOS RESINÍFEROS EN PIÑEROS CON DIFERENTE SUSCEPTIBILIDADE AO NEMATODO DO PIÑEIRO



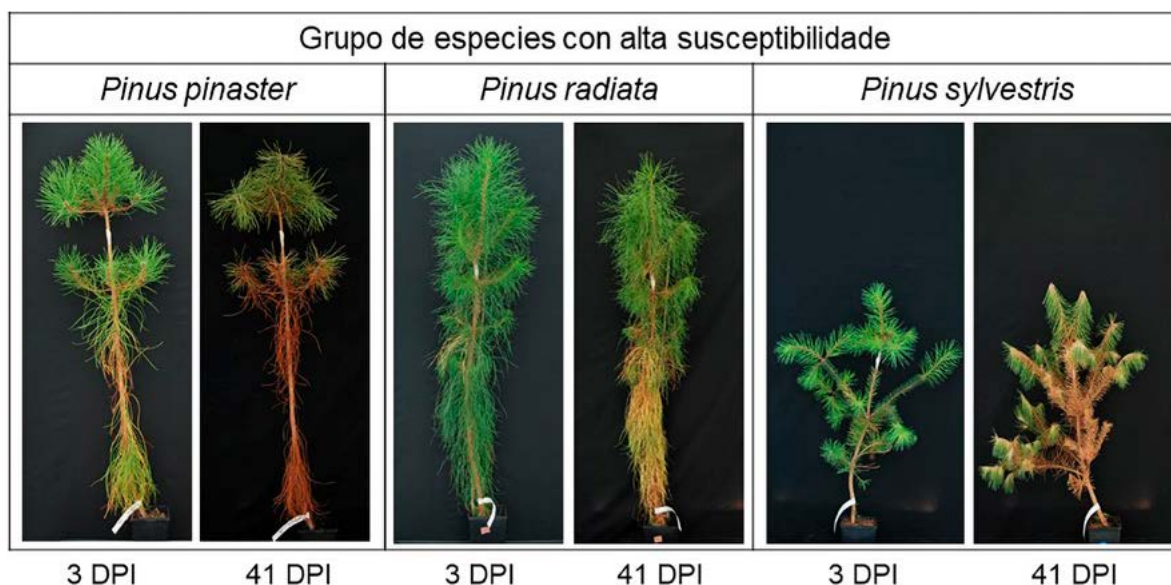
O nematodo do piñeiro (*Bursaphelenchus xylophilus*), orixinario de Norteamérica, está considerado unha grave ameaza para os bosques de Europa e Asia, por ser o causante dun forte marchamento nos piñeiros fóra da súa área de orixe. Este nematodo foi detectado en Europa por primeira vez en 1999 en Portugal (península de Setubal), desde onde se estendeu a todo o país. A primeira detección en España tivo lugar en 2008, en Cáceres, e posteriormente detectáronse novos focos en Pontevedra e en Salamanca. Actualmente, o nematodo está confinado a estas áreas, pero todo apunta a que a enfermidade se podería facilmente estender ao resto de España e mesmo a Francia. Cómpre lembrar que o nematodo do piñeiro está declarado **patóxeno en corentena na Unión Europea**.

Nos piñeiros (*Pinus* spp.) e noutras coníferas, o principal mecanismo de defensa fronte aos patóxenos, axentes abióticos ou feridas mecánicas, é a produción de resina. Esta substancia, unha mestura complexa de compostos volátiles

(monoterpenos e sesquiterpenos) e non volátiles (ácidos diterpenos), sintetízase e almacénase nunhas estruturas da planta chamadas **condutos resiníferos** ou canles resiníferas.

Os piñeiros presentan na madeira e na casca unha ampla rede de condutos resiníferos interconectados —tanto axial como radialmente— que supoñen unha primeira liña de defensa fronte aos ataques ou perturbacións (condutos resiníferos constitutivos). Como segunda liña de defensa ante un ataque, estímase a produción de resina e fórmanse novos condutos resiníferos (condutos resiníferos traumáticos).

O nematodo do piñeiro transmítese cando uns escaravellos (*Monochamus galloprovincialis* é o único vector coñecido en Europa) se alimentan do floema de piñeiros sans ou depositan os ovos en piñeiros xa deteriorados. Un estudo recente puxo de manifesto que a presenza de condutos resiníferos máis anchos podería favorecer a dispersión do nematodo no interior do piñeiro,



Cambios nos síntomas observados nas especies de alta susceptibilidade 3 e 41 días tras a inoculación (DPI, días post-inoculación) co nematodo da madeira do piñeiro. As especies de baixa susceptibilidade non mostraron cambios

e aumentar así a súa susceptibilidade á enfermidade.

O obxectivo deste traballo foi investigar a relación entre as características anatómicas dos condutos resiníferos constitutivos de varias especies de piñeiro e a súa susceptibilidade ao nematodo. Un segundo obxectivo foi comprobar se a infección do nematodo inducía á formación de novos condutos ou a un cambio no seu diámetro.

Metodoloxía e deseño experimental

• Clasificación dos piñeiros segundo a súa susceptibilidade ao nematodo

Os investigadores clasificaron os piñeiros en dous grupos segundo a susceptibilidade ao nematodo mostrada en estudos previos:

- Grupo de baixa susceptibilidade: *P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. pinea* e *P. taeda*;
- Grupo de alta susceptibilidade: *P. pinaster*, *P. radiata* e *P. sylvestris*.

• Inoculación e cuantificación do nematodo

As sementes de 7 especies de piñeiro antes mencionadas foron sementadas nun invernadoiro a 22,5 °C e regadas dúas veces por semana. Cando as plantas acadaron unha media de 69-138 cm de altura, inoculáronse con 300 µl dunha suspensión que contiña 600 nematodos (illado procedente das Neves e cultivado no laboratorio sobre un cultivo de *Botrytis cinerea* en medio PDA), que foi introducida nun corte lonxitudinal feito no talo da planta.

O deseño experimental foi de bloques completos aleatorios, con 4 repeticións para cada un dos seguintes 3 tratamentos:

- Plantas inoculadas cunha suspensión de nematodos

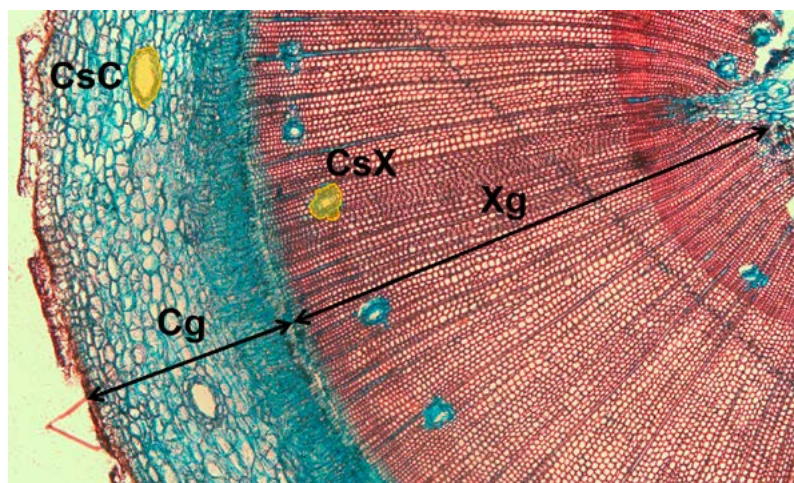
- Plantas inoculadas con auga
- Plantas non inoculadas (control)

Os nematodos foron cuantificados 42 días post-infección mediante a técnica do funil de Baermann modificada. A súa presenza cuantificouse por separado nas diferentes partes da planta e expresouse como *densidade de nematodos* no talo, nas raíces ou na planta enteira.

• Observación das características anatómicas e morfolóxicas ao microscopio óptico

Para a observación anatómica, os investigadores empregaron segmentos da planta cortados 5 cm por riba da zona onde tivera lugar a inoculación do nematodo, que á súa vez foron cortados transversalmente cun grosor de 20-30 µ coa axuda dun microtomo. Previamente á observación, estas mostras que contiñan os tecidos correspondentes ao córtex, ao xilema e á medula foron tinguidas cunha solución de safranina (1 %) e azul alcían (1 %), montadas e deshidratadas. Os investigadores mediron os seguintes parámetros:

- Variables do crecemento radial: crecemento do córtex e do xilema
- Variables do crecemento axial: tamaño dos condutos no córtex e no xilema; frecuencia dos condutos no córtex e no xilema; e área dos condutos no córtex e no xilema.



Sección transversal dunha plántula de *Pinus halepensis* tinguida con safranina (vermello) e azul alcían (azul). Variables medidas que se mostran na figura: crecemento do xilema (Xg), crecemento do córtex (Cg), tamaño dos condutos no córtex (CsC) e tamaño dos condutos no xilema (CsX)

Relación entre as características anatómicas constitutivas e a susceptibilidade ao nematodo

Os investigadores atoparon unha variación significativa nas características anatómicas dos piñeiros pertencentes aos dous grupos de sensibilidade ao nematodo. O grupo de alta susceptibilidade ao nematodo (*P. pinaster*, *P. radiata* e *P. sylvestris*) amosou un maior crecemento do xilema e un maior tamaño dos condutos resiníferos do córtex, así como unha menor frecuencia dos condutos resiníferos do córtex e un menor tamaño dos condutos resiníferos do xilema, que o grupo de baixa susceptibilidade (*P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. pinea* e *P. taeda*).

Características anatómicas inducidas pola inoculación do nematodo

A inoculación co nematodo afectou principalmente as características anatómicas do xilema. En concreto, a frecuencia dos condutos resiníferos do xilema e a área do xilema ocupada por condutos resiníferos foron significativamente maiores nas plántulas inoculadas co nematodo que nas plántulas inoculadas só con auga.

Os autores tamén observaron unha interacción significativa entre o tratamento e o grupo de susceptibilidade para estes dous últimos parámetros. Así, nos dos piñeiros do grupo de alta susceptibilidade, a inoculación co nematodo producía condutos resiníferos máis pequenos pero máis abundantes que nas plantas inoculadas con auga; mentres que no grupo de baixa susceptibilidade, esta inoculación resultaba en condutos máis grandes, pero da mesma frecuencia que os das plántulas inoculadas con auga.

Relación entre as características anatómicas e a presenza de nematodos

O número de nematodos contabilizados nas plántulas inoculadas foi maior no grupo de alta susceptibilidade que no de baixa susceptibilidade. A porcentaxe de plántulas con presenza

de nematodos estivo significativamente correlacionada co crecemento do xilema. Cando os autores intentaron distinguir entre raíces e talo, a porcentaxe de plántulas con presenza de nematodos nas raíces estaba relacionada co tamaño dos condutos resiníferos no córtex; mentres que a porcentaxe de plántulas con presenza de nematodos no talo estaba, pola súa banda, correlacionada co diámetro deste.

Conclusións

O grupo de piñeiros con alta susceptibilidade presentou condutos resiníferos constitutivos no córtex máis anchos, así como unha maior frecuencia de condutos resiníferos no xilema tras a infección, en comparación co grupo de piñeiros de baixa susceptibilidade. Estes resultados apoian a teoría de que o tamaño dos condutos resiníferos constitutivos do córtex é un bo indicador da susceptibilidade ao nematodo, xa que inflúe na súa migración inicial. En cambio, as variables dos condutos constitutivos do xilema non se asociaron coa susceptibilidade, aínda que os cambios inducidos nos ditos condutos tamén poderían influír nela. As especies altamente susceptibles tenden a mostrar crecementos radiais maiores que as especies pouco susceptibles.

Non obstante, todas estas tendencias dos trazos anatómicos non determinan de forma concluínte a susceptibilidade ao nematodo, polo que deben existir outras características que tamén afecten a susceptibilidade, como, por exemplo, a complexa composición química do córtex, rico en fenois, nitróxeno, substancias liposolubles e cristais de oxalato cálcico.

Estes resultados, procedentes de experimentos de inoculación en condicións controladas de invernadoiro, deberán ser confirmados en estudos de campo, algo que os autores non puideron levar a cabo debido a que o nematodo do piñeiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, é un patóxeno en corentena en toda a Unión Europea.