

# TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AO NEMÁTODE DA MADEIRA DO PINHEIRO (*BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS*) - OPTIMIZAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO EM LARGA ESCALA

## Test de susceptibilidad del nemátodo de la madera de pino (*Bursaphelenchus xylophilus*): Optimización para su utilización a gran escala

Marta R. M. Lima<sup>1\*</sup>, Miguel Ramos<sup>1\*</sup>, Luis Sampedro Pérez<sup>2</sup>, Xoaquín Moreira Tomé<sup>2</sup>, Rafael Zas Arregui<sup>3</sup> e Marta W. Vasconcelos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CBQF-Centro de Biotecnología e Química Fina. Escola Superior de Biotecnología. Centro Regional da Universidade Católica Portuguesa. Rua Dr. António Bernardino de Almeida. 4200-072-PORTO (Portugal). Correo electrónico: mvasconcelos@porto.ucp.pt

<sup>2</sup> Centro de Investigación Forestal de Lourizán. Apdo. 127. 36080-PONTEVEDRA (España).

<sup>3</sup> Misión Biológica de Galicia (MBG). CSIC. Apdo. 28. 36080-PONTEVEDRA (España).

\* Primeira-autoria partilhada.

### Resumo

A doença da murchidão do pinheiro é uma doença grave que afecta florestas de coníferas com uma elevada taxa de mortalidade, sendo causada pelo nemátode *Bursaphelenchus xylophilus*. Dado que este organismo foi recentemente introduzido na Europa, é importante determinar o grau de susceptibilidade de espécies florestais autóctones ao nemátode. Neste trabalho optimizou-se um teste de susceptibilidade para utilização num grande número de amostras. O teste baseia-se na capacidade de nemátodes virulentos atravessarem secções de 5 cm de ramos jovens, com cerca de 2 cm de diâmetro. O processo de optimização passou pela forja de recipientes de dimensões adequadas, criação de um modo de sustentar os ramos em posição vertical, optimização do volume de água onde a base do ramo fica mergulhada e criação de um modo de evitar a desidratação do topo do ramo após inoculação. O crescimento dos nemátodes em laboratório também passou por um *scale-up* para obtenção de nemátodes em grande quantidade, passando do crescimento em tubos de ensaio para sacos. O teste foi optimizado usando ramos de *Pinus pinaster*, mas pode ser adaptado a outras espécies.

Palavras-chave: NMP, Doença da murchidão do pinheiro, Virulência do NMP

### Resumen

La seca súbita del pino es una grave enfermedad que origina una elevada tasa de mortalidad en las masas de coníferas debido al ataque por el nemátodo de la madera del pino *Bursaphelenchus xylophilus*. Dado que este organismo fue recientemente introducido en Europa, es importante determinar el grado de susceptibilidad de las especies forestales autóctonas al mismo. En este trabajo hemos optimizado un test in vitro de susceptibilidad al nemátodo para ser empleado con un gran número de muestras vegeta-

les. El test se basa en la capacidad de nematodos virulentos de atravesar secciones de 5 cm de longitud de ramillos jóvenes de pino de aproximadamente 2 cm de diámetro. El proceso de puesta a punto ha considerado el tamaño adecuado de recipiente, el sistema para la sujeción de los ramillos en posición vertical, el volumen de agua de la base del ramillo y el sistema adecuado para evitar la deshidratación de la parte distal del ramillo tras la inoculación del nemátodo. También hemos dimensionado el sistema de cultivo del nemátodo en laboratorio para la producción en masa de grandes cantidades de inóculo, pasando del cultivo en tubos de ensayo a cultivo en contenedor. El test fue aplicado a ramillos de *Pinus pinaster*, pero puede ser adaptado a otras especies.

Palabras clave: NMP, Enfermedad del marchitamiento del pino, Virulencia del NMP

## INTRODUÇÃO

A doença da murchidão do pinheiro é uma doença grave que afecta florestas de coníferas com uma elevada taxa de mortalidade. A enfermidade é causada pelo nemátode *Bursaphelenchus xylophilus*, conhecido como nemátode da madeira do pinheiro (NMP) (KIYOHARA & TOKUSHIGE, 1971; MAMIYA, 1988). Este organismo é originário da América do Norte, onde não está associado a uma elevada prevalência da doença. No entanto, o NMP foi introduzido no Japão no início do século XX, propagando-se depois para a China, Ilha Formosa e Coreia, demonstrando ser devastador para as espécies de coníferas autóctones do Extremo Oriente (MAMIYA, 1988; TOGASHI et al., 2004). Em 1999 o NMP foi detectado pela primeira vez na Europa, em Portugal (MOTA et al., 1999), mas apesar dos esforços para conter a doença, esta disseminou-se por todo o território português. Recentemente o NMP foi detectado em Espanha, sendo reconhecida na actualidade a sua presença no território da Galiza (Eppo, 2009; DXPA, 2010).

Nos países onde o NMP está associado a doença epidémica, os efeitos sociais e económicos são muito sérios, uma vez que a indústria da madeira dá emprego a milhares de pessoas (WEBSTER & MOTA, 2008). No entanto, apesar de décadas de investigação ainda não foi possível encontrar um tratamento eficaz para a doença da murchidão do pinheiro. Deste modo, e dado a introdução recente desta peste na Europa, é da mais alta importância identificar quais as espécies florestais autóctones de maior susceptibilidade e quais as tolerantes/resistentes. Tal informação é importante para o planeamento/gestão das florestas, mas também para o estudo da doença, sugerindo mecanismos de susceptibilidade/resistência. Neste trabalho, usou-se *P.*

*pinaster* para otimizar um teste de susceptibilidade para utilização num grande número de amostras, permitindo fazer o *screening* da susceptibilidade de diferentes árvores ao NMP. Este teste de susceptibilidade baseia-se na capacidade de nemátodes virulentos atravessarem pequenas secções de ramos jovens durante 24 h, e já tem sido usado trabalhos de investigação sobre a doença, mas apenas em pequena escala (OKU et al., 1989).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultura de nemátodes e scale-up

2 estirpes virulentas de *B. xylophilus* (BxHF e Bx8A) foram cultivadas em *Botrytis cinerea* crescido em grãos de cevada autoclavados. Os nemátodes foram extraídos usando a técnica do funil de Baermann (BAERMANN, 1917), contados com a ajuda de uma lupa, preparando-se uma solução com 10 nemátodes/ $\mu$ l em água desionizada estéril.

### Colheita de material vegetal

Colheram-se ramos jovens de *P. pinaster* (diâmetro 1-2 cm), de 90 árvores de uma plantação com aproximadamente 10 anos localizada em Lugo (Galiza, Espanha, 43,11° Norte; 7,89° Oeste). Imediatamente após a colheita, o material vegetal foi armazenado a 4°C em geleiras e enviado refrigerado (4°C) por correio expresso para o CBQF/ESB. Todas as amostras foram processadas dentro de um período de 36 h desde a colheita.

### Processamento de amostras e teste de susceptibilidade

Foram cortadas 5 secções de 5 cm de comprimento dos ramos correspondentes a cada árvore

(total 450 raminhos). Os raminhos foram lavados em água corrente e colocados durante 5 minutos num banho de ultrassons, sendo depois dispostos num sistema produzido *in-house*, em posição vertical, com a extremidade inferior mergulhada em água desionizada. A identificação dos extremos superior e inferior dos raminhos foi confirmada pela inspecção visual da posição das escamas da casca. A extremidade superior foi inoculada com 200 nemátodes, selando-se com parafilme para evitar dessecação. O sistema foi colocado no escuro a 25°C durante 24 h. Após 24 h de incubação, o número de nemátodes que migraram através dos raminhos até à água foram contados usando uma lupa.

#### Tratamento estatístico

Diferenças entre as árvores foram testadas por análise de variância, em que as 5 réplicas de cada árvore foram consideradas factores intra-individuais, usando o sistema SAS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de avaliação da susceptibilidade ao NMP foi desenvolvido por OKU *et al.* (1989) e baseia-se na capacidade de isolados de *B. xylophilus* atravessarem pequenas secções de ramos num período de 24 h, sendo este processo dependente quer da aptidão da estirpe de *B. xylophilus* para se dispersar, quer da habilidade do hospedeiro inibir a dispersão dos nemátodes

(MATSUNAGA & TOGASHI, 2009). Recentemente foi reportada a existência de uma variabilidade sazonal na capacidade de dispersão de diferentes isolados de nemátodes (MATSUNAGA & TOGASHI, 2009). Por outro lado, a capacidade de multiplicação de diferentes isolados de *B. xylophilus* mantidos no nosso laboratório também mostra ser variável ao longo do tempo. Tendo em conta estes factores, foi usada uma mistura de 2 isolados virulentos de *B. xylophilus*, para garantir que a inoculação dos raminhos era feita com uma carga de nemátodes suficientemente activos.

Os registos anteriores deste teste de susceptibilidade referem-se apenas a experiências em pequena escala, num pequeno número de raminhos entre 5 a 10 por experiência (MATSUNAGA & TOGASHI, 2009; OKU *et al.*, 1989; TOGASHI & MATSUNAGA, 2003). Para possibilitar a execução de um teste de susceptibilidade ao NMP em larga escala foi necessário fazer um *scale-up* da cultura de nemátodes. Em laboratório, os nemátodes são mantidos em *B. cinerea* crescido a 25°C em grãos de cevada autoclavados. Inicialmente usaram-se tubos de ensaio com 5 ml de cevada (Figura 1, esquerda), nos quais se deixou o fungo crescer durante 7 dias antes de adicionar uma pequena quantidade de nemátodes (3-4 grãos de cevada de uma cultura prévia). Ao fim de 5 dias todo o fungo tinha sido consumido sendo no entanto a quantidade de nemátodes obtida muito baixa para realizar um ensaio de susceptibilidade em larga escala. Cultivou-se então o fungo em caixas com 100 ml de cevada



**Figura 1.** Scale-up da cultura de *Bursaphelenchus xylophilus*, passando de tubos de ensaio com 5 ml de cevada (esquerda), para caixas com 100 ml de cevada (centro) e finalmente para sacos com 2 l de cevada (direita)

(Figura 1, centro) durante 7 dias, adicionando-se depois uma pequena quantidade de nemátodes. Após 7 dias praticamente todo o fungo tinha sido consumido, obtendo-se um alto número de nemátodes num único ciclo de crescimento. Finalmente, cultivou-se *B. cinerea* em sacos com 2 l de cevada (Figura 1, direita) durante 2 semanas antes de se adicionar os nemátodes (neste caso em maior quantidade do que anteriormente de modo a acelerar o ciclo de crescimento), conseguindo-se um número muito elevado de nemátodes ao fim de 2 semanas, e possibilitando assim a realização de testes de susceptibilidade em larga escala.

Para realizar o teste de susceptibilidade ao NMP, foi também necessário otimizar um sistema que permitisse manter os raminhos em posi-

ção vertical, com a extremidade inferior mergulhada em água. Para tal, foram usados tubos de centrifuga de 50 ml de fundo cónico graduados, com 2,9 cm de diâmetro. A altura do tubo foi ajustada até obter melhor posicionamento dos raminhos, o que foi conseguido cortando-se o tubo de centrifuga pela marca dos 15 ml. A quantidade de água a adicionar no fundo do tubo também foi otimizada de modo a manter a extremidade inferior dos raminhos mergulhada e, ao mesmo tempo, facilitar a contagem dos nemátodes que migravam através raminhos. Verificou-se que volumes muito grandes dificultavam a contagem dos nemátodes, enquanto volumes muito pequenos eram absorvidos pelo raminho deixando-o fora de água em poucas horas. O volume de água óptimo foi 3 ml. Para montar o

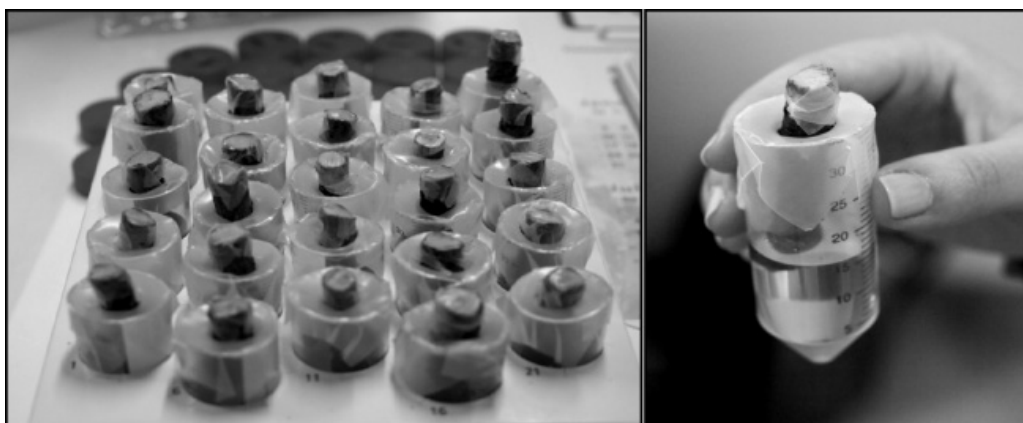


Figura 2. Sistema para realização do teste de susceptibilidade ao *Bursaphelenchus xylophilus* em larga escala

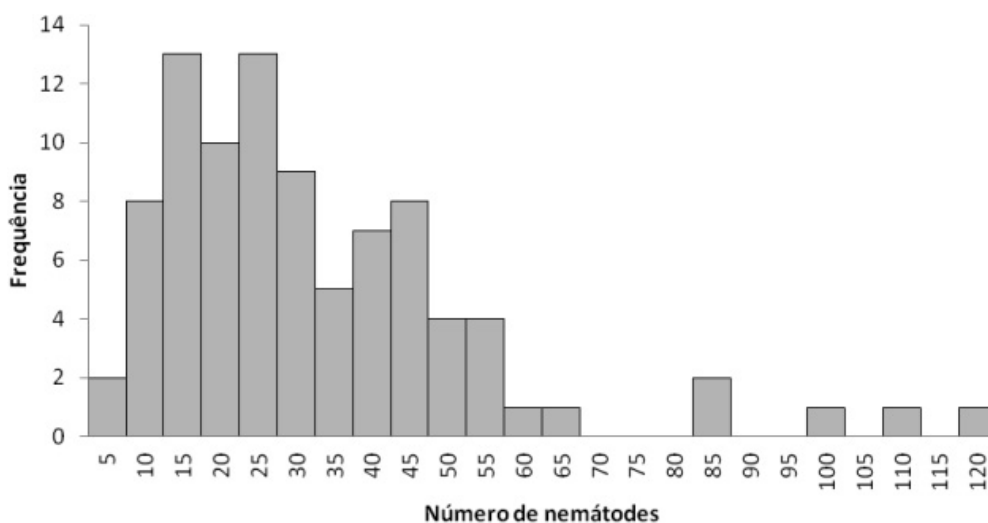


Figura 3. Histograma de frequências do número de nemátodes que migraram através dos raminhos

sistema, os tubos foram tapados com *Parafilm*<sup>®</sup>M, no centro do qual foi feito um pequeno furo por onde eram pipetados 3 ml de água desionizada e, seguidamente, colocado o raminho (Figura 2). Deste modo foi possível manter os raminhos em posição vertical. Posteriormente, e de acordo com o método previamente descrito (MATSUNAGA & TOGASHI, 2009; OKU et al., 1989), o topo dos raminhos foi inoculado com 200 nemátodes presentes num volume 20 µl, que se verificou ser rapidamente absorvido sem escorrer pelos lados do raminho, selando-se depois o topo do ramo com *Parafilm*<sup>®</sup>M para evitar dessecação, e colocando-se a 25°C no escuro durante 24 h. Após incubação durante 24 h, contou-se o número de nemátodes presentes na água no fundo do tubo.

Os resultados demonstraram existir diferenças significativas entre as árvores testadas ( $F(88,355)=13,63$ ;  $p<0,0001$ ), com a maioria exibindo uma susceptibilidade intermédia, e com algumas árvores mostrando susceptibilidade muito alta ou muito baixa (Figura 3), tendo em conta o número de nemátodes que atravessou os raminhos. A posição da amostra dentro de cada ramo não tem efeito significativo ( $F(4,351)=1,22$ ;  $p=0,3012$ ).

Em conclusão, o *scale-up* da cultura de nemátodes, através do aumento da quantidade inicial de cevada onde primariamente ocorreu o crescimento do fungo *B. cinerea*, permitiu aumentar significativamente a quantidade de nemátodes obtida num único ciclo de crescimento. Assim tornou-se possível a realização de ensaios em larga escala. O teste de susceptibilidade ao NMP demonstrou diferenças significativas entre as diferentes árvores testadas. O estudo das características das árvores que exibiram menor susceptibilidade é de grande interesse para encontrar factores de resistência ao NMP, estando essa investigação já em curso nos nossos laboratórios. Note-se ainda que, apesar do teste ter sido otimizado usando ramos de *P. pinaster*, pode ser adaptado a outras espécies de coníferas.

### Agradecimentos

Ao Dr. Manuel Mota (Universidade de Évora, Portugal) pelos isolados de *B. xylophilus*.

Ao Fundo Florestal Permanente, Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas I.P., Autoridade Florestal Nacional, Proder, DOC-INIA, Predoc-INIA e MCIN-AGL-FOR-2010-18724 pelo financiamento.

### REFERÊNCIAS

- BAERMANN, G.; 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (nematoden) Larven in Erdproben. *Geneesk Tijdschr Ned-Indie* 57:131–137.
- DIRECCIÓN XERAL DE PRODUCCIÓN AGROPECUARIA; 2010. Resolución do 17 de novembro de 2010, da Dirección Xeral de Producción Agropecuaria, pola que se declara no territorio da Comunidade Autónoma de Galicia a presenza do organismo de corentena *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle et al. (nematodo do piñeiro) e se ordena comezar as medidas para a súa erradicación. *DOG* 228: 19633-19634 (de 26 de novembro).
- EPP0; 2009. PM 7/4(2): *Bursaphelenchus xylophilus*. *EPP0 Bulletin* 39: 344-353.
- KIYOHARA, T. & TOKUSHIGE, Y.; 1971. Inoculation Experiments of a Nematode, *Bursaphelenchus* sp., onto Pine Trees. *J Jap Forest Soc* 53: 210-218.
- MAMIYA, Y.; 1988. History of Pine Wilt Disease in Japan. *J Nematol* 20: 219-226.
- MATSUNAGA, K. & TOGASHI, K.; 2009. Seasonal change in susceptibility of *Pinus densiflora* to *Bursaphelenchus xylophilus* infection, determined from the number of nematodes passing through branch sections. *Nematology* 11: 409-418.
- MOTA, M.; BRAASCH, H.; BRAVO, M.; PENAS, A.; BURGERMEISTER, W.; METGE, K. & SOUSA, E.; 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1: 727-734.
- OKU, H.; SHIRAISHI, T. & CHIKAMATSU, K.; 1989. Active defense as a mechanism of resistance in pine against pine wilt disease. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 55: 603-608.
- TOGASHI, K.; CHUNG, Y. & SHIBATA, E.; 2004. Spread of an introduced tree pest organism - The pinewood nematode. *In*: S. Hong, J. Lee,

- B. Ihm, A. Farina, Y. Son, E. Kim & J. Choe (eds.), *Ecological Issues in a Changing World: Status, Response and Strategy*: 173-188. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- TOGASHI, K. & MATSUNAGA, K; 2003. Between-isolate difference in dispersal ability of *Bursaphelenchus xylophilus* and vulnerability to inhibition by *Pinus densiflora*. *Nematology* 5: 559-564.
- WEBSTER, J. & MOTA, M.; 2008. Pine wilt disease: global issues, trade and economic impact. In: M. Mota & P. Vieira (eds.), *Pine Wilt Disease: A worldwide threat to forest ecosystems*: 1-3. Springer Verlag, Holanda.