

Teste de susceptibilidade ao Nemátode da Madeira do Pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*) – Optimização para utilização em larga escala



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO



Ministério da
Agricultura,
do Desenvolvimento
Rural e das Pescas



Marta R. M. Lima^{1*}, Miguel Ramos^{1*}, Luis Sampedro², Xoaquín Moreira², Rafael Zas³ e Marta W. Vasconcelos¹

¹ CBQF/ESB, Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal. mwvasconcelos@esb.ucp.pt

² Centro de Investigación Forestal de Lourizán – Unidad Asociada MBG-CSIC, Apdo. 127, E-36080 Pontevedra, Galicia, Espanha. lsampe@uvigo.es

³ Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC), Apdo. 28, E-36080 Pontevedra, Espanha. rzas@cesga.es

* Estes autores contribuíram igualmente para o trabalho.

INTRODUÇÃO

A doença da murchidão do pinheiro é uma doença grave que afecta florestas de coníferas com uma elevada taxa de mortalidade. É causada pelo nemátode *Bursaphelenchus xylophilus*, conhecido como nemátode da madeira do pinheiro (NMP).

Dado a introdução recente desta peste na Europa, é de 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, e também para o estudo da doença, sugerindo mecanismos de susceptibilidade/resistência.

Neste trabalho optimizou-se um teste de susceptibilidade ao NMP para utilização num grande número de amostras. O teste baseia-se na capacidade de nemátodes virulentos atravessarem secções de 5 cm de ramos jovens, tendo sido previamente usado em ensaios de pequena escala (Oku et al. 1989; Matsunaga e Togashi, 2009).

MÉTODOS

Cultura de nemátodes e scale-up: 2 estirpes virulentas de *B. xylophilus* (BxHF e Bx8A) foram cultivadas em *Botrytis cinerea* crescendo em grãos de cevada. Inicialmente usaram-se tubos de ensaio com 5ml de cevada, passando-se para caixas com 100ml de cevada e, finalmente, para sacos com 2l de cevada (Fig.1). Os nemátodes foram extraídos usando a técnica do funil de Baermann.

Material vegetal: colheram-se ramos jovens de *Pinus pinaster* (diâmetro 1-2 cm), de 10 árvores de 9 proveniências diferentes (total 90 amostras).

Teste de susceptibilidade: foram cortadas 5 secções de 5 cm de comprimento dos ramos correspondentes a cada árvore (total 450 raminhos). Colocaram-se os raminhos num sistema produzido *in-house*, ficando em posição vertical com a extremidade inferior mergulhada em água. A extremidade superior foi inoculada com 200 nemátodes, selando-se com parafilme para evitar dessecação (Fig.2). O sistema foi colocado no escuro a 25°C durante 24h.

Contagem de nemátodes: após 24h de incubação, o número de nemátodes que atravessaram os raminhos até à água foram contados usando uma lupa (Fig.3).

RESULTADOS



Fig. 1 - Scale-up da cultura de *B. xylophilus*.

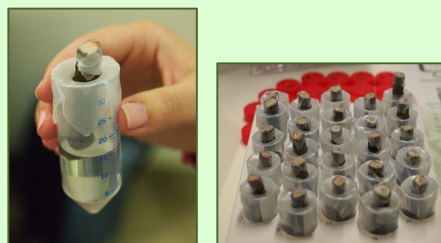


Fig. 2 – Sistema desenvolvido para o teste de susceptibilidade ao NMP.

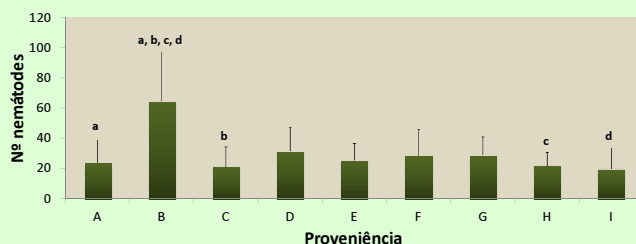


Fig. 3 – Número de nemátodes que atravessaram os raminhos (média ± desvio padrão); letras iguais indicam diferenças estatisticamente significativas).

CONCLUSÕES

- O *scale-up* da cultura de nemátodes, através do aumento da quantidade inicial de cevada onde primariamente ocorria 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 na potencial susceptibilidade de árvores de diferentes proveniências.
- O teste foi optimizado usando ramos de *P. pinaster*, mas pode ser adaptado a outras espécies.

Agradecimentos

Ao Dr. Manuel Mota (Universidade de Évora, Portugal) pela cedência dos isolados de *B. xylophilus*. À AFN, IFAP e Proder pelo financiamento.

Referências

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. *Nematol.* 11:409-418.

Oku H, Shiraiishi T, Chikamatsu K (1989). Active defense as a mechanism of resistance in pine against pine wilt disease. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 55:603-608.