



2022
Lleida

27 · 1
junio · juny
julio · juliol

Cataluña
Catalunya

8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**

8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022

ISBN 978-84-941695-6-4

© Sociedad Española de Ciencias Forestales



Organiza

Catalogación de progenitores de familia de *Pinus pinaster* tolerantes a la enfermedad del marchitamiento del pino causada por *Bursaphelenchus xylophilus*

MENÉNDEZ GUTIÉRREZ, M.¹, PRADA OJEA, E.¹ y DÍAZ VÁZQUEZ, R.¹

¹ Centro de Investigación Forestal de Lourizán (AGACAL - Xunta de Galicia).

Resumen

El nuevo material de base incluido en el Catálogo Nacional de Materiales de Base está formado por progenitores de familia de *Pinus pinaster* Ait. de la categoría cualificada cuyo objetivo principal es la tolerancia al organismo de cuarentena *Bursaphelenchus xylophilus* y que, además, se caracteriza por presentar una buena producción de madera.

La selección por tolerancia al nematodo se realizó mediante ensayos de inoculación en un total 91 familias de *P. pinaster* del programa de mejora genética de Galicia. Estos ensayos se realizaron en 5 años consecutivos en planta de 2-4 años, en los invernaderos del CIF Lourizán (AGACAL-Xunta de Galicia). Además, se evaluó la producción de madera mediante el crecimiento en volumen a partir de la información obtenida en 10 ensayos de progenie del programa de mejora genética situados por todo el territorio gallego.

Los progenitores seleccionados mostraron una supervivencia media a *B. xylophilus* del 78%, mientras que el crecimiento en volumen osciló entre un 11- y un 28% mayor que el material de base gallego de la categoría identificada. La semilla de estos progenitores ya está siendo recogida por el centro de semillas forestales, Viveiros Xunta de Galicia-Semfor para que la Xunta de Galicia comience a realizar plantaciones en los lugares con mayor peligro de aparición de la enfermedad del marchitamiento del pino, causada por *B. xylophilus*.

Palabras clave

Pino marítimo, nematodo de la madera del pino, Catálogo Nacional de Materiales de Base, inoculación, volumen.

1. Introducción

Pinus pinaster Ait. es una especie de gran relevancia en el suroeste de Europa, ocupando alrededor de 4,2 millones de ha en su área de distribución natural (España, Portugal, Francia, Italia e Norte de África). En España, y especialmente en Galicia, *P. pinaster* es considerada una de las especies de coníferas más importantes por su alto valor económico y medioambiental. Aproximadamente el 40% de las cortas de madera en 2019 en Galicia fueron coníferas (3,8 M m³; Xunta de Galicia, 2020), correspondiendo el 48% de estas a *P. pinaster* y un 45% a *P. radiata*.

En la actualidad, la persistencia de estas masas está en peligro debido al creciente aumento de plagas y enfermedades derivado del cambio climático y la actividad humana que actúa favoreciendo la expansión de diferentes organismos entre regiones. Una de las enfermedades más alarmantes, que ya ha ocasionado cuantiosos daños tanto en Asia como en Europa, es la causada por un organismo microscópico comúnmente conocido como nematodo de la madera del pino (NMP, *Bursaphelenchus xylophilus*).

Esta enfermedad afecta principalmente a especies del género *Pinus*. En Asia, las principales especies hospedantes son *Pinus densiflora*, *Pinus thunbergii* y *Pinus massoniana*, mientras que en Europa hasta la fecha daña especialmente a *P. pinaster*. No solo se ha confirmado la susceptibilidad de esta especie al NMP en ensayos de inoculación en condiciones controladas (Menéndez-Gutiérrez et al. 2018, Nunes da Silva et al. 2015), sino que ha sido la especie más afectada en campo tanto en

Portugal como en los focos de la enfermedad declarados hasta el momento en España. Si bien, en Portugal también se ha detectado asociado a *Pinus nigra* (Inácio et al., 2015) y en España a árboles de *P. radiata* (Zamora et al., 2015).

La enfermedad del marchitamiento del pino es el resultado de una compleja interacción entre el organismo causante de la enfermedad, el nematodo; un insecto vector, coleópteros del género *Monochamus*; y un hospedante, especies del género *Pinus*. Por tanto, para el control de la enfermedad es necesario actuar sobre al menos uno de los pilares básicos para el desarrollo de la enfermedad.

A pesar del gran esfuerzo realizado por los gobiernos de los países afectados para el control de la enfermedad, todavía no se ha encontrado una estrategia que consiga erradicarla por completo. Las estrategias de control convencionales, como la fumigación aérea de insecticidas, la eliminación de árboles muertos y el manejo forestal de los rodales, aunque logran frenar la propagación, no son suficientes para su control. Sin embargo, la aplicación de algunas de estas medidas junto con la mejora genética por resistencia a *B. xylophilus* parece ser una estrategia de gestión eficaz (Matsunaga et al., 2017).

Por tanto, la mejor solución a largo plazo para proteger las masas de pinos contra la enfermedad del marchitamiento del pino parece residir en la selección y reproducción de genotipos resistentes. Las investigaciones llevadas a cabo por el equipo de investigación del Centro de Investigación Forestal de Lourizán (CIF Lourizán) durante los últimos años en diferentes proyectos han permitido grandes avances en esta área, dirigiéndose principalmente hacia el desarrollo de materiales tolerantes y su posterior transferencia al sector forestal.

La selección de material resistente de *P. pinaster* se llevó a cabo en CIF de Lourizán mediante la evaluación de las familias que componen la población de mejora del programa de mejora genética gallego de esta especie iniciado en los años 80 (Zas y Merlo, 2008). La confirmación de una gran variación genética entre dichas familias en susceptibilidad a *B. xylophilus*, indicó que este carácter estaba sujeto a control genético, lo cual permitió incluirlo como carácter de selección en el programa de mejora. Asimismo, los numerosos ensayos de inoculación de *B. xylophilus* realizados empleando las familias de este programa desde 2013 han dado lugar a la selección de tres familias como resistentes a este patógeno.

Según el Real Decreto 283/2003, para la comercialización de estas familias resistentes como Material Forestal de Reproducción fue preciso elaborar un documento técnico sobre dichos materiales y realizar la solicitud para su admisión en el Catálogo Nacional de Materiales de Base.

2. Objetivos

Inclusión en el Catálogo Nacional de Materiales de Base de progenitores de familias de *P. pinaster* del programa gallego de mejora genética resistentes a *B. xylophilus* y destacadas por su producción en madera.

3. Metodología

El procedimiento seguido para la admisión de los progenitores de familia como material forestal de reproducción cualificado es el recogido en “Criterios orientadores para propuesta de materiales de base a la autoridad designada para su autorización 2007”, de acuerdo con el Real Decreto 283/2003 de 7 de marzo, sobre comercialización de los materiales forestales de reproducción. Este procedimiento comprende la presentación de una solicitud de admisión ante la autoridad competente en la que se recogen los datos administrativos del solicitante y del material de base. Esta solicitud se acompaña de un documento técnico en el que se incluyen datos descriptivos del material de base, la

evaluación de los criterios de selección en función de los objetivos definidos, así como toda la información referente a los ensayos de evaluación del material.

El principal criterio de selección aplicado para la catalogación de los progenitores de familia de *P. pinaster* ha sido la salud y resistencia, concretamente la tolerancia de *P. pinaster* a *B. xylophilus*. Otros de los criterios aplicados han sido la producción en volumen de madera y la de forma o pauta de crecimiento.

Dado que el mismo clon del que proceden las familias seleccionadas como tolerantes se encuentra en dos localizaciones diferentes (huertos semilleros), se catalogan dos progenitores de familia por cada familia seleccionada, llevando a cabo documentación diferente por cada uno de los huertos semilleros que se corresponde con la unidad de admisión.

3.1 Tolerancia a *B. xylophilus*

La tolerancia a *B. xylophilus* se evaluó en un total 91 familias de *P. pinaster* del programa de mejora genética de Galicia. Estas familias han sido evaluadas mediante ensayos de inoculación de *B. xylophilus* en planta de 2-4 años, bajo condiciones controladas, en los invernaderos de CIF Lourizán (AGACAL - Xunta de Galicia, 42° 24' 35"N 8° 00' 12"W, Pontevedra). Los ensayos fueron llevados a cabo en años consecutivos (2013-2017) siguiendo un diseño de bloques completos al azar. Las semillas se recogieron en el antiguo huerto semillero de Sergude y en el huerto semillero de A Braxe (A Coruña) y fueron cultivadas en envases de 2 litros, utilizando un substrato 9:1 (turba:vermiculita), en el vivero de CIF Lourizán.

En cada uno de los ensayos las plantas fueron inoculadas con una dosis de 1200 nematodos en 300 µl de agua destilada y la evaluación de los daños fue realizada semanalmente desde el inicio de los síntomas hasta el final del ensayo.

Las inoculaciones se realizaron siguiendo la metodología descrita por Menéndez-Gutiérrez et al. (2018), según la cual se realiza un corte en la parte del tallo del crecimiento del año anterior, y se cubre con una tira de gasa estéril. La suspensión de inoculación se pipetea sobre esta gasa que se recubre con parafilm® para evitar la desecación.

En los dos primeros ensayos (2013-2014) se evaluaron un total de 91 familias de *P. pinaster*, 50 familias en 2013 y 41 familias en 2014, incluyendo en este último 6 familias ya evaluadas en 2013 (Tabla 1). En los siguientes ensayos, se volvieron a evaluar las familias que mostraron una menor susceptibilidad en los ensayos anteriores, con porcentajes de mortalidad por debajo del 33%, y además se incluyeron 3 familias que habían mostrado una alta susceptibilidad.

Tabla 1. Principales características de los ensayos de inoculación de *Bursaphelenchus xylophilus* en *Pinus pinaster*.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
Año	2013	2014	2015	2016	2017
Edad (años)	2	3	4	2	3
Fecha de inoculación	02/07/2013	09/06/2014	22/04/2015	21/04/2016	18/05/2017
Fecha fin ensayo	13/03/2014	14/08/2014	05/10/2015	29/08/2016	27/10/2017
Temperatura media (°C)	23,2	23,5	23,9	23,3	23,2
Temperatura media (noche-día) (°C)	14,8-24,0	18,6-28,4	22,2-25,6	19,6-27,1	20,2-26,1
Altura (cm)	101,6±15,1	120,1±16,0	-	108,8±22,1	128,6±17,8
Diámetro (mm)	12,2±1,6	16,0±2,3	-	16,3±3,5	17,8±4,4

Nº de familias evaluadas	50	41+6*	38**	32**	14**
Nº de plantas por familia	12	12	11-25	10-24	15-35
Nº de bloques	12	12	25	18	35

* Familias ya evaluadas en 2013; ** Familias ya evaluadas en 2013 y/o 2014.

Para determinar la tolerancia a *B. xylophilus* de las familias de *P. pinaster* se evaluaron los síntomas, la mortalidad y el número de nematodos en cada uno de los ensayos.

Los síntomas se evaluaron en cada una de las plantas mediante una escala basada en el porcentaje de acículas que presentan decoloración o marchitamiento: 1 (sin síntomas externos) a 7 (todas las acículas marchitas) (Menéndez-Gutiérrez et al., 2018). La mortalidad se estimó como una variable binaria a partir de la evaluación de los síntomas, considerando el árbol muerto (1) en los niveles de daño 6 o 7, y vivo (0) en los niveles de 1 a 5. Por otro lado, se determinó el número de nematodos en un porcentaje de las plantas, expresándose en número de *B. xylophilus* por gramo de peso seco.

Para la selección de las familias con mayor tolerancia a *B. xylophilus* se analizó la mortalidad en los cinco ensayos en un total de 40 familias, habiéndose descartado en un *screening* inicial aquellas con una mortalidad superior al 40% y aquellas evaluadas únicamente en un ensayo.

3.2 Producción en volumen de madera

La producción en volumen de madera de las 116 familias de *P. pinaster* del programa de mejora genético se evaluó en 10 ensayos de progenie de polinización abierta establecidos en Galicia (Gomesende, Lalín y As Neves -instalados en 1995- y Coristanco, Chantada, Forgoselo, Friol, Mandín, Noceda y Rebordelo -instalados en 2005; Tabla 2).

Tabla 2. Características climáticas de las parcelas de ensayo de progenies de *Pinus pinaster*.

Sitio	Reb	Cor	Man	Fri	For	Chan	Noc	Nev	Gom	Lal
Año plantación	2005	2005	2005	2005	2005	2005	2005	1995	1995	1995
Nº componentes	116+3	116+3	116+3	116+3	116+3	116+3	116+3	87	101	94
Diseño	BI	BI	BI	BI	BI	BI	BI	BCA	BCA	BCA
Nº réplicas	8	8	8	8	8	8	8	10	10	10
Individuos/u.e.	3	3	3	3	3	3	3	5	5	5
Espaciamiento	3x2	3x2	3x2	3x2	3x2	3x2	3x2	3x3	3x3	3x3
RIU	1	1	2	2	3	2	2	1	1	1
Altitud (m)	480	235	630	510	545	655	570	535	540	700
TMA (°C)	11,6	12,0	11,1	11,0	11,8	11,8	11,2	13,2	11,8	10,1
Tmin (°C)	-0,9	-3,0	-6,0	-4,4	-3,3	-7,0	-5,0	-1,4	-3,4	-8,0
PMA (mm)	1672	1420	814	976	1705	1335	913	1759	703	1460
Pe (mm)	169	187	102	99	147	120	86	208	50	172

Los 3 ensayos de progenie instalados en 1995 siguen un diseño de bloques completos al azar con 10 bloques y 5 plantas contiguas por unidad experimental (5 plantas de cada familia en cada bloque). El número de familias incluidas en cada uno de estos ensayos varía entre 87 y 101, con un

total de plantas de 4300-4900 por ensayo y ocupando una superficie media de 4-5 ha. Estos tres ensayos se encuentran en la Región de Identificación y Utilización de Material Forestal de Reproducción 1 (RIU 1) y son representativos de la Región de Procedencia 1a-Noroeste-Costera. Por otra parte, los ensayos instalados en 2005 siguen un diseño de bloques incompletos alfa lattice con 8 réplicas, 12 bloques incompletos por réplica (10 familias en cada bloque incompleto) y 3 árboles contiguos por unidad experimental. El número de familias incluidas en cada uno de estos ensayos es de 116 (excepto Chantada con 94), constando cada ensayo de 2300-2900 plantas y ocupando aproximadamente 2 ha. Dentro del grupo de ensayos instalados en 2005, dos se encuentran en la RIU 1, cuatro en la RIU 2 y uno en la RIU 3, por lo que representan tanto a la Región de Procedencia 1a-Noroeste-Costera como a la 1b-Noroeste-Interior. En los ensayos de 2005 además de las familias del programa de mejora se incluyeron dos testigos comerciales (Galicia costa y Galicia interior) que sirven de control.

Para estimar la producción en volumen de madera se midió la altura total y el diámetro normal con corteza de cada árbol en cada parcela de ensayo. El cálculo del volumen con corteza (V) en m³ se realizó según la ecuación de Diéguez-Aranda et al. (2009) para la especie *P. pinaster*, donde D es el diámetro normal con corteza en cm y H la altura total en m.

$$V = 3,974 \cdot 10^{-5} \cdot D^{1,876} \cdot H^{1,079}$$

Las variables que mostraron distribuciones espaciales no aleatorias en las parcelas evaluadas, fueron corregidas mediante el método ISA para eliminar la autocorrelación espacial (Zas, 2006).

3.3 Forma o pauta de crecimiento

El carácter tenido en cuenta para la evaluación de la forma o pauta de crecimiento fue la rectitud de fuste. Para este fin se utilizó una escala subjetiva de 6 niveles, desde 0: tronco perfectamente recto hasta 5: graves curvaturas en distintos planos, siguiendo las indicaciones de Galera et al. (1997). Del mismo modo que el volumen, la rectitud fue evaluada en los 10 ensayos de progenie indicados anteriormente.

3.4 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa de análisis estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2014). Para el análisis de la mortalidad se utilizó el procedimiento Glimmix para el ajuste de modelos lineales mixtos generalizados. La mortalidad se analizó asumiendo una distribución binaria y una función logit link. Se obtuvo el mejor predictor lineal insesgado empírico, EBLUP (Empirical Best Linear Unbiased Predictor) de los efectos familiares. Los EBLUP de los efectos de mortalidad familiar se clasificaron para identificar a las familias con mayores y menores efectos genéticos sobre la mortalidad. Mayores valores de EBLUP indican mayor tolerancia al nematodo.

Los análisis de volumen y rectitud se realizan mediante el procedimiento Mixed, el cual emplea el algoritmo de máxima verosimilitud restringida (REML), obteniendo los BLUPs familiares (best linear unbiased predictor o, lo que es lo mismo, mejor predicción lineal no sesgada). Mayores valores de BLUP indican mayor volumen, mientras que en la rectitud son los valores menores los que indican mayor rectitud de fuste.

4. Resultados

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los ensayos descritos en la tabla 1 nos da unos valores de EBLUP para cada familia ensayada.

Las tres familias seleccionadas para su inclusión como progenitores de familia resistentes en el CNMB son las que presentan mayores valores de EBLUP entre todas las familias ensayadas y, por lo tanto, son las familias con mayor tolerancia a *B. xylophilus*. Como controles de comparación se han

elegido tres familias que han presentado en todos los ensayos realizados altos valores de mortalidad (pues son las que representan mejor a la población total), y por lo tanto presentan EBLUPs muy bajos. La familia con mayor EBLUP, es decir la familia que tiene mayor tolerancia al nematodo es la Familia 2, con un valor de 0,719, mientras que el control de comparación tiene un valor de -0,517 (tabla 3).

Tabla 3. Resultados del análisis por genotipo de los distintos caracteres evaluados.

Genotipo	Carácter evaluado	EBLUP/ BLUP	Desviación respecto al control	% Superioridad
Familia 1	Tolerancia BX	0,463	0,980	189,6
	volumen	8,295	12,645	290,7
	rectitud	0,025	-0,110	81,7
Familia 2	Tolerancia BX	0,719	1,235	239,1
	volumen	0,888	5,240	120,4
	rectitud	0,003	0,131	97,5
Familia 3	Tolerancia BX	0,598	1,114	215,7
	volumen	0,664	5,010	115,3
	rectitud	-0,123	0,257	191,1
Control / Testigo comercial	Tolerancia BX	-0,517		
	volumen	-4,350		
	rectitud	0,134		

Asimismo, se ha realizado el análisis estadístico de los datos de las variables volumen y rectitud recabados en los ensayos relacionados en la tabla 2. En este caso el predictor insesgado estimado es el BLUP. Para ambas variables las tres familias presentan valores de volumen y rectitud mejores que los testigos comerciales, Galicia Costera y Galicia Interior, incluidos en los ensayos de campo establecidos en las parcelas instaladas en 2005 (tabla 3). En cuanto al volumen, la Familia 1 es la que tiene mejor comportamiento, con un BLUP de 8,295 frente al de la media de los dos testigos (control) que es de -4,350. Considerando la rectitud, dado que valores menores expresan una mejor rectitud, de los tres seleccionados es la Familia 3 que muestra un mejor patrón de forma con un BLUP de -0,123, frente a 0,134 del control.

5. Conclusiones

Los progenitores de familia de *P. pinaster* propuestos como material de base de la categoría cualificada ya han sido autorizados para su inclusión en el Catálogo Nacional de Materiales de Base con los códigos: PF-Q-26/15/001, PF-Q-26/15/002, PF-Q-26/15/003, PF-Q-26/15/004, PF-Q-26/15/005, PF-Q-26/15/006 (BOE-A-2020-6076, del 12 de junio de 2020).

El objetivo principal de este material forestal de reproducción es la tolerancia al organismo de cuarentena *B. xylophilus*, si bien también se han aplicado los criterios de selección de forma y producción en volumen de madera.

Estos progenitores de familia están establecidos en los huertos semilleros de A Braxe (Cedeira, A Coruña) y Monfero (A Coruña).

6. Agradecimientos

Agradecemos a Ricardo Ferradás, Maribel Juncal, Francis Ignacio y Margarita Alonso, personal del CIF Lourizán, su trabajo de apoyo durante los ensayos. Este estudio se ha financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través de los proyectos NEMOPIN (RTA2011-0069-C03-01),

NEMOCONTROL (RTA2014-0042-C02-01) y NEMOPLAN (RTA2017-00012-C02-01), y cofinanciado por FEDER, INDITEX y Plan de Mejora e Innovación Forestal de Galicia (2010-2020).

7. Bibliografía

DIÉGUEZ-ARANDA, U.; ROJO ALBORECA, A.; CASTEDO-DORADO, F.; ÁLVAREZ GONZÁLEZ, J. G.; BARRIO-ANTA, M.; CRECENTE-CAMPO, F.; GONZÁLEZ GONZÁLEZ, J. M.; PÉREZ-CRUZADO, C.; RODRÍGUEZ SOALLEIRO, R.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, C. A.; BALBOA-MURIAS, M. A.; GORGOSO VARELA, J. J.; SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, F.; 2009. Herramientas selvícolas para la gestión forestal sostenible en Galicia. Xunta de Galicia. 259 páginas.

GALERA, R.; MARTIN, S.; ALÍA, R.; GORDO, J.; AGUADO, A.M. Y NOTIVOL, E.; 1997. Manual de selección de masas productoras de semillas. Evaluación de caracteres. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. INIA, Madrid, 92 p

INÁCIO, M.; NÓBREGA, F.; VIEIRA, P.; BONIFÁCIO, L.; NAVES, P.; SOUSA, E.; MOTA, M.; 2015. First detection of *Bursaphelenchus xylophilus* associated with *Pinus nigra* in Portugal and in Europe. *For. Pathol.* 235–238

MATSUNAGA, K.; OHIRA, M.; HIRAO, T.; TAKAHASHI, M.; FUKATSU, E.; KURITA, M.; KURAMOTO, N.; TOGASHI, K.; 2017. The current state of breeding for Japanese pine resistance against pine wilt disease and planned gain realization by seed orchard establishment. In Proceedings of the IUFRO Seed Orchard Conference 2017 Sweden. 79 p.

MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ, M.; ALONSO, M.; TOVAL, G.; DÍAZ, R.; 2018. Testing of selected *Pinus pinaster* half-sib families for tolerance to pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *For. An Int. J. For. Res.* 38–48.

NUNES DA SILVA, M.; SOLLA, A.; SAMPEDRO, L.; ZAS, R.; VASCONCELOS, M.W. 2015. Susceptibility to the pinewood nematode (PWN) of four pine species involved in potential range expansion across Europe. *Tree Physiol.* 987–999

ZAMORA, P.; RODRÍGUEZ, V.; RENEDO, F.; SANZ, A. V.; DOMÍNGUEZ, J.C.; PÉREZ-ESCOLAR, G.; MIRANDA, J.; ÁLVAREZ, B.; GONZÁLEZ-CASAS, A.; MAYOR, E.; DUEÑAS, M.; MIRAVALLS, A.; NAVAS, A.; ROBERTSON, L.; MARTÍN, A. B. 2015. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* causing pine wilt disease on *Pinus radiata* in Spain. *Plant Dis.* 99.

ZAS, R. 2006. Iterative kriging for removing spatial autocorrelation in analysis of forest genetic trials. *Tree Genet. Genomes.* 177–185.

ZAS, R. Y MERLO, E. 2008. El programa de mejora de *Pinus pinaster* en Galicia. Boletín CIDEU. 5-24.

XUNTA DE GALICIA. 2020. Anuario de estadística forestal de Galicia. 117 p. Consellería de Medio Rural. Santiago de Compostela.