

Conferencias y Ponencias del 8º Congreso Forestal Español

**Resistencia al nematodo del pino.
La investigación produce conocimiento
y ... resultados reales**

Díaz, R.¹; Prada, E.¹; Alonso Santos, M.¹; Villar Caamaño, L.^{1,2};
Torres-Sánchez, E.¹; Frade, S.¹; Menéndez-Gutiérrez, M.¹

¹Centro de Investigación Forestal de Lourizán –AGACAL, Xunta de Galicia

²Fundación ARUME

* Autor de correspondencia: raquel.diaz.vazquez@xunta.gal

Resumen

La enfermedad del marchitamiento del pino, causada por *Bursaphenchus xylophilus*, puede causar graves daños en los pinares españoles durante los próximos años. Desde 2013, el Centro de Investigación Forestal de Lourizán ha desarrollado una línea dentro de sus programas de mejora genética de *Pinus pinaster* y *Pinus radiata* para la selección de individuos resistentes a esta enfermedad. Por ser organismo de cuarentena, los múltiples ensayos de inoculación realizados se han efectuado en invernadero en condiciones controladas. En estos estudios se evaluó la susceptibilidad de distintas especies, así como procedencias y familias de pino marítimo e insigne. En todos los casos se ha encontrado variación genética, lo que muestra que la mejora genética es una herramienta viable para controlar esta enfermedad. También se evaluaron distintas cepas de nematodo para estudiar la posible variación genética entre cepas en virulencia en ambas especies de pino. Recientemente, también se están realizando ensayos de evaluación no destructivos. Todo esto, además de generar conocimiento sobre la enfermedad, ha dado lugar a la catalogación, en 2020, de seis progenitores de familia de *P. pinaster*, los cuales presentan mayor tolerancia a este nematodo. Actualmente, la Xunta de Galicia está realizando plantaciones con este material en la zona demarcada.

Palabras clave: *Pino marítimo, pino insigne, nematodo de la madera del pino, susceptibilidad, mejora genética.*

1. Evolución e impacto de la enfermedad del marchitamiento del pino en el mundo

El nematodo de la madera del pino (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, es el organismo que causa la enfermedad del marchitamiento del pino (EMP). En su lugar de origen, Norteamérica, la práctica totalidad de las especies nativas son resistentes a la enfermedad. Por el contrario, en los lugares donde este organismo ha sido introducido, esta enfermedad está ocasionando graves daños económicos y ecológicos, produciendo, en muchas ocasiones, la muerte de los árboles. Desde comienzos del s. XX este nematodo ha infectado a pinares de, al menos, 19 especies de pino en el sureste asiático (Japón, 1905; China, 1982; Taiwán, 1985 y Corea del Sur, 1988). En particular, en China el área media anual afectada por la enfermedad sobrepasa los 1,3 millones de hectáreas, con una mortalidad total de más de 600 millones de pinos (Li and Zhang, 2021); en Taiwán hasta 2011 habían muerto más de 500 millones de árboles (Cang-Sang, 2011) y en Corea del Sur el número de pinos eliminados por la enfermedad en 30 años (1989-2019) fue, aproximadamente, de 13 millones (Han et al., 2021). De todo ello, se deduce que los daños económicos consecuencia de la enfermedad están siendo muy elevados en todos estos países. En concreto, en la década de los 80 en Japón las pérdidas llegaron a ascender a 1 millón de m³ anuales (Hoshi, 2016).

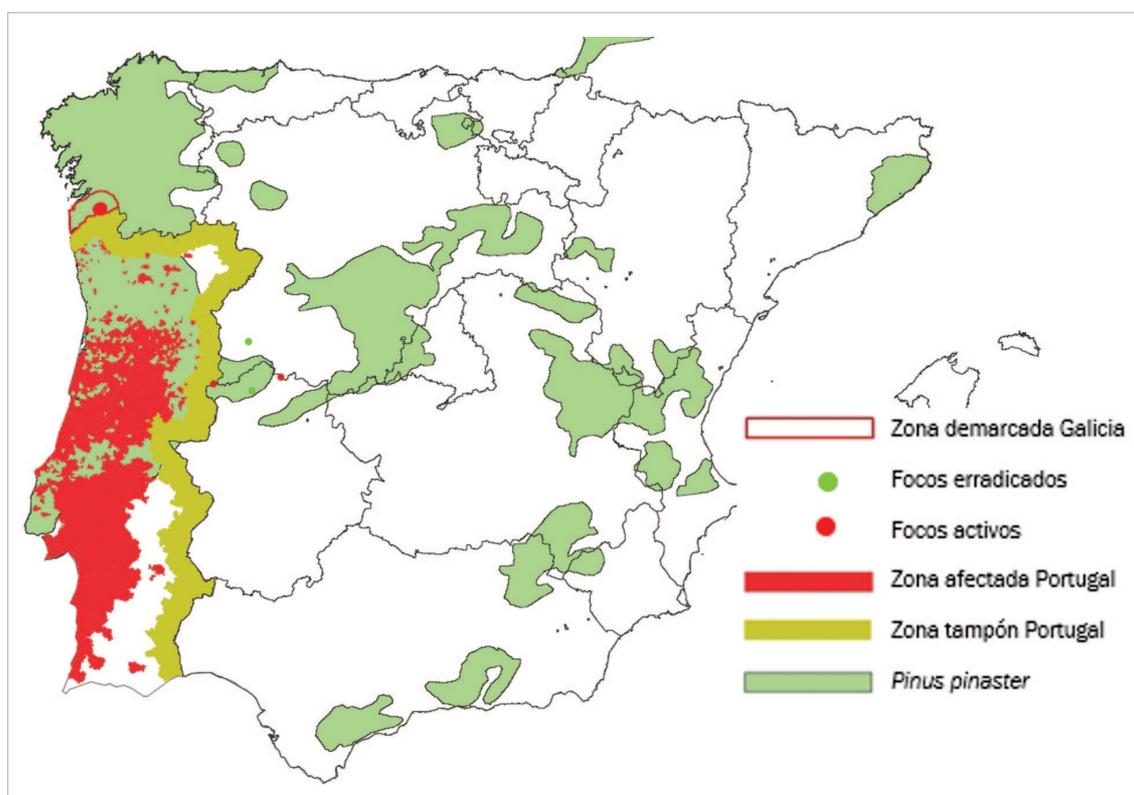


Figura 1. Distribución de la expansión de *Bursaphelenchus xylophilus* en la península ibérica.

La enfermedad del marchitamiento del pino se detectó por primera vez en Europa en 1999, concretamente en la península de Setúbal, Portugal (Mota *et al.*, 1999). Actualmente, todo el país vecino está declarado zona demarcada. En España el primer foco apareció en 2008 y, desde entonces, se han detectado positivos en Extremadura, Castilla y León y Galicia, habiendo en la actualidad 3 zonas demarcadas en España (As Neves –Pontevedra–, Lagunilla –Salamanca– y Valverde del Fresno –Cáceres–, *Figura 1*). En Europa, la especie más afectada ha sido *Pinus pinaster*, si bien también se han detectado positivos en *P. radiata* y *P. nigra*.

Desde la declaración de Portugal como zona demarcada, en un periodo de 6 años se talaron en este país más de 7 millones de árboles sintomáticos (Bonifácio, 2016) con el fin de contener la enfermedad y evitar su expansión al resto de Europa. El impacto potencial de la enfermedad en España puede ser elevado, pudiendo alcanzarse pérdidas económicas muy considerables. De La Fuente and Beck (2018) destacan el gran impacto que ya ha tenido la enfermedad en las zonas de la Red Natura portuguesa de coníferas donde hasta 2016 había afectado a un 49% de las mismas.

La evolución de la enfermedad ha sido similar en todos los países afectados hasta la fecha. A pesar de las medidas llevadas a cabo para evitar su expansión, esto no ha sido posible, debido tanto al difícil control del vector, cerambícidos del género *Monochamus*, como al movimiento de madera realizado por el hombre. Esto último, ha justificado la aparición repentina de focos a grandes distancias. Por este motivo, debe potenciarse la investigación para seguir buscando alternativas de control para esta enfermedad.

2. Métodos de control de la enfermedad.

La mejora genética como herramienta a medio-largo plazo

El saneamiento de los pinares es el pilar fundamental de los planes de contingencia actuales frente a la enfermedad del marchitamiento del pino. Además, el control de su insecto vector es, en estos momentos, la estrategia más eficaz a corto o medio plazo. De hecho, desde hace ya unos años se dispone de un cebo con alta capacidad de atracción que, empleado junto a una trampa eficiente para la captura de insectos vivos, ha permitido un sistema de trampeo muy eficaz (Pajares, 2020; *Figura 2A*). Esto permite tanto reducir la población del insecto vector como detectar la presencia de nematodos en el mismo. Sin embargo, conviene seguir avanzando en el desarrollo de cebos que atraigan a vectores inmaduros, ya que los existentes actualmente solo atraen a los insectos maduros sexualmente. Esto supone un problema importante en el caso de que sean portadores de nematodos, ya que se ha demostrado que su transmisión a árboles sanos se produce principalmente durante la alimentación de maduración. Otra medida de control sobre el vector que ha mostrado resultados esperanzadores, todavía en estudio, es la estrategia de autodiseminación de hongos entomopatógenos (como *Beauveria bassiana* y *B. pseudobassiana*) mediante el método «atrae e infecta» (*Figura 2B*). Esta estrategia parece reducir considerablemente la población del vector a escala forestal (Sacristán *et al.*, 2017).



Figura 2. Métodos de control de la enfermedad del marchitamiento del pino. A) Trampas empleadas para el trapeo masivo (crosstrap y multiembudo); B) Experimento de autodiseminación en campo (foto: Juan Pajares); C) Posible hongo nematófago, *Esteya vermicola*.



Si bien no existen actualmente medidas efectivas disponibles a escala forestal dirigidas directamente al control del nematodo (Pajares, 2020), se están estudiando algunas, como las inyecciones nematicidas para la protección de individuos de gran valor, y el empleo de hongos nematicidas como *Esteya vermicola* (*Figura 2C*), habiéndose obtenido buenos resultados hasta la fecha (Zhen *et al.*, 2017).

Todas las medidas descritas anteriormente están sirviendo para ralentizar la expansión de la enfermedad, pero no están consiguiendo erradicarla o limitarla únicamente a las zonas actualmente afectadas. En el caso de otras plagas o enfermedades, en ocasiones la medida más efectiva a largo plazo para luchar contra ellas ha sido el empleo de genotipos resistentes en nuevas plantaciones. Este es el motivo por el cual algunos programas de mejora desarrollan líneas de mejora genética frente a aquellas enfermedades que no se consiguen controlar lo suficiente mediante el empleo de otros métodos como los mencionados previamente.

Los programas de pino más avanzados han desarrollado con éxito líneas de mejora en la lucha contra plagas y enfermedades de gran impacto ecológico y/o económico. Este es el caso de *Pinus taeda* resistente a *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* en USA o *Pinus radiata* resistente a *Dothistroma pini* en Nueva Zelanda. Como fruto de estas líneas de mejora, se desarrollaron genotipos resistentes gracias a los cuales se redujeron considerablemente dichos impactos. En Japón ya se han seleccionado varios cientos de pinos de varias especies resistentes a la enfermedad del marchitamiento del pino (*Figura 3A*). La cepa de nematodo *B. xylophilus* empleada en la selección de dicho material fue escogida previamente como una de las más agresivas en un estudio de virulencia en el que se compararon distintas cepas, dado que se detectó que existía variabilidad genética entre ellas. Hoy en día hay instalados en Japón varias decenas de huertos semilleros de 1ª y 2ª generación. Fruto de este trabajo, en 2016 se plantaron en Japón más de 1 millón de plántulas de *P. thunbergii* y *P. densiflora* procedentes de estos huertos semilleros (Matsunaga, comunicación personal).

Previo al primer positivo de la enfermedad en Galicia en 2010, el Centro de Investigación Forestal de Lourizán consideró crucial iniciar una línea de mejora genética frente al nematodo dentro del programa de mejora genética de las especies pino marítimo y pino insigne. Para ello, a comienzos de 2011 dicho centro organizó y celebró una reunión internacional sobre la enfermedad, el «Nematode Day». Además, se acometieron las obras necesarias para poder realizar ensayos de inoculación artificial en los invernaderos de dicho centro y se solicitó financiación pública en una convocatoria nacional para iniciar dicha línea de mejora. Tras la concesión de la ayuda para la ejecución de los objetivos propuestos en el proyecto de investigación, los ensayos de inoculación en condiciones controladas de invernadero se iniciaron en 2013.

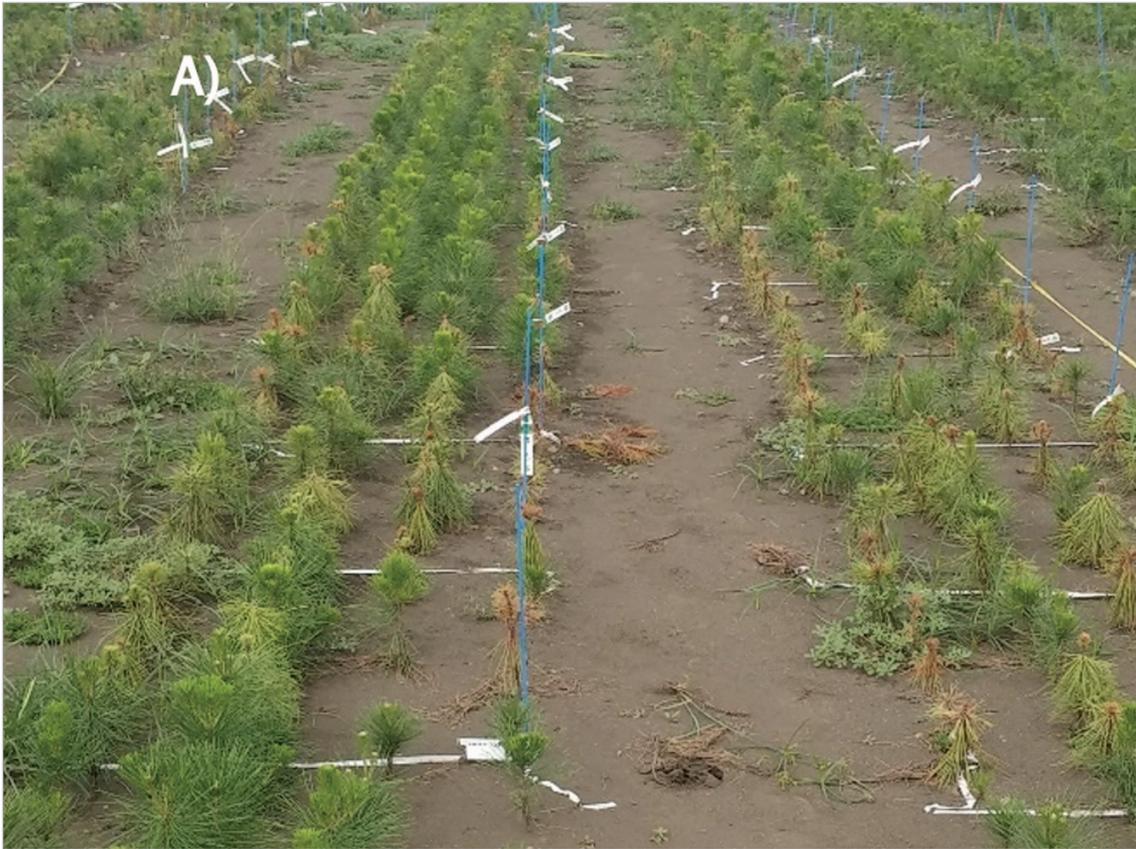


Figura 3. Ensayos de inoculación en distintas especie en *Pinus thunbergii* y *P. densiflora* dentro del programa de mejora genética de estas especies en Japón(A) y en distintas especies del género *Pinus* (B) y de distintas coníferas (C) en el invernadero del Centro de Investigación Forestal de Lourizán (CIF Lourizán).



3. Programa de mejora genética de *Pinus pinaster* y *Pinus radiata* del CIF Lourizán

3.1. Programa de mejora genética de P. pinaster

En 1953 y 1954 el Centro de Investigación Forestal de Lourizán (CIF Lourizán) estableció los primeros ensayos de procedencias de *P. pinaster*. En ellos se estudió el comportamiento de 24 procedencias de todo el rango de distribución de la especie. Los resultados obtenidos a los 9-10 años mostraron que la procedencia local, la de Pontevedra, destacaba por su crecimiento, rectitud y menor ramosidad (Molina-Rodríguez, 1965). Ante estos resultados y la creciente demanda de semilla de esta especie por el sector forestal gallego, CIF Lourizán inició en los años 80 un programa de mejora genética de pino marítimo. Dicho programa se planteó como un programa de mejora clásico por selección recurrente. La selección de los árboles se llevó a cabo en la región costera (región de procedencia 1a Noroeste-Costera). El objetivo de este programa era incrementar la producción de madera con el fin de dar apoyo y fomentar al sector forestal gallego. Inicialmente se preseleccionaron 180 árboles superiores, de los cuales finalmente fueron seleccionados 116. Estos se eligieron en base a su mayor crecimiento y rectitud y por su menor espesor de corteza.

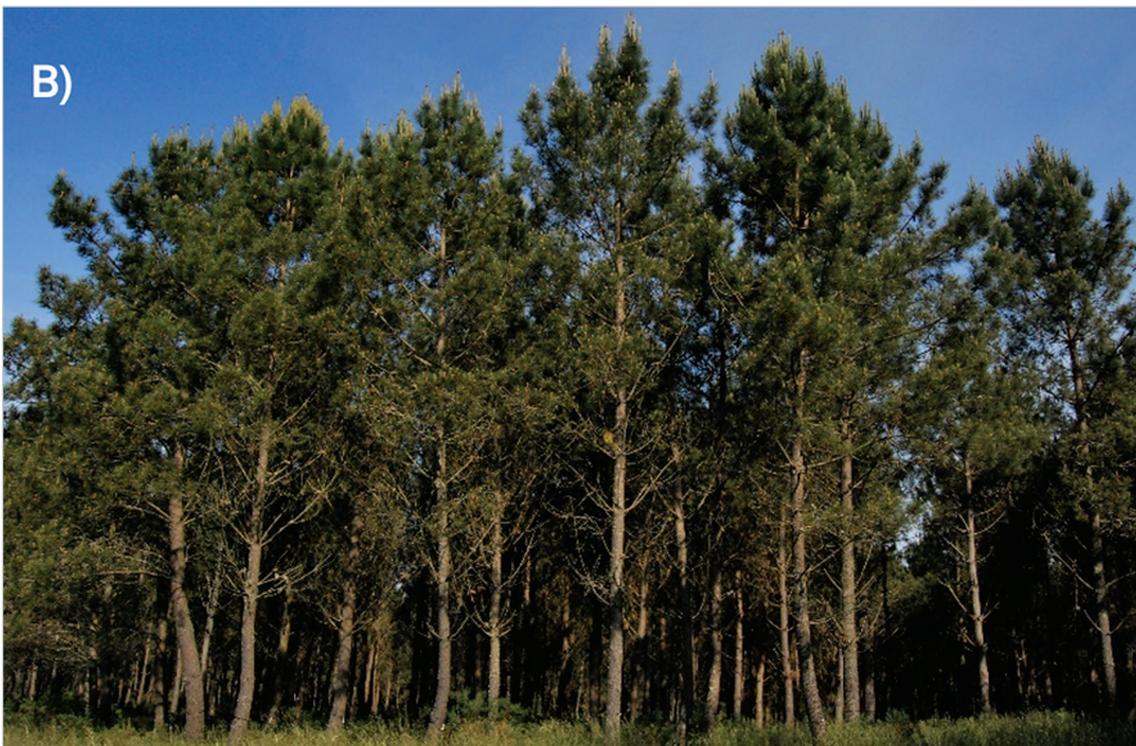
En 1991 se estableció el primer huerto semillero (H.S. Sergude), siguiendo un diseño de bloques completos al azar con 10 bloques, 116 clones y 1 árbol por unidad experimental. En 1998 se estableció el segundo huerto (H.S. Monfero) con el mismo diseño que el anterior (*Figura 4*). Ambos fueron incluidos en el Catálogo Nacional de Materiales de Base (CNMB) en 2001 y 2007, respectivamente. Paralelamente, con semilla recogida de los árboles superiores inicialmente y del H.S. Sergude cuando este entró en producción, CIF Lourizán estableció 19 ensayos de progenies entre 1995 y 2005. Estos ensayos se ubicaron por toda Galicia con el fin de evaluar el comportamiento (supervivencia, crecimiento, forma, resistencia a enfermedades, ...) de sus progenies.

En 2008, tras el análisis de los datos tomados a los 8 años de edad de los cuatro ensayos más antiguos (establecidos en 1995), se estableció un nuevo huerto semillero clonal depurado o de generación 1,5. En él se incluyeron únicamente los 79 mejores clones seleccionados en base a su rectitud de fuste. La semilla de dicho huerto presenta una ganancia de un 3% en rectitud en comparación a la procedente de los otros dos huertos descritos anteriormente. Este nuevo huerto clonal se incluyó en el CNMB en 2009 en la categoría de controlado.

Posteriormente, entre 2016 y 2019, se incluyeron también en el CNMB, en la categoría controlada, tres nuevos huertos semilleros, esta vez de brinzales. Dichos huertos proceden de tres de los ensayos de progenies establecidos en 1995. El análisis de datos de 10 ensayos de progenie permitió transformar estos ensayos más antiguos en huertos semilleros de brinzales (H. S. As Neves, H. S. Gomesende y H. S. Lalín), previa clara genética. La semilla de estos nuevos huertos se estima que tenga una ganancia máxima de 5,3 y 2,9% en crecimiento en volumen y rectitud, respectivamente, con respecto a la procedente de fuentes semilleras identificadas gallegas.



Figura 4. Huertos semilleros del programa de mejora gallego de *P. pinaster*. A) H.S. A Braxe (instalado en 2008), y B) H. S. Gomesende (antiguo ensayo de progenies instalado en 2005).



En comparación con la de los huertos semilleros cualificados, la ganancia máxima se prevé del 3,1 y 0,6%, respectivamente.

De los seis huertos semilleros establecidos hasta la fecha, actualmente cuatro se encuentran activos, pues H.S. Sergude se cortó hace unos años por presencia de *Fusarium circinatum* en su semilla y H.S. As Neves se quemó en los fatídicos incendios ocurridos en Galicia en octubre de 2017, poco después de su inclusión en el CNMB.

Como ya se ha comentado, en la última década, además de catalogar nuevos huertos semilleros en la categoría controlada para ofrecer planta mejorada al sector forestal, se ha iniciado una línea de mejora genética de resistencia al marchitamiento del pino causado por el nematodo. Además, se han estudiado variables de calidad de madera (densidad básica y módulo de elasticidad) y se ha iniciado, en colaboración con la empresa maderera Finsa, un programa de mejora silvícola. Su objetivo principal es determinar las labores silvícolas más adecuadas para los genotipos mejorados genéticamente.

3.2. Programa de mejora genética de *P. radiata*

En 1992 CIF Lourizán inició un programa de mejora genética de pino insigne debido al aumento de plantaciones de esta especie en Galicia. Estas procedían de lotes de semilla no mejorada. El fin de este programa era evaluar la variabilidad genética existente en Galicia e incrementar la calidad y el rendimiento de las plantaciones futuras.

En un primer lugar se seleccionaron 48 rodales por considerarse fenotípicamente superiores con respecto al resto de rodales existentes en Galicia. Entre 1992 y 1993 se llevó a cabo en dichos rodales una selección masal o de comparación de los mejores árboles (Zobel y Talbert, 1988), escogiéndose así 68 árboles superiores. En 1997 se seleccionaron 20 árboles superiores más, hasta alcanzar un total de 89. En ese mismo año, se inició el establecimiento de un huerto semillero clonal siguiendo un diseño de bloques completos al azar con 10 bloques, 68 clones y un individuo por unidad experimental. Sin embargo, este huerto nunca llegó a incluirse en el CNMB por detectarse en 2005 en el H.S. Sergude de *P. pinaster*, colindante a este, la presencia de *F. circinatum* (organismo de cuarentena en la Unión Europea), justo cuando estaba entrando en producción. De hecho, los individuos que componían el nuevo huerto de radiata mostraban síntomas de chancro y decaimiento.

En los años 2001 y 2002 se instalaron tres ensayos de progenies a partir de la semilla recogida en 49 de los 89 árboles superiores. No se pudieron incluir las progenies del resto de árboles seleccionados por haber sufrido cortas o incendios en el periodo comprendido entre su selección como árbol superior y la recogida de la semilla en 1999. En estos ensayos de progenie se incluyeron también seis progenies del programa de mejora del País Vasco, así como tres lotes comerciales, dos de Galicia y uno del País Vasco.

Debido a la pérdida de los clones de los árboles superiores originales por presencia de *F. circinatum*, pues solo se encontraban representados en el que iba a ser huerto semillero en Sergude, se decidió hacer una selección de 1-2 individuos de

cada progenie en el ensayo de progenies en el que la especie presentaba mejor comportamiento (crecimiento en volumen y forma) y mayores diferencias entre progenies. De esta forma, se seleccionaron un total de 65 genotipos que pasaron a formar la población principal de mejora de 2ª generación. Esta nueva selección se hizo en base al crecimiento, forma, ramosidad y estado sanitario de los individuos de dicho ensayo.

Paralelamente, a finales de la década del 2000, la Dirección General de Montes, perteneciente a la Consellería de Medio Rural, llevó a cabo una selección de 114 árboles de *P. radiata* en seis plantaciones de esta especie que se habían plantado con material procedente del programa de mejora genético de Nueva Zelanda. Con los clones de estos árboles se estableció el huerto semillero clonal de Tui y con planta procedente de su semilla dos huertos semilleros de brinzales, H.S. Monfero y H.S. Laracha. Todos estos huertos fueron registrados en el CNMB en la categoría de cualificados en 2010.

4. Línea de mejora genética frente al nematodo del CIF Lourizán

La declaración de Portugal continental como zona demarcada en 2008 y la aparición del primer foco en España ese mismo año, promovieron la iniciativa del comienzo de una línea de resistencia o tolerancia a la enfermedad del marchitamiento del pino dentro de los programas de mejora de pino marítimo y pino insigne. En 2013 se comenzaron a realizar los ensayos de inoculación en invernadero bajo condiciones controladas, una vez adaptados estos para la ejecución de este tipo de ensayos y conseguida la financiación necesaria para los mismos. Desde entonces, el objetivo de esta línea de mejora ha sido ahondar en el conocimiento de la enfermedad y obtener genotipos resistentes para suministrárselos al sector forestal.

4.1. Evaluación de la susceptibilidad de P. pinaster y P. radiata en comparación con otras especies de interés en España

Ambas especies, pino marítimo e insigne, corren un gran riesgo de daño por la enfermedad del marchitamiento del pino, debido a su susceptibilidad al nematodo del pino.

En un primer estudio se evaluaron plántulas de distintas especies de pinos de interés en España (*P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. radiata* y *P. sylvestris*) frente a una especie americana considerada resistente a este nematodo (*P. taeda*). El análisis de los resultados obtenidos permitió establecer tres grupos de susceptibilidad: muy susceptible (*P. sylvestris*, con 80% de mortalidad), susceptible (*P. pinaster* y *P. radiata*, con 65 y 40%, respectivamente) y poco o nada susceptible (resto de especies con 0%, excepto *P. pinea* con 15% de mortalidad) (Menéndez-Gutiérrez *et al.*, 2018b; *Figura 3B*). Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los alcanzados por otros autores (Daub, 2008; Nunes da Silva *et al.*, 2015), si bien *P. canariensis* nunca había sido estudiado antes. En condiciones naturales, también se ha observado que la especie *P. pinea* no padece la enfermedad, mientras que

P. pinaster tiene una mortalidad elevada (Figura 5). En un segundo ensayo de especies, se estudiaron de nuevo *P. pinaster* y *P. radiata* en comparación con otras coníferas de posible interés para el sector (*Cryptomeria japonica*, *Pseudotsuga menziesii*, *Sequoia sempervirens* y *Thuja plicata*). Este estudio volvió a mostrar la susceptibilidad de ambas especies de pino, mientras que las demás coníferas se mostraron resistentes (LSMeans de la mortalidad $> 65\%$ e $= 0\%$, para ambos pinos y resto de coníferas, respectivamente, según el análisis de medidas repetidas) (Díaz et al., 2017: Figura 3C). Si bien algunas plántulas de estas especies resistentes presentaron nematodos vivos tras más de dos meses de su inoculación, lo que significa que estas especies podrían ser un reservorio para el nematodo, aunque bajas densidades de nematodo suelen producir bajas tasas de infección de vectores, por lo que sería difícil que ocurriesen nuevas infecciones (Forge y Sutherland, 1996). En el estudio realizado por estos autores se comprobó que, tras la inoculación artificial de trozas de *T. plicata*, no se desarrollaron larvas dauer de dispersión, imprescindibles para transmitir la enfermedad entre árboles. De hecho, el género *Thuja*, al igual que *Taxus*, es uno de los géneros de coníferas exento de que se le apliquen medidas de control frente al nematodo y sus vectores (Eppo, 2012).

El análisis de los compuestos químicos constitutivos de las distintas especies de pino en el primer ensayo de inoculación mostró que el nitrógeno y los polifenoles totales del xilema estaban negativamente correlacionados con la mortalidad causada por el nematodo (Menéndez-Gutiérrez et al., 2018b). El papel del nitrógeno constitutivo en el xilema podría estar relacionado con la producción de fitoalexinas, puesto que para su síntesis se usa nitrógeno (Zimmerman-Lax et al., 2015), y algu-

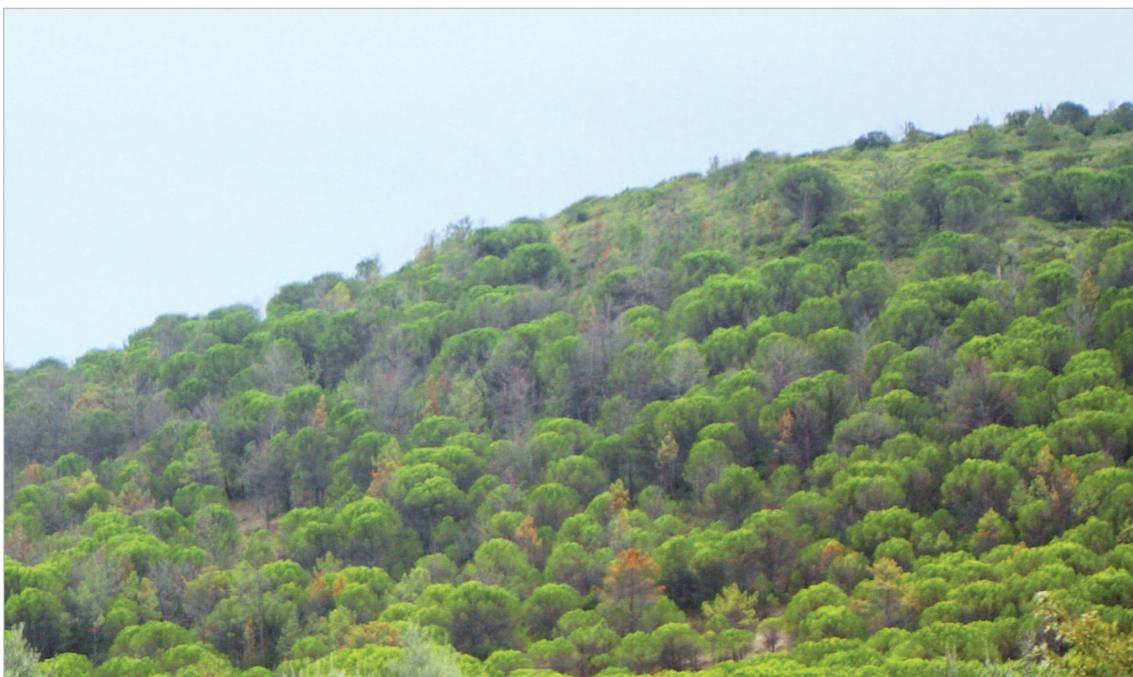


Figura 5. Masa mixta de *Pinus pinaster* y *P. pinea* afectada por la enfermedad del marchitamiento del pino. Resaltar que los individuos de *P. pinea* no presentan síntomas ni mortalidad.

nas han demostrado tener un papel nematocida afectando a la multiplicación del nematodo (Hanawa *et al.*, 2001). Pimentel *et al.* (2016) también destacaron el papel del nitrógeno en la resistencia este patógeno, no obstante, sus resultados mostraron que altos niveles de este compuesto en el floema aumenta la población de nematodo.

4.2. Variación genética interpoblacional en *P. pinaster*

Dos grupos de ensayos de procedencias de *P. pinaster* se han realizado hasta la fecha para estudiar la variabilidad intraespecífica en esta especie. Ambos grupos han mostrado una variabilidad genética entre procedencias altamente significativa. En el primer grupo de ensayos se evaluaron seis procedencias de orígenes geográficos muy diversos (Noroeste-Litoral, Gredos, Soria-Burgos y Oria, de España; Leiría, de Portugal; y Mimizán, de Francia; Menéndez-Gutiérrez *et al.*, 2017b), mientras que en el segundo grupo se evaluaron 32 procedencias del rango de distribución de la especie (Torres-Sánchez *et al.*, 2022). En el primer estudio se concluyó que las procedencias correspondientes al grupo genético Costa Atlántica de la Península Ibérica, es decir la gallega Noroeste-Costera y la portuguesa Leiría, eran las dos más susceptibles de entre las evaluadas (Menéndez-Gutiérrez *et al.*, 2017b). Estas mismas procedencias también fueron de las más susceptibles en el segundo grupo de ensayos, si bien en este caso destacó la procedencia F, de Oria, como la más susceptible, con un 95% de mortalidad, mientras que la procedencia ES20, de Sierra Bermeja, fue la menos afectada, no habiendo muerto ninguna planta de la misma e, incluso, sin haber mostrado ningún tipo de síntomas (Torres-Sánchez *et al.*, 2022).

En el primer estudio se encontraron correlaciones genéticas significativas de forma que las procedencias más resistentes fueron las de mayor diámetro, mayor ramosidad y las que exudaron mayor cantidad de resina. Yamanobe (2009) sugirió que mayores diámetros y mayor número de ramas pueden actuar como factores de resistencia. Las oleorresinas son importantes defensas químicas de las coníferas, que ayudan a repeler organismos y pueden tener propiedades fúngicas (Phillips y Croteau, 1999). Los análisis de las 32 procedencias mostraron una correlación positiva entre las variables de crecimiento en altura y la susceptibilidad al nematodo, relación que también se ha encontrado en algunos estudios a nivel familiar (Menéndez-Gutiérrez *et al.*, 2018a).

Menéndez-Gutiérrez *et al.* (2017b) resaltaron que las procedencias más resistentes procedían de lugares con mayor temperatura máxima en verano, mientras que Torres-Sánchez *et al.* (2022) indican que podría haber un gradiente noroeste – sur relacionado con la resistencia, por lo que subrayan la importancia de realizar un estudio geoclimático para tratar de relacionar la resistencia a esta enfermedad con algún parámetro de origen. Diversos trabajos han mostrado algún tipo de patrón clinal entre la susceptibilidad a plagas o enfermedades y el origen de las poblaciones (Morgenstern, 1996).

Puesto que algunas procedencias han mostrado tener una menor susceptibilidad que la procedencia Noroeste-Costera, de la que procede la población principal de mejora gallega de *P. pinaster*, se podría plantear la idea, en caso de considerarse de interés, de crear genotipos a partir de cruces controlados. Algunos autores han in-

dicado la realización de cruces intraespecíficos entre árboles resistentes de especies de pino susceptibles como *P. densiflora* y *P. thunbergii* y también cruces interespecíficos con especies resistentes como *Pinus tabulaeformis* x *P. densiflora* y *Pinus mugo* x *P. thunbergii* (ZHAO *et al.* 2008).

4.3. *Variación genética de la población principal de mejora de P. pinaster*

La población principal de mejora gallega de pino marítimo, procedente de una selección realizada sobre la procedencia ES01a-Noroeste-Costera, fue evaluada en diversos ensayos de inoculación en condiciones controladas de invernadero. Se encontraron diferencias significativas entre familias en resistencia al nematodo, obteniéndose valores de 0,25 y 0,59 para las heredabilidades individual y familiar, respectivamente (Menéndez-Gutiérrez *et al.*, 2018a). Esto indica que la línea de resistencia al nematodo iniciada en 2013 dentro del programa de mejora genética de *P. pinaster* puede ser una buena estrategia para el manejo de la enfermedad del nematodo del pino para esta especie, igual que lo está siendo en otras especies de pino asiático como *P. densiflora* y *P. thunbergii* (Toda y Kurinobu, 2002; Matsunaga *et al.*, 2020). Sin embargo, conviene tener muy en cuenta las relaciones encontradas a nivel genético entre la susceptibilidad a la enfermedad y el crecimiento en altura (relación significativamente positiva), así como con la ramosidad (relación significativamente negativa). De ser ciertas, podría estar ocurriendo que la selección por mayor crecimiento y menor ramosidad realizada hasta la fecha en el programa de mejora gallego pudiese haber llevado consigo una selección negativa por susceptibilidad al nematodo. Sin embargo, el estudio llevado a cabo por Torres-Sánchez *et al.* (2022) muestra que las plántulas de H.S. A Braxe (HSC26001), empleadas como material mejorado testigo en dicho ensayo, tuvieron una mayor supervivencia predicha que cualquiera de las dos procedencias gallegas, Noroeste-Costera y Noroeste-Interior, por lo que no ha habido hasta ahora selección negativa en el programa de mejora gallego, aunque el carácter de selección principal de dicho programa fuera el crecimiento. Sin embargo, a partir de ahora, una vez incluida la resistencia al nematodo como carácter de selección en el programa de mejora, habrá que tener en cuenta esta posible relación negativa y seleccionar aquellos genotipos que destaquen por su resistencia a la enfermedad, pero que dicha selección no suponga un impacto en la ganancia por crecimiento o que este sea el mínimo posible. Otros estudios como los realizados por Yamanobe (2009) no encontraron ninguna relación significativa entre crecimiento y susceptibilidad al nematodo a nivel genético cuando trabajaron con pinos asiáticos, mientras que Carrasquinho *et al.* (2018) solo encontraron una relación positiva, pero a nivel fenotípico. Este tipo de correlaciones negativas entre la resistencia a enfermedades y el crecimiento, de corroborarse en otros estudios que se realicen, apoyan la teoría de compensación crecimiento-defensa de las plantas (Huot *et al.*, 2014). En cuanto a la relación negativa entre ramosidad y susceptibilidad, hay autores que la justifican por existir una mayor maraña de canales resiníferos en las uniones de las ramas cuanto mayor sea el número de estas y suponer una dificultad en la migración de los nematodos (Kuroda, 2004; Kawa-

guchiA y Ichihara, 2010). Sin embargo, no todos los estudios han encontrado esta relación genética (Kusumoto *et al.*, 2014).

4.4. *Inclusión en el CNMB de los primeros progenitores de familia resistentes*

Tras la comprobación de que la susceptibilidad al nematodo era un carácter heredable y una vez realizados un total de cinco ensayos de inoculación con familias del programa de mejora de *P. pinaster*, se procedió al análisis conjunto de los cinco ensayos con el fin de seleccionar las familias con mayor resistencia (EBLup) y mayor estabilidad en el tiempo. Debido a que las familias evaluadas pertenecían al programa de mejora gallego, también se disponía de datos de crecimiento en volumen y de rectitud de fuste de dichas familias en ensayos de progenies en campo. Así pues, se analizaron los datos de susceptibilidad al nematodo en plántulas de 2-4 años y de crecimiento en volumen y forma de planta tras 10-12 años en campo. Fruto de estos análisis de datos tres familias destacaron por su alta resistencia al nematodo y además mostraron tener un mayor crecimiento en volumen y una mejor rectitud que la media.

La descripción de todo el proceso de inclusión de estas familias como progenitores de familias en la categoría de cualificado en el Catálogo Nacional de Materiales de Base (CNMB) se detalla Menéndez-Gutiérrez *et al.* (2022). Como conclusión se puede decir que debido a que estas tres familias se encuentran plantadas en dos ubicaciones distintas, se inscribieron en el CNMB un total de seis progenitores de familia (con códigos PF-Q-26/15/001 a PF-Q-26/15/006), los cuales tienen una supervivencia media al nematodo del 78% y presentan una ganancia media en volumen del 17%, si se compara con fuentes semilleras gallegas identificadas.

Al ser el nematodo del pino un organismo de cuarentena en UE, la mayor resistencia al nematodo de estos progenitores no se ha podido comprobar a edades adultas en condiciones naturales. Sin embargo, estudios como los de Barrows-Broadus y Dwinell (1984) y Butcher *et al.* (1984) han mostrado correlaciones significativas para la resistencia a enfermedades entre ensayos de progenies en invernadero y en huertos clonales. Asimismo, en los programas asiáticos de mejora genética frente al nematodo que se encuentran más avanzados que el nuestro se ha comprobado que los clones seleccionados a edades tempranas mantienen su supervivencia de adultos años después de haberse plantado en campo (Matsunaga, comunicación personal).

4.5. *Variación genética de la población principal de mejora de P. radiata de 2ª generación*

Los resultados obtenidos por Menéndez-Gutiérrez *et al.* (2021a) fundamentan el inicio una línea de mejora por resistencia al nematodo para *P. radiata*. En este estudio se analizaron tres ensayos de inoculación en el que se evaluaron 44 de las 65 familias que componen la población principal de mejora gallega de 2ª generación de pino insigne. Este carácter mostró un fuerte control genético de ($h^2 = 0,43$, $hf^2 =$

0,72; Menéndez-Gutiérrez *et al.*, 2021a), similar al obtenido en otros estudios (Carrasquinho *et al.*, 2018; Toda y Kurinobu, 2002) y mayor, incluso, que el encontrado para pino marítimo (Menéndez-Gutiérrez *et al.*, 2018a). Esto unido a la falta de interacción genotipo x ambiente significativa facilita la selección por este carácter. La supervivencia predicha osciló entre 24 y 75%, según la familia. En el caso de que se seleccionasen las siete mejores familias, se elevaría dicha supervivencia por encima del 65%. Todo esto indica que, al igual que para pino marítimo, la mejora genética por resistencia al nematodo puede ser una herramienta clave en el control de la enfermedad en esta especie, al igual que ya se demostró en especies de pino asiáticas (Toda y Kurinobu, 2002; Matsunaga *et al.*, 2020). Otros programas de mejora genética de *P. radiata* de países donde esta especie es muy importante económicamente, han desarrollado líneas de mejora por resistencia a otras plagas y enfermedades, como, por ejemplo, *Cyclaneusma minus* y *Dothistroma pini* (Burdon *et al.*, 2008), pues en estos casos también se ha demostrado un fuerte control genético.

El estudio de algunos compuestos químicos constitutivos mostró que los taninos condensados, los carbohidratos solubles y el manganeso pueden tener un papel en la resistencia del pino insigne al nematodo (Menéndez-Gutiérrez *et al.*, 2021a).

4.6. Estudio de la virulencia de distintas cepas de nematodo en *P. pinaster* y *P. radiata*

Diversos estudios como el de Kiyohara y Bolla (1990) mostraron que hay diferencias significativas entre cepas de nematodo en la patogenicidad de pinos asiáticos, siendo unas avirulentas, mientras que otras producen un 100% de mortalidad.

Una vez demostrada la variación genética intraespecífica en *P. pinaster* y *P. radiata* en resistencia al nematodo y, habiendo obtenido un grupo de familias de pino marítimo resistentes candidatas a ser incluidas en el CNMB como progenitores de familia, se procedió a comprobar el grado de virulencia de la cepa gallega empleada en los ensayos de inoculación en comparación con otras cepas que ya habían demostrado su virulencia en campo. El objetivo de este estudio era evaluar la existencia de variación genética entre cepas de nematodo para los hospedantes *P. pinaster* y *P. radiata* y, en caso de existir, determinar el grado de virulencia de la cepa gallega empleada en los ensayos, de forma que si existiese otra cepa más agresiva se seleccionaría para su empleo en posteriores ensayos. Así se confirmaría que los genotipos que se escogiesen como resistentes lo serían incluso para las cepas más virulentas.

De este modo, se comparó la virulencia de siete cepas de nematodo procedentes de todo el mundo (SpPO1 y SpSA1 de España, USA745 de USA, KA4 y S10 de Japón y Pt52T y Pt72CH de Portugal), previamente conocidas como patogénicas, en un nuevo ensayo de inoculación en el que se emplearon plántulas de pino marítimo y pino insigne de 2 años de edad. Se encontraron diferencias significativas entre cepas, especies y su interacción (Menéndez-Gutiérrez *et al.*, 2021b). En general, tanto la sintomatología como la mortalidad fueron mayores y tuvieron una evolución más rápida en *P. pinaster* que en *P. radiata*. En el caso de *P. pinaster*, una de las cepas portuguesas estudiadas (Pt52T) fue la más agresiva, si bien las cepas españolas no

fueron significativamente diferentes a esta. Por el contrario, en el caso de *P. radiata*, la cepa japonesa S10 fue la más virulenta, aunque solo fue significativamente diferente a la de Salamanca (SpSA1). En cuanto a la densidad de nematodos recuperados al final del ensayo, medidos en nº nematodos por gramo de peso seco, este fue mayor en pino marítimo que en pino insigne.

En este ensayo también se estudió la posibilidad de evaluar la virulencia de las cepas mediante otros métodos más sencillos y rápidos como son el crecimiento de la población en PDA con *Botrytis cinerea* durante 7 días y en rama cortada durante 10 días. Sin embargo, solo se encontró correlación significativa entre el ensayo en planta entera y el de rama cortada de *P. pinaster*, por lo que ni el crecimiento de la población de nematodos en placas Petri sobre *B. cinerea* ni en rama cortada de *P. radiata* mostraron ser metodologías útiles para evaluar la virulencia de las cepas. Estos resultados difieren con los de otros autores (Aikawa y Kikichi, 2007) que sí encontraron correlación entre estos métodos no destructivos y los ensayos en planta entera, si bien el grado de virulencia de las cepas empleadas en dichos estudios era mucho más variable, pues comparaban cepas avirulentas, medias y virulentas.

Como conclusión conviene destacar que la cepa gallega SpPO1 puede seguir usándose en los programas de mejora genética de *P. pinaster* y *P. radiata* por su alto grado de virulencia. Además, de entre las metodologías sencillas, rápidas y no destructivas evaluadas, únicamente la metodología de inoculación en rama cortada de *P. pinaster* mostró ser suficientemente fiable para evaluar la virulencia de nuevas cepas para esta especie.

4.7. Metodologías alternativas a la evaluación de daños por nematodo

La metodología más comúnmente utilizada para la evaluación de la susceptibilidad al nematodo es la inoculación artificial en planta entera. En estos ensayos, la evaluación más empleada es el examen visual de la evolución de la sintomatología. Sin embargo, otras metodologías han mostrado también su posible interés encontrándose incluso diferencias entre distintos grados de afección por la enfermedad, días o, incluso, semanas antes de que aparezcan los síntomas visuales. Este es el caso de la exudación de oleoresina, en el que se mide la cantidad exudada (Oda, 1967). Según Asai y Futai (1996) al alimentarse los nematodos de las células epiteliales de los canales resiníferos, la resina se filtra de los canales resiníferos a las traqueidas bloqueando el flujo de resina y afectando a la síntesis de nueva resina. Menéndez-Gutiérrez *et al.* (2018a) e Ikeda y Kiyohara (1995) observaron que el cese del flujo de resina se producía antes de que se detectasen los primeros síntomas visuales de daño. La medición de la fluorescencia de la clorofila es otra metodología empleada en planta entera para la detección de enfermedades (Bauer *et al.*, 2000) u otros factores que causan estrés a las plantas (Mohammed *et al.*, 2003), habiéndose propuesto también para detectar la afección por nematodo, antes de que la planta muestre síntomas visuales (Melakeberhan *et al.*, 1991). De hecho, Menéndez-Gutiérrez (2018a) destacaron que esta variable mostraba una correlación significativa importante con la mortalidad causada por el nematodo, agrupando incluso los individuos

en los mismos grupos que los de evaluación visual del daño, lo cual indica que la fotosíntesis se ralentiza según avanza el nivel de daño (Fukuda, 1997).

Para las especies asiáticas se ha comprobado la posibilidad de evaluar la susceptibilidad al nematodo mediante técnicas no destructivas en las que no se emplea la planta entera, las cuales, además de ser más rápidas, tienen la ventaja de que permiten evaluar material adulto, el cual no puede evaluarse en invernadero. Matsunaga *et al.* (2011) y Menéndez-Gutiérrez *et al.* (2017a) diferenciaron genotipos resistentes de susceptibles de *P. densiflora* y *P. thunbergii*, respectivamente, mediante el conteo de nematodos que atraviesan una vareta de 5 cm de longitud. Sin embargo, esta misma metodología no ha mostrado diferencias significativas cuando se ha empleado para comparar genotipos resistentes (progenitores de familia) y muy susceptibles del programa de mejora gallego de pino marítimo (datos no mostrados). De igual forma, otra metodología no destructiva como es la multiplicación de nematodos inoculados en rama cortada de 30 cm, la cual se deja incubando durante 2-3 semanas, pasadas las cuales se realiza el conteo de los mismos, tampoco mostró diferencias significativas cuando se compararon genotipos resistentes frente a muy susceptibles de pino marítimo. Por el contrario, esta última metodología sí mostró muy buenos resultados cuando se compararon especies de pino, coincidiendo la clasificación obtenida con la resultante del ensayo de inoculación en invernadero en planta entera (datos no mostrados).

5. Conclusiones

La enfermedad del marchitamiento del pino es una amenaza muy importante para las masas de pino en España y en Europa. Lo es tanto a nivel ecológico, lo cual se ha comprobado en las masas de especies muy susceptibles en los países afectados, como económico, causando cuantiosas pérdidas en dichos países. Diversas son las herramientas para su contención y control empleadas hasta la fecha, si bien no ha sido posible evitar su expansión, tan solo ralentizarla. La mejora genética es una herramienta de control que se está empleando ya en los países asiáticos afectados por la enfermedad, habiendo mostrado buenos resultados en especies muy susceptibles, como *P. densiflora* y *P. thunbergii*. Los trabajos desarrollados en CIF Lourizán, dentro del programa de mejora genética de *P. pinaster* y *P. radiata* de este centro, muestran que la resistencia al nematodo está sometida a control genético en ambas especies. Esto ha hecho posible iniciar una línea de mejora por este carácter, habiéndose obtenido un grupo de genotipos de pino marítimo con una mayor resistencia a la enfermedad. Estos materiales han sido ya incluidos en el CNMB como progenitores de familia en la categoría cualificada. De hecho, la Xunta de Galicia ya está realizando plantaciones con este material en las zonas de mayor riesgo de expansión de la enfermedad. Esta línea de investigación sigue avanzando en busca de nuevos genotipos todavía más resistentes.

Agradecimientos

Agradecemos a Ricardo Ferradás Crespo y a María Francisca Ignacio Quinteiro su apoyo en los trabajos de vivero y laboratorio. Este trabajo es fruto de múltiples ensayos han sido financiados por tres proyectos nacionales de financiación pública (RTA 2011-0069-C03 “NEMOPIN”, RTA2014-00042-C02-02 “NEMOCONTROL” y RTA2017-00012-C02-00, “NEMOPLAN”). así como por una Acción de Cooperación del AGACAL financiada un 75% por fondos FEADER (AC2020-10), el Plan de Innovación y Mejora Forestal de Galicia 2010-2020 y varios convenios de colaboración con la empresa INDITEX.

6. Referencias

- Aikawa, T.; Kikuchi, T.; 2007. Estimation of virulence of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) based on its reproductive ability. *Nematology*. 9 (3), 371-377. <https://doi.org/10.1163/156854107781352007>
- Asai, E.; Futai, K.; 1996. The characteristics of oleoresin exudation amount from the trunks of pine trees. *J. For. Res.* 1, 87–91. <https://doi.org/10.1007/BF02348309>
- Barrows-Broadus, J.; Dwinell, L.D.; 1984. Variation in Susceptibility to the Pitch Canker Fungus Among Half-Sib and Full-Sib Families of Virginia Pine. *Phytopathology*, 74(4): 438-444. <https://doi.org/10.1094/Phyto-74-438>
- Bauer, H.; Plattner, K.; Volgger, W.; 2000. Photosynthesis in Norway spruce seedlings infected by the needle rust *Chrysomyxa rhododendri*. *Tree Physiol.* 20, 211–216. <https://doi.org/10.1093/treephys/20.3.211>
- Bonifácio, L.; 2016. Pine wilt disease in Portugal. In IUFRO Pine Wilt Disease International Working Party 7.02.10., 72–81.
- Burdon, R.D.; Carson, M.J.; Shelbourne, C.I.A.; 2008. Achievements in forest tree genetic improvement in Australia and New Zealand 10: *Pinus radiata* in New Zealand. *Aust. For.* 71: 263–279. <https://doi.org/10.1080/00049158.2008.10675045>
- Butcher, T.B.; Stukely, J.C.; Chester, G.W.; 1984. Genetic variation in resistance of *Pinus radiata* to *Phytophthora cinnamomi*. *For. Ecol. Manag.* 8 (3-4): 197-220. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(84\)90053-7](https://doi.org/10.1016/0378-1127(84)90053-7)
- Cang-Sang, P.; 2011. Development of studies on pinewood nematodes disease. *Journal of Xiamen University Natural Science* 50, 476–483.
- Carrasquinho, I.; Lisboa, A.; Inácio, M.L.; Gonçalves, L.; 2018. Genetic variation in susceptibility to pine wilt disease of maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton) half-sib families. *Ann For. Sci.*, 75: 85. <https://doi.org/10.1007/s13595-018-0759-x>
- Daub, M.; 2008. Investigations on pathogenicity, invasion biology and population dynamics of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner und Buhner 1934) Nickle 1970 in European conifers. Tesis doctoral. Universidad de Bonn, Alemania, 1-111.
- De La Fuente, B.; Beck, P.S.A.; 2018. Invasive Species May Disrupt Protected Area Networks: Insights from the Pine Wood Nematode Spread in Portugal. *Forest*, 9: 282-297. <https://doi.org/10.3390/f9050282>

- Díaz, R.; Soutullo, P.; Molina, B.; Alonso, M.; 2017. Susceptibilidad de seis especies de coníferas al marchitamiento del pino causado por *Bursaphelenchus xylophilus*. 7º CFE, Plasencia, 1-472.
- EPPO. (2012). New outbreak of *Bursaphelenchus xylophilus* in Spain. EPPO reporting service 03.
- Forge, T.A.; Sutherland, J.R.; 1996. Population dynamics of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in excised branch segments of western North American conifers. *Fundam. Appl. Nematol.* 19, 349-356.
- Fukuda, K.; 1997. Physiological process of the symptom development and resistance mechanism in pine wilt disease. *J. For. Res* 2, 171–181. <https://doi.org/10.1007/BF02348216>
- Han, H.; Nam, Y.; Lee, S.; 2021. Current situation of the pine wilt disease in South Korea. *International Symposium IUFRO on Pine Wilt Disease. Online.* 22-26 noviembre 2021.
- Hanawa, F.; Yamada, T.; Nakashima, T.; 2001. Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Phytochemistry*, 57 (2), 223–228. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00514-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00514-8)
- Hoshi, H.; 2016. Pine wilt disease in Japan. In IUFRO Pine Wilt Disease International Working Party 7.02.10, 57–60.
- Huot, B.; Yao, J.; Montgomery, B.L.; He, S.Y.; 2014 Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Mol. Plant.* 7, 1267–1287. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu049>
- Ikeda, T.; Kiyohara, T.; 1995. Water relations, xylem embolism and histological features of *Pinus thunbergii* inoculated with virulent or avirulent pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *J. Exp. Bot.* 46, 441–449. <https://doi.org/10.1093/jxb/46.4.441>
- Kawaguchi, E.; Ichihara, Y.; 2010. Inhibition of *Bursaphelenchus xylophilus* migration at the nodes of *Pinus thunbergii*. *J. Jpn. For. Soc* 92, 1–7. <https://doi.org/10.4005/jjfs.92.1>
- Kiyohara, T.; Bolla, R.I.; 1990. Pathogenic variability among populations of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *For. Sci.* 36, 1061–1076.
- Kuroda, K.; 2004. Inhibiting factors of symptom development in several Japanese red pine (*Pinus densiflora*) families selected as resistant to pine wilt. *J. For. Res.* 9, 217–224. <https://doi.org/10.1007/s10310-004-0076-0>
- Kusumoto, D.; Yonemichi, T.; Inoue, H.; Hirao, T.; Watanabe, A.; Yamada, T.; 2014 Comparison of histological responses and tissue damage expansion between resistant and susceptible *Pinus thunbergii* infected with pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *J. For. Res.* 19, 285–294. <https://doi.org/10.1007/s10310-013-0417-y>
- Li, Y.X.; Zhang, X.Y.; 2021. Current situation and research progress Pine Wilt Disease in China. *International Symposium IUFRO on Pine Wilt Disease. Online.* 22-26 November 2021.
- Matsunaga, K.; Maezono, H.; Tamaki, S.; Tohashi, K.; 2011. Inhibition response of *Pinus densiflora* clones to *Bursaphelenchus xylophilus* systemic dispersal and their resistance to pine wilt disease. *Nematology* 13, 653–659. <https://doi.org/10.1163/138855410X535732>
- Matsunaga, K.; Iki, T.; Hirao, T.; Ohira, M.; Yamanobe, T.; Iwaizumi, M.G.; Miura, M.; Isoda, K.; Kurita, M.; Takahashi, M.; Watanabe, A.; 2020. Do Seedlings Derived from Pinewood Nematode-Resistant *Pinus thunbergii* Parl. Clones Selected in Southwestern Region Perform Well in Northern Regions in Japan? Inferences from Nursery Inocula-

- tion Tests. *Forests* 11, 955, 1-11. <https://doi.org/10.3390/f11090955>
- Melakeberhan, H.; Toivonen, P.M.A.; Vidaver, W.E.; Webster, J.M.; Dube, S.; 1991 Effect of *Bursaphelenchus xylophilus* on the water potential and water-splitting complex of photosystem II of *Pinus sylvestris* seedlings. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 38, 83–91. [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(05\)80127-4](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(05)80127-4)
- Menéndez-Gutiérrez, M.; Matsunaga, K.; Togashi, K.; 2017a. Relationship between pine wilt-tolerance rankings of *Pinus thunbergii* trees and the number of *Bursaphelenchus xylophilus* passing through branch sections. *Nematology* 19 (9), 1083-1093. <https://doi.org/10.1163/15685411-00003108>
- Menéndez-Gutiérrez, M.; Alonso, M.; Toval, G.; Díaz, R.; 2017b. Variation in pinewood nematode susceptibility among *Pinus pinaster* Ait. provenances from the Iberian Peninsula and France. *Ann. For. Sci.* 74:76, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s13595-017-0677-3>
- Menéndez-Gutiérrez, M.; Alonso, M.; Toval, G.; Díaz, R.; 2018a. Testing of selected *Pinus pinaster* half-sib families for tolerance to pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Forestry* 91, 38–48. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpx030>
- Menéndez-Gutiérrez, M.; Alonso, M.; Jiménez, E.; Toval, G.; Mansilla, P.; Abelleira, A.; Abelleira-Sanmartín, A.; Díaz, R.; 2018b. Interspecific variation of constitutive chemical compounds in *Pinus* spp xylem and susceptibility to pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Eur. J. Plant Pathol.* 150, 939–953. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1334-2>
- Menéndez-Gutiérrez, M.; Alonso, M.; Díaz, R.; 2021a. Assessing Genetic Variation in Resistance to Pinewood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) in *Pinus radiata*. *Forests*, 12, 1474. <https://doi.org/10.3390/f12111474>
- Menéndez-Gutiérrez, M.; Villar, L.; Díaz, R.; 2021b. Virulence of seven pathogenic *Bursaphelenchus xylophilus* isolates in *Pinus pinaster* and *P. radiata* seedlings and its relation with multiplication. *For. Pathol.* 2021 51, e12677. <https://doi.org/10.1111/efp.12677>
- Menéndez-Gutiérrez, M., Prada-Ojea, E., Díaz-Vázquez, R., 2022. Catalogación de progenitores de familia de *Pinus pinaster* tolerantes a la enfermedad del marchitamiento del pino causada por *Bursaphelenchus xylophilus*. 8º CFE, 1-8.
- Mohammed, G.H.; Zarco-Tejada, P.; Miller, J.R.; 2003. Applications of chlorophyll fluorescence in forestry and ecophysiology. En Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology. *Springer* 79–124. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0415-3_3
- Molina-Rodríguez, F.; 1965. Comportamiento racial del *Pinus pinaster* en el noroeste de España. *Anales del Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias*, 10: 221-238.
- Morgenstern, E.K.; 1996. Geographic variation in forest trees: Genetic basis and application of knowledge in silviculture. Vancouver, UBC Press, 209.
- Mota, M.; Braasch, H.; Bravo, M.; 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1, 727–734. <https://doi.org/10.1163/156854199508757>
- 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.* 35 (9), 987–999. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv046>
- Oda, K.; 1967. How to diagnose the susceptible pine trees which are attacked by pine beetles in the near future. *For. Protection News* 16, 263–266.

- Pajares, J.; 2020. El Nematodo del Pino, una permanente amenaza para nuestros pinares. *Foresta*, 78, 70-76.
- Phillips, M.A.; Croteau, R.B.; 1999. Resin-based defenses in conifers. *Trends. Plant. Sci* 4 (5), 184–190. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01401-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01401-6)
- Pimentel, C.S.; Firmino, P.N.; Calvão, T.; Ayres, M.P.; Miranda, I.; Pereira, H.; 2016. Pine-wood nematode population growth in relation to pine phloem chemical composition. *Plant Pathol.*, 66 (5), 856–864. <https://doi.org/10.1111/ppa.12638>
- Sacristán, A.; Fernández-Bravo, M.; Quesada-Moragas, E.; Pajares, A.; 2017. Self-infection of Pine Wood Nematode vector *Monochamus galloprovincialis* with entomopathogenic fungus *Beauveria pseudobassiana* for biological control. Proceedings IUFRO WPs, Thessalonica, Grecia.
- Toda, T.; Kurinobu, S.; 2002. Realized genetic gains observed in progeny tolerance of selected red pine (*Pinus densiflora*) and black pine (*P. thunbergii*) to pine wilt disease. *Silvae Genet.* 51, 42–44.
- Torres-Sánchez, E.; Menéndez-Gutiérrez, M.; Villar-Caamaño, L.; Díaz-Vázquez, R.; 2022. Evaluación de la susceptibilidad de 32 procedencias de *Pinus pinaster* frente a *Bursaphelenchus xylophilus*. 8º CFE, 1-16.
- Yamanobe, T.; 2009. Relationships between morphological traits and resistance to pine wood nematode in two Japanese pines. *Eur. J. Plant. Pathol.* 124 (4), 543–552. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9438-y>
- Zhen, W.; Yongan, Z.; Chunyan, W.; Wang, Y.; 2017. *Esteya vermicola* controls the Pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in pine seedlings. *J. Nematol.* 49, 86–91. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2017-048>
- Zhao, B.G.; Futai, K.; Sutherland, J.R.; Takeuchi, Y.; 2008. Pine wilt disease. Springer, Japan, <https://doi.org/10.1007/978-4-431-75655-2>
- Zimmerman-Lax, N.; Shenker, M.; Tamir-Ariel, D.; Perl-Treves, R.; Burdman, S.; 2015. Effects of nitrogen nutrition on disease development caused by *Acidovorax citrulli* on melon foliage. *Eur. J. Plant Pathol.* 145 (1), 125–137. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0822-5>
- Zobel, B.; Talbert, J.; 1984. Applied forest tree improvement, Wiley&Sons, 505. Nueva York.