



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

Evaluación de la susceptibilidad de 32 procedencias de *Pinus pinaster* frente a *Bursaphelenchus xylophilus*

TORRES-SÁNCHEZ, E.¹, MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ, M.¹, VILLAR CAAMAÑO, L.^{1,2} y DÍAZ-VÁZQUEZ, R.¹

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

² Fundación ARUME.

Resumen

La enfermedad del marchitamiento del pino está causada por el nematodo de la madera del pino, *Bursaphelenchus xylophilus*, cuya transmisión se produce a través de insectos vectores del género *Monochamus*. Debido a la amenaza que supone para las masas de coníferas europeas, se considera un organismo de cuarentena dentro de la Unión Europea. Actualmente, Portugal es zona demarcada, amenazando con expandirse por toda la Península Ibérica antes del año 2030 a través de Galicia y del Sistema Central. De hecho, desde 2008 se han declarado varios focos en masas de *Pinus pinaster* y *Pinus radiata* en Galicia, Castilla y León y Extremadura. Este estudio evalúa la susceptibilidad de diferentes procedencias de *P. pinaster*, una especie ampliamente distribuida por nuestro país con un alto valor económico y ecológico que ya ha demostrado tener una susceptibilidad moderada, en ensayos de inoculación artificial con *B. xylophilus*. Los resultados muestran diferentes niveles de susceptibilidad en función de la procedencia, habiendo una gran oscilación de mortalidad entre procedencias, entre 0-100%. Las variables morfológicas se relacionaron con la mortalidad y el desarrollo de los síntomas. Además, se observa que las procedencias ubicadas en el sureste peninsular poseen mayor resistencia que aquellas ubicadas en el noroeste peninsular.

Palabras clave

Nematodo de la madera del pino, pino resinero, procedencias, resistencia, enfermedad del marchitamiento del pino.

1. Introducción

La enfermedad del marchitamiento del pino (EMP) afecta a numerosas especies de coníferas, llegando a provocar su muerte en pocas semanas o meses. Esta causada por el nematodo de la madera del pino (NMP) *Bursaphelenchus xylophilus*, cuya transmisión a los hospedantes se produce a través de insectos vectores pertenecientes al género *Monochamus*, mediante heridas causadas por la alimentación en ramillos jóvenes o por oviposición en huéspedes decaídos (NAVES et al., 2007). Asimismo, su capacidad de dispersión entre territorios puede verse favorecida por la circulación de mercancías, ya sea material vegetal o embalajes de madera. Actualmente, este organismo originario de Norte América está presente en Japón, China, Corea del Sur, Taiwán, Portugal y España (FUTAI, 2013; VICENTE et al., 2012).

Los bosques europeos están formados principalmente por bosques de coníferas, los cuales tienen un gran valor ecológico y económico (VICENTE et al., 2012). Dentro de las especies de pino que conforman las masas europeas se observan diferentes niveles de susceptibilidad al NMP. Por ejemplo, las especies *Pinus sylvestris* o *Pinus nigra* presentan mortalidades elevadas (DAUB, 2008; INÁCIO et al., 2015), *P. pinaster* o *P. radiata* mortalidades moderadas (MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ et al., 2017a), mientras que *Pinus pinea* o *Pinus halepensis* presentan bajos o nulos niveles de mortalidad (DAUB, 2008; MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ et al., 2017a; PIMENTEL et al., 2020). En otros géneros estudiados diferentes a *Pinus* no se ha observado mortalidad (DÍAZ et al., 2017).

En Portugal, donde el 65,2 % del bosque de coníferas está formado por pino resinero (*P. pinaster*) (VICENTE et al., 2012), el NMP fue detectado en 1999 y actualmente todo el territorio se considera área demarcada (MOTA et al., 2009). Consecuentemente, las pérdidas económicas están siendo muy elevadas, tan solo el coste derivado de las cortas de los árboles afectados supone 6 M€/año (BACK, 2020). En España, las masas de pino resinero abarcan algo más de un millón de hectáreas, representando el 15,6 % del total de masas de coníferas y el 5,77 % de superficie forestal arbolada. Es una de las principales especies maderables que más se cortan en España (3 M m³ en 2018) por detrás de *P. radiata* y seguido de *P. sylvestris* (MITECO, 2020). Junto con otros aprovechamientos como la resina, adquieren un gran valor socio-económico al ser considerados fuentes de recursos naturales que favorecen el empleo, la economía y el asentamiento rural (SOLIÑO et al., 2018).

Un estudio pronosticó la expansión del NMP en España antes de 2030 a través de Galicia y el Sistema Central (DE LA FUENTE et al., 2018). El primer foco de NMP en España se detectó en 2008 en la Sierra de Dios Padre (Extremadura), desde entonces se han erradicado dos brotes en Valverde del Fresno (Extremadura) y Sancti-Spiritus (Castilla y León). Actualmente, existen 3 zonas demarcadas por NMP: As Neves (Pontevedra, Galicia), Lagunilla (municipio de Salamanca, la zona demarcada afecta a Castilla y León y Extremadura) y Sierra de la Malvana perteneciente a Cáceres y cuya zona demarcada afecta también a Salamanca (MAPAMA, 2020). Más recientemente, en mayo de 2021 se detectó en el municipio de Sotoserrano (Salamanca) un nuevo foco en *P. radiata*, dentro de la ya declarada zona demarcada de Lagunilla (CONSEJERÍA DE FOMENTO Y MEDIO AMBIENTE, 2021). Se estima que sin medidas de contención, en 2050 las masas de coníferas de la mitad occidental peninsular estarán afectados por la enfermedad extendiéndose a gran parte del territorio español en 2100 (DE LA FUENTE & SAURA, 2021) lo que supondrá grandes pérdidas económicas en el sector forestal (SOLIMAN et al., 2012).

Las 28 regiones de procedencia españolas de *P. pinaster* se definieron teniendo en cuenta la distribución de las masas, las características fenotípicas o genéticas y las características geográficas y ecológicas (ALÍA et al., 2009). El alto número de regiones de procedencia indica una gran variabilidad genética dentro de la especie. Esto puede tener como consecuencia que dentro de la especie puedan existir diferentes niveles de susceptibilidad a la EMP, lo cual podría ser de interés de cara a luchar contra esta enfermedad mediante programas de mejora genética.

Diferentes estudios señalan diferencias entre procedencias en tolerancia a otros patógenos, como *P. halepensis* frente a *Gremmeniella abietina* (ROMERALO et al., 2016), *P. sylvestris* a *Dothiostroma septosporum* (PERRY ET AL., 2016) o *Pinus patula* frente a *Fusarium circinatum* (HODGE & DVORAK 2007). En otras especies de pino, se ha probado que la resistencia frente al NMP está condicionada por caracteres genéticos como en *Pinus densiflora* (LEE et al., 2019) y *P. thunbergii* (HIRAO et al., 2012; MATSUNAGA et al., 2020) Esto indica que, en muchos casos, existe un componente genético asociado a la procedencia que favorece la resistencia del huésped frente a un patógeno. El único estudio hasta la fecha en el que se han evaluado procedencias de *P. pinaster* (Mimizán, Leiria, Noreste costera, Soria-Burgos, Sierra de Gredos y Sierra de Oria) frente a *B. xylophilus*, mostró una mayor susceptibilidad de las procedencias del noroeste peninsular (MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ et al., 2017). Una mayor comprensión de la susceptibilidad de las diferentes procedencias del pino resinero puede ayudar al control de la EMP a través de selección de poblaciones de interés.

2. Objetivos

El objetivo de este estudio es evaluar la susceptibilidad de diferentes procedencias de *P. pinaster* frente al nematodo del pino, comparadas con dos testigos comerciales, el huerto semillero de A Braxe (A Coruña, España) y el huerto semillero de Mimizán (Mimizán, Francia).

3. Metodología

En este ensayo se evalúan 32 procedencias de *P. pinaster*, de las cuales 28 son nacionales y 4 extranjeras. Además, se incluyeron en el ensayo dos testigos comerciales mejorados procedentes de huertos semilleros. Las 28 procedencias españolas son todas las definidas para esta especie en nuestro país por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (ALÍA et al., 2009). Las otras cuatro regiones de procedencia pertenecen a varios países: una es la región de procedencia portuguesa PNB-RPIV (Leiria; **PNB-RPIV**), otra es la región de procedencia francesa **PPA 800** (Isla de Córcega, Francia) y dos en la zona del Atlas de Marruecos (**Alto Atlas** y **Atlas Medio**). Todas ellas están representadas en la **Figura 1**. Los testigos comerciales proceden del huerto semillero de A Braxe (Galicia, España, **HSC26001**) y el huerto semillero de 2ª generación de Mimizán (Mimizán, Francia, **HSFRVG006**).

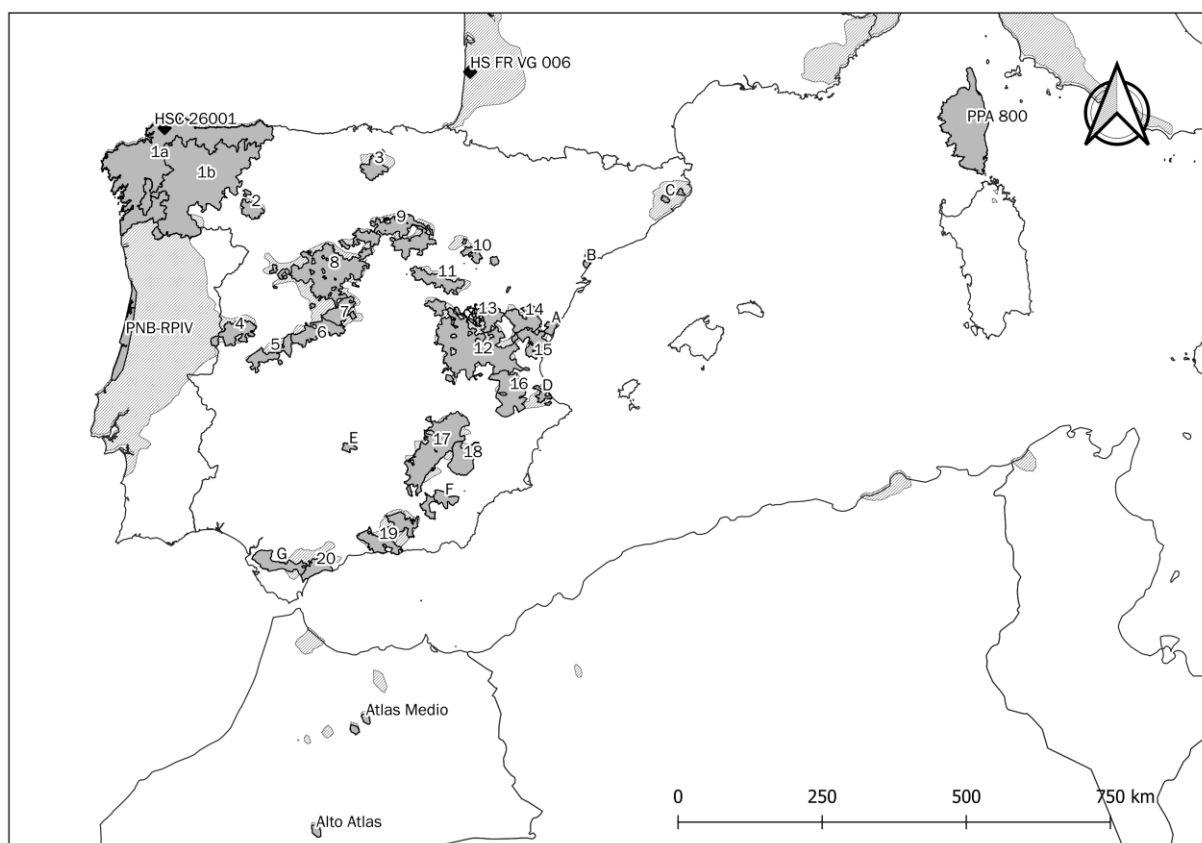


Figura 1. Regiones de procedencia españolas (códigos 1a-20; A-G) y extranjeras (PPA 800; Alto Atlas; Atlas Medio; PNB-RPIV) en gris oscuro y huertos semilleros (HSC26001 y HSFRVG006) representados como rombos negros de *Pinus pinaster*. Mapa generado con la plataforma SIG-FOREST de INIA. En gris claro se muestra el área de distribución de *P. pinaster* según EUFORGEN.

El ensayo de inoculación siguió un diseño de bloques completos al azar, con 34 genotipos, 20 bloques y un individuo por unidad experimental. En 5 bloques aleatorios de los 20 realizados se incluyó además una segunda planta por genotipo, que fue empleada como control. Todas las plantas tenían 2 años de edad. El ensayo se realizó en un invernadero con condiciones controladas del Centro de Investigación Forestal de Lourizán. El rango de temperaturas durante el ensayo osciló entre 16 y 32°C, la temperatura media diurna fue de 26,4°C, la temperatura media nocturna fue de 20,9°C y la temperatura media del ensayo fue de 23°C. El riego se programó para que fuera automático dos veces por semana a través de un sistema de goteo.

La cepa empleada en este ensayo fue aislada en As Neves (Pontevedra) en 2010 y ha demostrado una alta virulencia para *P. pinaster* (SpPO1, (MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ et al., 2021)). El cultivo de esta cepa se realizó en *Botrytis cinerea* no esporulada cultivada previamente en PDA y mantenida a 25°C. El día de la inoculación se preparó una suspensión de nematodos (4.000 nematodos/ml) en agua destilada. En cada planta se aplicaron 300 µl de inóculo con una micropipeta sobre un corte longitudinal previamente realizado en el tallo. Inmediatamente, a continuación de la aplicación del inóculo, la herida realizada se selló con Parafilm®. Las plantas empleadas como control se inocularon siguiendo los mismos pasos, pero empleando agua destilada en lugar de la suspensión de nematodos.

Previamente a la inoculación, se midieron las siguientes variables: altura total al inicio del ensayo (HI, cm), altura total del año anterior (HAA, cm), incremento en altura (IH, cm; $IH = HI - HAA$), número de ramas (NR, nº) y diámetro basal al inicio del ensayo (DI, mm). Tras la aparición de los primeros síntomas, se comenzó a evaluar la evolución de los síntomas (W) siguiendo una escala del 1 al 7 (1, ausencia de síntomas; 7, planta completamente seca, decolorada y muerta, (MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ ET AL., 2017b). Para ello, se evaluaron los daños ocasionados por la enfermedad dos veces por semana. Con los datos de síntomas se estimó para cada fecha, la supervivencia (S; variable binomial; 0, muerta; 1, viva). Una planta se consideraba muerta cuando alcanzaba el estadio 6 de síntomas. El valor de cada día tras la inoculación se menciona como día después de la inoculación (DDI).

Para aquellas plantas que presentaron mortalidad al final del ensayo se calcularon tres variables: comienzo (CS), fin (FS) y duración de los síntomas (DS). El inicio y fin de los síntomas se midieron como número de días desde la inoculación, mientras que la duración se estimó como la diferencia entre las dos variables anteriores ($DS = FS - CS$). Todas las plantas inoculadas de 6 bloques, así como una planta control por genotipo, se procesaron al final del ensayo o inmediatamente después de alcanzar el nivel 7 de síntomas para proceder al conteo de nematodos. En el procesado se diferenciaron tallo y raíz, extrayéndose los nematodos de cada parte por separado mediante el método Baermann. Una vez extraídos, el conteo de nematodos se realizó con ayuda de un estereomicroscopio. Se calcularon también los pesos secos de tallo, raíz y acículas de cada planta para posteriormente, tras estimar la cantidad de nematodos presentes, estimar las densidades de nematodos por peso seco para el tallo, la raíz y el total de la planta (NxT, NxR, NxRTA, respectivamente).

El ensayo se inoculó a finales de junio y se mantuvo hasta que la evolución de los síntomas comenzó a estabilizarse (**Figura 2**), siendo la duración total del ensayo de 126 días.

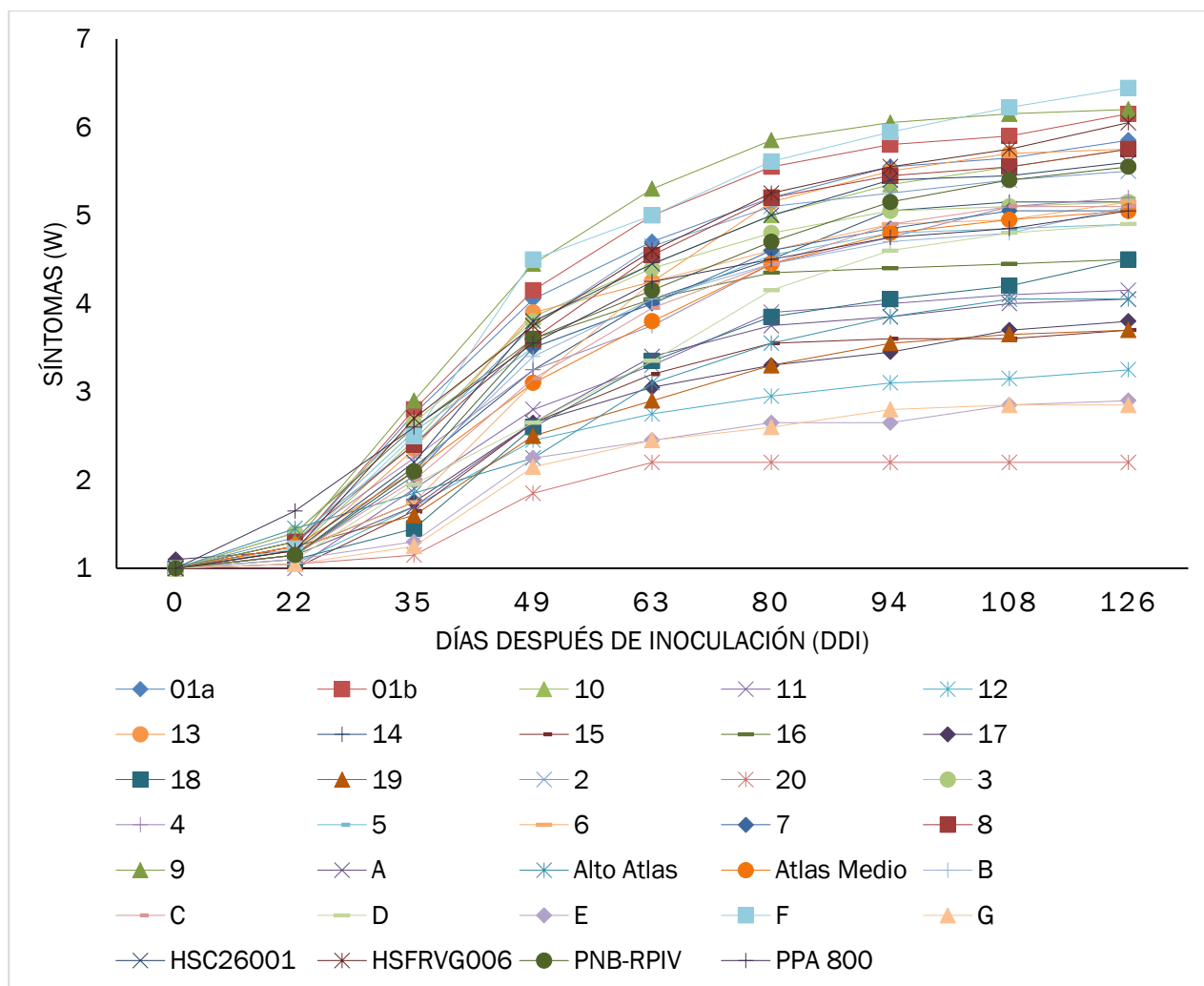


Figura 2. Evolución de los síntomas por procedencia a lo largo del ensayo.

Los análisis estadísticos de los datos se realizaron con R (R Core Team, 2019). Para cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los análisis, se tuvieron que transformar algunas variables. HI e IH mediante raíz cuadrada; CS mediante transformación inversa, DS y FS mediante transformación logarítmica de la función inversa, y W empleando la transformación para normalizar de Blom (*RankNorm()* para R v. 3.6.1) del paquete RNOmni.

Para el análisis de variables morfológicas se realizó un modelo lineal mixto donde se trató la procedencia como efecto aleatorio, mientras que para la duración de los síntomas (DW) y sintomatología (W) se utilizó un modelo lineal mixto donde se incluyó como efectos aleatorios procedencia y bloque. Para establecer los modelos mixtos se utilizó la función *lmer()* del paquete lme4. La supervivencia se analizó con un modelo lineal generalizado mixto de tipo binomial, donde procedencias y bloques fueron factores aleatorios, con la función *glmer(family=binomial(logit))* del paquete lme4. Con cada modelo mixto se calcularon los BLUPs (Best Linear Unbiased Predictors – Mejores predictores lineales no sesgados) por procedencia con la función *ranef()* del paquete lme4 y sus errores estándar con la función *se.ranef()* del paquete arm. La significación de las variables aleatorias se realizó comparando los modelos reducidos y los modelos completos con la función *anova(modelo reducido, modelo completo)*.

Para el análisis de la densidad de nematodos se utilizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis en función de la procedencia. Cuando los resultados mostraron ser significativos se utilizó un *post hoc* de Mann-Whitney para encontrar diferencias entre procedencias.

Por último, se realizaron test de correlación de Spearman entre las variables de interés tanto para la estimación de las correlaciones como fenotípicas y genéticas.

4. Resultados

Se han encontrado diferencias significativas entre procedencias para todas las variables evaluadas (variables morfológicas y de evolución de la enfermedad), excepto las relacionadas con el inicio, fin y duración de los síntomas de las plantas que murieron (CS, FS y DS) (**Tabla 1**).

Los valores medios al inicio del ensayo fueron $110,7 \pm 20,5$; $56,6 \pm 13,2$ y $44,2 \pm 12,7$ cm para HI, HAA y IH, respectivamente, mientras que el DI fue de $15,6 \pm 2,1$ mm y NR $13,0 \pm 4,5$ ramas. La altura inicial (HI) osciló entre 48,1 cm (Alto Atlas) y 125,02 cm (HSFRVG006), mientras que la altura del año anterior (HAA) tuvo un rango de entre 22,7 cm (Alto Atlas) y 74,3 cm (procedencia 6). En el caso del incremento de altura (IH), Alto Atlas fue la procedencia con un menor incremento (25,4 cm) y el huerto francés (HSFRVG006) el que presentó el mayor (55,4 cm). En cuanto al diámetro inicial (DI), la procedencia marroquí del Alto Atlas, fue la que presentó el menor valor medio (12,9 mm), muestras que la procedencia de Sierra de Gredos (6) tuvo el mayor (18,3 mm). Con respecto al número de ramas (NR), este osciló entre 7,0 (Alto Atlas) y 16 ramas (procedencia 6). Para todas las variables morfológicas, excepto DI, las dos procedencias marroquíes presentaron los valores promedio más bajos, mientras que los más altos se alcanzaron siempre por las plántulas del huerto semillero francés (HSFRVG006) y la procedencia de Sierra de Gredos (procedencia 6), alternándose entre sí en función de la variable.

En cuanto a la expresión de los síntomas no se encontraron diferencias entre procedencias en el comienzo, duración y momento de finalización de los síntomas (CS, FS y DS) (**Tabla 1**). Los primeros síntomas empezaron a mostrarse entre los 22 y 35 días después de la inoculación (DDI), con un promedio de $40,6 \pm 16,2$ DDI. La duración media de los síntomas fue de $25,5 \pm 12,0$ días, comenzando a morir las primeras plantas entre 6 y 21 días tras el comienzo de los síntomas. La finalización de los síntomas se produjo de media a los $66,1 \pm 20,5$ DDI.

Tabla 1. Resultado de los modelos mixtos lineales establecidos para el análisis de datos. μ : media de la variable dependiente; $\pm$ SD: desviación estándar de la variable dependiente; σ^2 varianza de la variable aleatoria dentro del modelo;

Variable	$\mu \pm SD$	Procedencia			Bloque		
		σ^2	X^2	$p > X^2$	σ^2	X^2	$p > X^2$
CS	$40,63 \pm 16,17$	$2,12 \cdot 10^{-06}$	1,52	0,2172	$9,04 \cdot 10^{-06}$	18,74	<0,001
DS	$25,51 \pm 11,95$	0	0	1	0,01	3,72	0,05378
FS	$66,14 \pm 20,47$	$7,33 \cdot 10^{-07}$	2,16	0,142	$2,57 \cdot 10^{-06}$	18,07	<0,001
W	$4,85 \pm 2,32$	0,09	66,83	<0,001	0,03	15,08	<0,001
S	$0,44 \pm 0,50$	1,03	64,29	<0,001	0,24	10,81	0,00101
HI	$100,76 \pm 20,50$	0,62	524,99	<0,001			
HAA	$56,62 \pm 13,24$	106,46	634,63	<0,001			
IH	$44,15 \pm 12,68$	0,16	96,31	<0,001			
DI	$15,58 \pm 2,05$	0,70	91,27	<0,001			

Variable	$\mu \pm SD$	Procedencia			Bloque		
		σ^2	X^2	$p > X^2$	σ^2	X^2	$p > X^2$
NR	13,04 $\pm$ 4,46	2.85	72,92	<0,001			

Del total de plantas inoculadas, sobrevivió el 44% al final del ensayo (126 DDI).. Las diferencias entre procedencias fueron significativas tanto para la sintomatología como la supervivencia ($p < 0.001$, **Tabla 1**). Cuanto más negativo es el valor en la variable transformada de W, menor es la sintomatología desarrollada, mientras que, en supervivencia, cuanto mayor es el valor, mayor es la tasa de supervivencia. En la **Figura 3** se muestra la sintomatología media al final del ensayo de los 34 genotipos evaluados y en la **Figura 4** se puede observar los valores BLUPs por procedencia para la supervivencia, la supervivencia predicha obtenida a partir de los BLUPs y la supervivencia observada (estas dos últimas en tanto por uno). La procedencia 20, de Sierra Bermeja, fue la menos afectada, no muriendo ninguna planta e, incluso, no habiendo mostrado ningún síntoma ninguna de ellas. De hecho, la supervivencia predicha para esta procedencia fue la más alta de todas con un valor medio de 0,91. También conviene destacar las procedencias de Serranía de Ronda (G), Fuencaiente (E) y Serranía de Cuenca (12) por su altas supervivencias observadas y predichas ($>0,75$) y baja sintomatología ($<3,3$). Por el contrario, destaca la procedencia de Sierra de Oria (F) por ser la más afectada, y para la cual se obtuvo una supervivencia predicha de tan solo 0,18, y valor promedio de sintomatología fue de 6,6. Valores bajos de resistencia mostraron también el huerto semillero francés de Mimizán (HSFRVG006) y las procedencias Noroeste-Interior (1b) y Montaña Soria-Burgos (9), presentando una supervivencia predicha no mayor de 0,25 y una alta sintomatología (>6). La supervivencia predicha para el otro genotipo mejorado empleado en el ensayo como testigo comercial, el huerto semillero gallego de A Braxe (HSC26001), fue de 0,39, ligeramente superior a la obtenida para la procedencia Noroeste-Litoral (1a) de la cual procede.

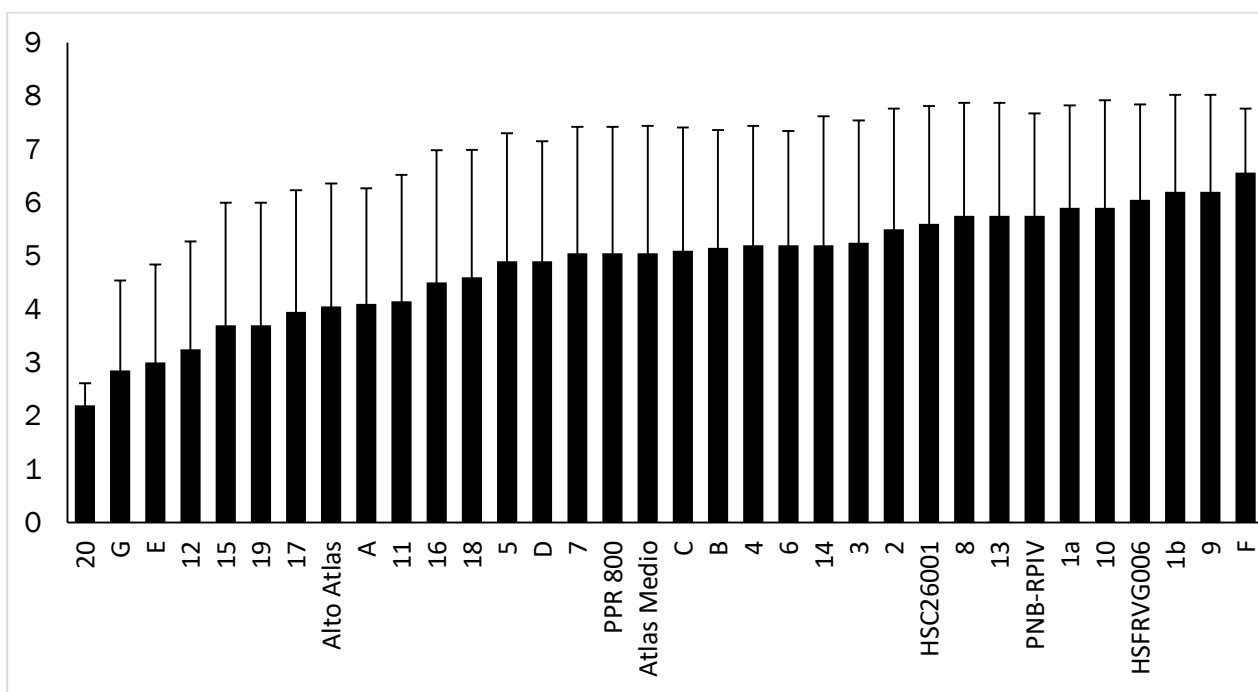


Figura 3. Gráfico de síntomas desarrollados por procedencia a fecha final del ensayo. Las barras superiores en cada procedencia hacen referencia a su desviación estándar.

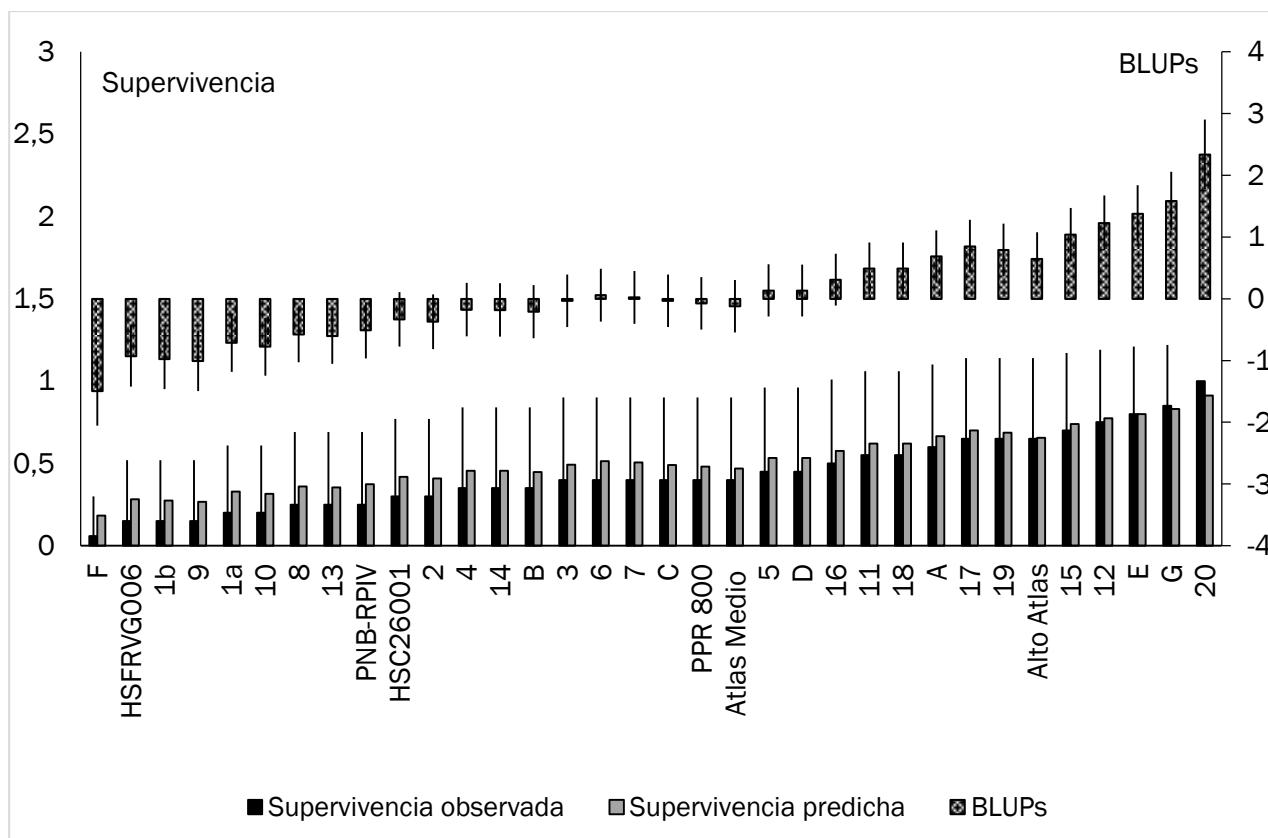


Figura 4. Gráfico de supervivencia. En moteado negro se muestra el ranking BLUP para la supervivencia del modelo lineal generalizado binomial mixto junto con el error estándar (barra negra), en negro se muestra la supervivencia observada en el ensayo en tanto por uno y en gris se muestra el valor medio de la supervivencia predicha para su correspondiente BLUP también en tanto por uno. Estos datos se corresponden con la última fecha del ensayo (126 DDI).

En cuanto a la densidad de nematodos, se encontraron diferencias significativas entre procedencias a nivel de tallo, raíz y planta completa (Tabla 2), con grandes diferencias entre procedencias. Además, la densidad de nematodos en los tres tejidos altamente correlacionados entre sí (Tabla 3). A nivel de planta completa, las procedencias 20, G y 12 presentaron las densidades más bajas (Figura 5). El mínimo en las densidades de nematodos encontrados en el tallo en todas las procedencias presenta valores cercanos a cero (Figura 4). La mediana de todo el ensayo fue de 200,489 nematodos por gramo de peso seco de planta completa.

Tabla 2. Test no paramétrico de Kruskal-Wallis para las densidades de nematodo. NxR: densidad de nematodos por gramos de peso seco de raíz; NxT: densidad de nematodos por gramos de peso seco de tallo; NxRTA: densidad de nematodos por gramos de peso seco de planta completa (raíz, tallo y acículas).

Variable	gl	Procedencia	
		χ^2	$p > \chi^2$
NxR	33 , 169	48,33	0,041
NxT	33 , 169	55,05	0,009
NxRTA	33 , 169	50,66	0,025

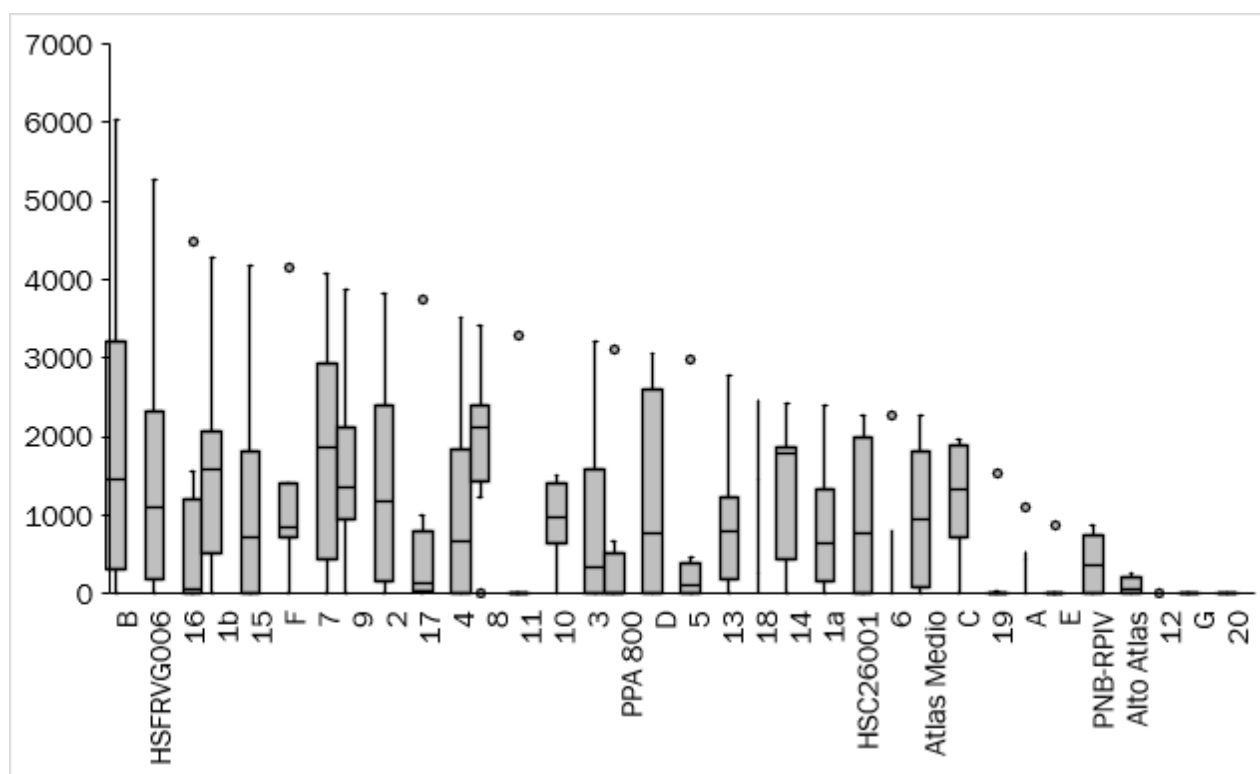


Figura 5. Gráficos de caja y bigotes para la densidad de nematodos por gramo de peso seco de planta completa (NxRTA) y por procedencia.

En la **Tabla 3** se muestran las correlaciones fenotípicas y genéticas entre todas las variables estudiadas. La supervivencia está altamente correlacionada de forma negativa con la sintomatología, tanto a nivel fenotípico como genético. A nivel fenotípico destaca que tanto la sintomatología como la supervivencia están altamente correlacionadas con las densidades de las poblaciones de nematodo, mientras que no guardan relación con las características morfológicas. A nivel genético, todas las variables morfológicas guardan correlación positiva con la sintomatología y con la supervivencia, a excepción del diámetro inicial para esta última. Esto indica que las procedencias con mayores crecimientos en altura y mayor ramosidad son aquellas que presentan una mayor susceptibilidad al NMP.

Tabla 3. Matriz de correlaciones de Spearman. Por encima de la diagonal se muestran las correlaciones genéticas. Por debajo de la diagonal se muestran las correlaciones fenotípicas. NxR: densidad de nematodos por gramo de peso seco de raíz; NxT: densidad de nematodos por gramo de peso seco de tallo; NxRTA: densidad de nematodos por gramo de peso seco de planta completa (raíz, tallo y acículas. Niveles de significación: Ns: no significativo; *** <0,001; ** <0,01; * <0,05.

	W	S	DI	HAA	HI	IH	NR
W		-0,96***	0,35*	0,39*	0,37*	0,39*	0,39*
S	-0,95***		Ns	-0,39*	-0,37*	-0,35*	-0,39*
DI	Ns	Ns		0,66***	0,65***	0,40*	0,44**
HAA	Ns	Ns	0,37***		0,95***	0,58***	0,62***
HI	Ns	Ns	0,37***	0,77***		0,78***	0,56***
IH	Ns	Ns	0,23**	0,20**	0,75***		0,35*
NR	Ns	Ns	0,25***	0,38***	0,32***	Ns	
NxRTA	0,87***	-0,85***	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns

	W	S	DI	HAA	HI	IH	NR
NxR	0,85***	-0,84***	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
NxT	0,87***	-0,85***	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns

5. Discusión

Se han encontrado diferencias significativas entre procedencias de *P. pinaster* oriundas de gran parte del área de distribución de la especie. Algunas procedencias destacan por su alta susceptibilidad a la enfermedad del marchitamiento del pino, mientras que otras presentan una gran resistencia a la misma. Esto sugiere que la mejora genética por este carácter es posible para esta especie. Sin embargo, para avanzar en la mejora por este carácter hay que tener en cuenta la correlación positiva encontrada entre crecimiento y susceptibilidad a esta enfermedad, pues si no esta podría suponer un obstáculo para avanzar por cualquiera de ambos caracteres.

En general, nuestros resultados muestran diferencias entre procedencias para todas las variables analizadas relacionadas con la susceptibilidad, excepto aquellas de evolución de los síntomas cuando se tienen en cuenta únicamente las plántulas que murieron antes de finalizar el ensayo. La resistencia a enfermedades en muchos casos está influenciada por la genética de las poblaciones de los distintos hospedantes (MORGENSTERN, 1996). En distintas especies de pino se han observado diferentes niveles de respuesta frente a un patógeno, ya sea enfermedad o plaga, entre sus respectivas procedencias, como por ejemplo *P. halepensis* a *Gremmeniella abietina* (ROMERALO et al., 2016), *P. sylvestris* a *F. circinatum* (DAVYDENKO et al., 2018; MARTÍN-GARCÍA et al., 2017; MARTÍN-GARCÍA et al., 2018) o *P. pinaster* a *Hylobius abietis* (LÓPEZ-GOLDAR et al., 2015). En particular, para la resistencia al nematodo se han encontrado diferencias significativas entre procedencias de distintas especies de pino, como *P. densiflora* (FUJIMOTO et al., 1989), *P. massoniana* (OKAMURA et al., 2010), *P. thunbergii* (MATSUNAGA et al., 2016) y *P. pinaster* (MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ et al., 2017). Sin embargo, HOPF-BIZIKS et al., (2016) no encontraron diferencias entre procedencias para *P. sylvestris* al final del ensayo, si bien sí detectaron diferencias en la evolución de la enfermedad. Aun así, este ensayo fue realizado bajo una temperatura media de 25°C, condición climática exigente que pudo haber favorecido la mortalidad. MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ et al. (2017b) sugieren que tanto la temperatura media nocturna durante el ensayo como el periodo de realización del ensayo, el cual está relacionado con estado del desarrollo vegetativo de las plántulas, influyen en la susceptibilidad al nematodo. Esto último debería tenerse muy en cuenta, especialmente cuando se trabaja con procedencias pues suelen tener una tasa de crecimiento durante el periodo vegetativo muy diferente (PRADA et al., 2014), causado por las condiciones ambientales de origen, ya que las procedencias mediterráneas paran su periodo vegetativo antes debido a la sequía estival.

HOPF-BIZIKS & SCHRÖDER (2019) resaltaron que las plántulas jóvenes pueden ser buenos indicadores para estudios de patogenicidad, debido a que su estudio realizado con *P. sylvestris* de 7-8 años de edad mostró una dinámica de la población de nematodos dentro del árbol y una reacción de los mismos a la enfermedad semejantes a la ocurrida en plántula por HOPF-BIZIKS et al. (2016). Confirmar esta correlación juvenil-adulto para *P. pinaster* sería de gran importancia para validar los ensayos como el que se presenta en este estudio, debido a la imposibilidad actual de realizar ensayos en campo con nematodo del pino al ser considerado este un organismo de cuarentena (EVANS et al., 1996) y estar catalogado en la lista A2 de organismos en cuarentena propuesta por la EPPO (EPPO, 2022).

Teniendo en cuenta que cada región de procedencia presenta unas condiciones edafo-climáticas determinadas (ALÍA et al., 2009) se puede suponer que cada procedencia responda de una manera diferente al nematodo de la madera del pino (NMP), además de presentar diferencias

genéticas y adaptativas. Diversos estudios han agrupado las poblaciones del pino resinero en función de sus similitudes genotípicas. Estos grupos genéticos pueden ser debidos a posibles adaptaciones evolutivas a su entorno, distinguiéndose varios grupos genéticos en la península ibérica (BUCCI et al., 2007; JARAMILLO-CORREA et al., 2015). Teniendo en cuenta los seis grupos propuestos por JARAMILLO-CORREA et al. (2015), costa atlántica francesa, región de Córcega, costa ibérica atlántica, centro de la península Ibérica, sureste de la península Ibérica y norte de África, la mayoría de las procedencias que mostraron mayor resistencia en nuestro ensayo (20, Sierra Bermeja; G, Serranía de Ronda; E, Fuencaliente; y 12, Serranía de Cuenca) proceden del grupo genético del sureste de la península Ibérica. Excepción fue la procedencia F (Sierra de Oria), que probablemente presente más similitudes con las procedencias marroquíes. Convendría hacer un nuevo análisis, que incluyese el grupo genético en el modelo que permitiese comprobar la veracidad de esta hipótesis.

Nuestros resultados muestran una correlación genética significativa del número de ramas y las variables de altura con la supervivencia (negativa) y la sintomatología (positiva). En cuanto al número de ramas, algunos autores sugieren que no está relacionadas con la supervivencia (HAKAMATA et al., 2013), mientras que otros mencionan que es un factor positivo para la supervivencia del huésped, debido a que puede interferir en la dispersión del nematodo dentro del mismo (KURODA, 2008; MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ et al., 2018; YAMANOBÉ, 2009). La relación negativa detectada entre altura y supervivencia, ya se había puesto de manifiesto previamente por MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ et al., (2018). Por el contrario, (CARRASQUINHO et al., 2018) indicaron relaciones positivas entre ambos tipos de variables cuando evaluaron familias de *P. pinaster* portuguesas. Conviene destacar que el huerto semillero comercial francés HSFVRG006, el cual presentó mayor altura total inicial y mayor incremento en altura en el momento de la inoculación, puesto que procede de la 2ª generación de mejora del programa genético de Francia, fue uno de los genotipos más susceptibles en el presente ensayo. Por el contrario, el otro huerto semillero comercial evaluado en este estudio, procedente de la 1ª generación de mejora del programa de mejora gallego, tuvo una mayor supervivencia, si bien no destacó tanto por su crecimiento. Esto resalta la importancia de tener en cuenta diversos caracteres de interés en los programas de mejora, ahora que la resistencia a factores bióticos y abióticos se ha comprobado que son muy necesarias por el cambio climático.

No se ha encontrado ninguna relación significativa entre las variables morfológicas de crecimiento y la densidad de nematodos, lo cual sí había sido detectado en otros estudios (PIMENTEL et al., 2020), a pesar de que, como era esperable y ya se había observado en estudios anteriores (MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ et al., 2018b), el número de nematodos está fuertemente correlacionadas con la sintomatología y la supervivencia. Tres de las cuatro procedencias (20, Sierra Bermeja; G, Serranía de Ronda; y 12 Serranía de Cuenca) que mostraron mayor supervivencia (>75 %) no superaron densidades máximas de 14,32 nematodos por gramo de peso seco por planta completa al final del ensayo, pasados 4 meses tras la inoculación, siendo las que más difieren del resto en cuanto a densidad de nematodos. Al finalizar el ensayo, la planta superviviente asintomática o con poca sintomatología mostró bajas densidades de nematodos, indicando que la capacidad de multiplicación y migración de los nemátodos dentro del huésped está relacionada con el desarrollo de la enfermedad (SON & MOON 2013). En algunas supervivientes la población de nematodos llegó a desaparecer, observándose una tendencia a la desaparición dentro de procedencias resistentes. La procedencia E (Fuencaliente) es una de las menos afectadas y, aun así, presenta valores de población de nematodos similares a otras procedencias más susceptibles. Esto podría indicar que algunas poblaciones, a pesar de mostrar resistencia podrían ser un potencial reservorio de la enfermedad. Convendría realizar más estudios para profundizar en este tema.

Todo apunta a una mayor susceptibilidad de las procedencias del norte que las del sur-suroeste, a excepción de la procedencia F de Sierra de Oria. De hecho, las procedencias situadas en el litoral norte de la península (1a, Noroeste-Costera; 1b, Noroeste-Interior; PNB-RPIV, Leiría-Portugal; y el huerto semillero HSC26001) desarrollaron una sintomatología similar y elevada. Además, las

procedencias del centro de la meseta mostraron un nivel de sintomatología mayor que las procedencias del este y sur de España. Incluso, la procedencia marroquí situada más al norte presentó una mayor susceptibilidad que la procedencia marroquí situada al sur. La variación geoclimática de las especies forestales puede revelar una pauta subyacente de variación genética que es consecuencia de la selección natural y otros procesos genéticos (MORGENSTERN, 1996). En particular, la susceptibilidad de distintas especies de pino a plagas y enfermedades se ha relacionado en diferentes ocasiones con parámetros geoclimáticos de origen. Por ejemplo, ROMERALO et al., (2016) y HODGE & DVORAK (2007) encontraron una relación positiva entre la altitud de origen de las procedencias y la susceptibilidad de un hospedante a un patógeno, *P. halepensis* frente a *Gremmeniella abietina* y *Pinus patula*; así como, *Pinus tecunumanii* frente a *Fusarium circinatum*. PERRY et al., (2016) hallaron que el clima del lugar de origen, en particular la precipitación, influye en el desarrollo de síntomas de *P. sylvestris* frente a *Dothistroma septosporum*. L. En cuanto a la susceptibilidad al nematodo del pino, HOPF-BIZIKS et al. (2016) observaron que las procedencias de *P. sylvestris* del norte de Alemania desarrollaron los síntomas más tarde que las demás, si bien todas ellas presentaron una mortalidad del 100% al final el ensayo. En nuestro ensayo, parece que las procedencias del norte son las más susceptibles, si bien no se encontraron diferencias en el comienzo, fin y duración de los síntomas. Esto podría ser debido a que estas variables no miden exactamente lo mismo que en el estudio realizado con *P. sylvestris*, ya que en nuestro caso para el cálculo de estas variables solo se tuvieron en cuenta aquellas plántulas que murieron antes de finalizar el ensayo, no la totalidad de las mismas. Por todo lo comentado hasta ahora, se considera de interés estudiar la posible relación significativa entre la susceptibilidad a *B. xylophilus* y los parámetros geoclimáticos de origen en *P. pinaster*.

6. Conclusiones

Los resultados muestran una variación significativa en susceptibilidad a *B. xylophilus* entre procedencias, lo cual indica la posibilidad de incluir este carácter en la mejora genética de esta especie.

La supervivencia media en este ensayo fue del 44% sugiriendo, al igual que otros autores, que es una especie moderadamente susceptible. No obstante, algunas de las procedencias mostraron una baja susceptibilidad, incluso la procedencia 20, Sierra Bermeja mostró un 100% de supervivencia.

Las correlaciones encontradas en este ensayo muestran que aquellas procedencias que presentan más desarrollo en variables morfológicas tienden a presentar una mayor susceptibilidad frente a *B. xylophilus*. De hecho, el huerto semillero francés mostró un mayor desarrollo de crecimiento en altura y un menor valor en supervivencia en comparación con el huerto semillero gallego, el cual mostró una supervivencia más alta pero menor tasa de crecimiento. Esta relación negativa entre estos dos caracteres de interés habrá que tenerla muy en cuenta en los programas de mejora, con el fin de poder seleccionar aquellos genotipos que mejoren la resistencia al NMP sin comprometer el crecimiento en altura.

Por último, se ha observado una mayor susceptibilidad en las procedencias ubicadas en el noroeste peninsular frente al sur-suroeste peninsular, por lo que es interesante realizar futuros análisis para determinar si existe una relación entre supervivencia y variables geoclimáticas.

7. Agradecimientos

Agradecemos a Ricardo Ferradás Crespo y Sergio Frade Castro la asistencia técnica durante la ejecución del ensayo. Este trabajo ha sido desarrollado en el marco de la Acción de Cooperación “Posta en valor dos ensaios de tolerancia ó nematodo da madeira do piñeiro (AC2020-10)” financiada por FEADER (75%), Xunta de Galicia (22,5%) y Ministerio de Agricultura e Pesca, Alimentación e Medio Ambiente (2,5%).

8. Bibliografía

ALÍA, R., GARCIA DEL BARRIO, J. M., IGLESIAS, , MANCHA, J. A., DE MIGUEL, J., NICOLÁS, J. L., PÉREZ, F.; SÁNCHEZ DE RON, D.; 2009. Regiones de procedencia de especies forestales de España. Organismo Autónomo PARQUES NACIONALES. 1-363. Madrid.

BACK, M.; 2020. Pine Wilt Disease a global threat to forestry. *British Society for Plant Pathology - Plant Pandemic Study 4*. (Heft December). 1–30.

BUCCI, G., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., LE PROVOST, G., PLOMION, C., RIBEIRO, M. M., SEBASTIANI, F., ALÍA, R.; VENDRAMIN, G. G.; 2007. Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite marker. *Molecular Ecology* 16. 2137–2153.

CARRASQUINHO, I., LISBOA, A., INÁCIO, M. L.; GONÇALVES, E.; 2018. Genetic variation in susceptibility to pine wilt disease of maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton) half-sib familie *Annals of Forest Science* 75. 75–85.

CONSEJERÍA DE FOMENTO Y MEDIO AMBIENTE. 2021. ORDEN FYM/929/2021, de 28 de julio, por la que se declara contaminado un árbol situado en el monte de Utilidad Pública n.º 113, denominado «Arca y Buitrera», en el término municipal de Sotoserrano (Salamanca), por el nematodo de la madera del pino, Bursap. Boletín Oficial de Castilla y León. 39935–39937.

DAUB, M.; 2008. Investigations on pathogenicity, invasion biology and population dynamics of the Pine Wood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner und Buhner 1934). Dissertation, Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität.

DAVYDENKO, K., NOWAKOWSKA, J. A., KALUSKI, T., GAWLAK, M., SADOWSKA, K., GARCÍA, J. M., DIEZ, J. J., OKORSKI, A.; OSZAKO, T.; 2018. A comparative study of the pathogenicity of *Fusarium circinatum* and other *Fusarium* species in Polish Provenances of *P. sylvestris* L. *Forests* 9. 1–13.

DE LA FUENTE, B.; SAURA, ; 2021. Long-term projections of the natural expansion of the pine wood nematode in the iberian Peninsula. *Forests* 12. 1-14.

DE LA FUENTE, B., SAURA, ; BECK, P. A.; 2018. Predicting the spread of an invasive tree pest: The pine wood nematode in Southern Europe. *Journal of Applied Ecology* 55. (Heft 5). 2374–2385.

DÍAZ, R., SOUTULLO, P., MOLINA, B.; ALONSO, M.; 2017. Susceptibilidad de seis especies de coníferas al marchitamiento del pino causado por *Bursaphelenchus xylophilus*. 7º Congreso Forestal Español. 1–8.

EPPO; 2022. *Bursaphelenchus xylophilus*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. Available online. <https://gd.eppo.int>

EVANS, H. F., MCNAMARA, D. G., BRAASCH, H., CHADOEUF, J.; MAGNUSSON, C.; 1996. Pest Risk Analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on

Bursaphelenchus xylophilus and its vectors in the genus *Monochamus*. *EPPO Bulletin* 26. (Heft 2). 199–249.

FUJIMOTO, Y., TODA, T., NISHIMURA, K., YAMATE, H.; FUYUNO, S.; 1989. Breeding project on resistance to the pine-wood nematode. An outline of the research and the achievement of the project for ten year *Bull. For. Tree. Breed.* 7. 1–84.

FUTAI, K.; 2013. Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* . *Annual Review of Phytopathology* 51. 61–83.

HAKAMATA, T., KATO, K.; YAMAMOTO, S.; 2013. Correlation of seedling size and branch number with disease resistance of *Pinus thunbergii* seedlings to *Bursaphelenchus xylophilus* *Forest Pathology* 43. 238–244.

HIRAO, T., FUKATSU, E.; WATANABE, A.; 2012. Characterization of resistance to pine wood nematode infection in *Pinus thunbergii* using suppression subtractive hybridization. *BMC Plant Biology* 12. 1-14.

HODGE, G. R.; DVORAK, W. S.; 2007. Variation in pitch canker resistance among provenances of *Pinus patula* and *Pinus tecunumanii* from Mexico and Central America. *New Forests* 33. 193–206.

HOPF-BIZIKS, A.; SCHRÖDER, T.; 2019. Population dynamics and pathogenicity of *Bursaphelenchus xylophilus* in seven- to eight-year-old *Pinus sylvestris* trees. *Journal für Kulturpflanzen* 71. 109–130.

HOPF-BIZIKS, A., SCHRÖDER, T.; SCHÜTZ, ; 2016. The pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (steiner; buhrer) nickle, and its pathogenicity to german *Pinus sylvestris* provenances. *Journal of Plant Diseases and Protection* 123. 43–49.

INÁCIO, M. L., 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. *Forest Pathology* 45. 235–238.

JARAMILLO-CORREA, J. P., RODRÍGUEZ-QUILÓN, I., GRIVET, D., LEPOITTEVIN, C., SEBASTIANI, F., HEUERTZ, M., GARNIER-GÉRÉ, P. H., ALÍA, R., PLOMION, C., VENDRAMIN, G. G.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; 2015. Molecular proxies for climate maladaptation in a long-lived tree (*Pinus pinaster* Aiton, Pinaceae). *Genetics* 199. 793–807.

KURODA, K.; 2008. Physiological Incidences Related to Symptom Development and Wilting Mechanism BT - Pine Wilt Disease. In: ZHAO, B. G., FUTAI, K., SUTHERLAND, J. R.; TAKEUCHI, Y. Hrsg.: 204–222.

LEE, I. H., HAN, H., KOH, Y. H., KIM, I. , LEE, W.; SHIM, D.; 2019. Comparative Transcriptome Analysis of *Pinus densiflora* Following Inoculation with Pathogenic (*Bursaphelenchus xylophilus*) or Non-pathogenic Nematodes (*B. thailandae*). *Scientific Reports* 9. 1–11.

LÓPEZ-GOLDAR, X., SAMPEDRO, L.; ZAS, R.; 2015. Defensive strategies in *Pinus pinaster*: interpopulation variation in constitutive and induced allocation to chemical defence. Póster.

MARTÍN-GARCÍA, J., LUKAČEVIČOVÁ, A., FLORES-PACHECO, J. A., DIEZ, J. J.; DVOŘÁK, M.;

2018. Evaluation of the susceptibility of several czech conifer provenances to *Fusarium circinatum*. *Forests* 9. 1–11.

MARTÍN-GARCÍA, J., PARASCHIV, M., FLORES-PACHECO, J. A., CHIRA, D., DIEZ, J. J.; FERNÁNDEZ, M.; 2017. Susceptibility of several northeastern conifers to *Fusarium circinatum* and strategies for biocontrol. *Forests* 8. 1-12.

MATSUNAGA, K., IKI, T., HIRAO, T., OHIRA, M., YAMANOBÉ, 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 inoculation tests. *Forests* 11.

MATSUNAGA, K., MIYATA, , IWAIZUMI, M., IKI, T., HIRAO, T., KURITA, M., KURAMOTO, N., TAMURA, M.; WATANABE, A.; 2016. Genetic diversity and pinewood nematode resistant breeding project of *Pinus thunbergii* in Kyushu region. *127th Annual JFS Meeting*. 1-6.

MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ, M., ALONSO, M., JIMENEZ, E., TOVAL, G., MANSILLA, P., ABELLEIRA, A., ABELLEIRA-SANMARTIN, A.; DIAZ, R.; 2017a. Interspecific variation of constitutive chemical compounds in *Pinus* spp. xylem and susceptibility to pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *European Journal of Plant Pathology* 150. 939–953.

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. *Annals of Forest Science* 74. 1-15

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*). *Forestry* 91. 38–48.

MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ, M., VILLAR, L.; DÍAZ, R.; 2021. Virulence of seven pathogenic *Bursaphelenchus xylophilus* isolates in *Pinus pinaster* and *Pinus radiata* seedlings and its relation with multiplication. *Forest Pathology* 51. 1–11.

MAPAMA; 2020. Programa Nacional Para La Aplicación De La Normativa Fitosanitaria Plan Nacional De Contingencia De Tefrítidos No Europeos.

MITECO; 2020. Anuario de estadística forestal 2018. 1-103.

MORGENSTERN, E.K.; 1996. Geographic Variation in Forest Trees. Genetic Basis and Application of Knowledge in Silviculture. UBC Press, Vancouver. 209.

MOTA, M. M., FUTAI, K.; VIEIRA, P.; 2009. Pine Wilt Disease And The Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* BT. In: CIANCIO, A.; MUKERJI, K. G. Hrsg.: Integrated Management of Fruit Crops Nematode 253–274.

NAVES, P., CAMACHO, , SOUSA, E.; QUARTAU, J.; 2007. Transmission of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* through feeding activity of *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae). *Journal of Applied Entomology* 131. 21–25.

OKAMURA, Y., TODA, T.; UBUKATA, M.; 2010. Results of the cooperative development of

technology for pine wilt nematode resistance breeding in Anhui Province. *For. Tree Breed.* 237. 21–28.

PERRY, A., BROWN, A. V., CAVERS, , COTTRELL, J. E.; ENNOS, R. A.; 2016. Has Scots pine (*Pinus sylvestris*) co-evolved with *Dothistroma septosporum* in Scotland? Evidence for spatial heterogeneity in the susceptibility of native provenance *Evolutionary Applications* 9. 982–993.

PIMENTEL, C. , MCKENNEY, J., FIRMINO, P. N., CALVÃO, T.; AYRES, M. P.; 2020. Sublethal infection of different pine species by the pinewood nematode. *Plant Pathology* 69. 1565–1573.

R CORE TEAM; 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

PRADA, E., ALÍA, R., CLIMENT, J.; DÍAZ, R.; 2014. Seasonal cold hardiness in maritime pine assessed by different methods. *Tree Genetics and Genomes* 10. 689–701.

ROMERALO, C., WITZELL, J.; DIEZ, J. J.; 2016. Aleppo pine provenances vary in susceptibility and secondary chemical response to *Gremmeniella abietina* infection. *Plant Pathology* 65. 664–672.

SANTOS-DEL-BLANCO, L., CLIMENT, J., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; PANNELL, J. R.; 2012. Genetic differentiation for size at first reproduction through male versus female functions in the widespread Mediterranean tree *Pinus pinaster*. *Annals of Botany* 110. 1449–1460.

SOLIMAN, T., MOURITS, M. C. M., VAN DER WERF, W., HENGVELD, G. M., ROBINET, C.; LANSINK, A. G. J. M. O.; 2012. Framework for Modelling Economic Impacts of Invasive Species, Applied to Pine Wood Nematode in Europe. *PLoS ONE* 7.

SOLIÑO, M., YU, T., ALÍA, R., AUÑÓN, F., BRAVO-OVIEDO, A., CHAMBEL, M. R., DE MIGUEL, J., DEL RÍO, M., JUSTES, A., MARTÍNEZ-JAUREGUI, M., MONTERO, G., MUTKE, , RUIZ-PEINADO, R.; GARCÍA DEL BARRIO, J. M.; 2018. Resin-tapped pine forests in Spain: Ecological diversity and economic valuation. *Science of the Total Environment* 625. 1146–1155.

SON, J. A.; MOON, Y. S.; 2013. Migrations and multiplications of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* in *Pinus thumbergii* in relation to their pathogenicity. *Plant Pathology Journal* 29. 116–122.

VICENTE, C., ESPADA, M., VIEIRA, P.; MOTA, M.; 2012. Pine Wilt Disease: A threat to European forestry. *European Journal of Plant Pathology* 133. 89–99.

YAMANOBÉ, T.; 2009. Relationships between morphological traits and resistance to pine wood nematode in two Japanese pines. *European Journal of Plant Pathology* 124. 543–552.