

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**  
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de  
Biosistemas



**Interacción de *Fusarium circinatum* y  
*Pinus pinaster*: mecanismos de defensa  
en planta y evolución espacio-temporal  
del patógeno en España**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada para optar al título de Doctor por:

**David Fariña Flores**

Graduado en Biología

Máster en Investigación y Avances en Microbiología

Madrid, 2024



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID  
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica,  
Alimentaria y de Biosistemas

**Doctorado en Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas  
y Microorganismos Asociados**

**Interacción de *Fusarium circinatum* y  
*Pinus pinaster*: mecanismos de defensa  
en planta y evolución espacio-temporal  
del patógeno en España**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada para optar al título de Doctor por:

**David Fariña Flores**

Graduado en Biología

Máster en Investigación y Avances en Microbiología

Bajo la dirección de:

**Dra. Rosa Raposo Llobet**

Madrid, 2024

Título: Interacción de *Fusarium circinatum* y *Pinus pinaster*: mecanismos de defensa en planta y evolución espacio-temporal del patógeno en España

Autor: David Fariña Flores

Programa de Doctorado: Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas y Microorganismos Asociados

Dirección de tesis:

Dra. Rosa Raposo Llobet

Científica Titular de OPIs

Instituto de Ciencias Forestales, INIA-CSIC, Madrid

Revisores externos:

Tribunal de tesis:

Fecha de defensa:

Este trabajo se ha desarrollado en el marco del proyecto RTA2017-00063-C04-01, financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa y el proyecto PID2020-118734RR-C21, financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033. David Fariña-Flores ha sido financiado por la Agencia Estatal de Investigación, con un contrato predoctoral, PRE2018-086768.



*A mi madre, a mi abuela y a todas las mujeres que me han aupado sobre sus  
hombros para que llegue hasta aquí*



# Agradecimientos

Han sido cinco años intensos en donde he vivido cosas que nunca pensé vivir. Dejar mi casa en Canarias, a mis amigos y familia para empezar desde 0 en Madrid fue difícil, lo cual después se complicó con una pandemia, un confinamiento, un volcán al lado de mi casa... Sin embargo, el nexo común y positivo que me ha acompañado durante este periodo ha sido esta tesis, a veces dura, pero la cual me ha permitido rodearme de personas a las que le debo mucho y las que aquí y ahora les quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

He de empezar con los integrantes del grupo de patología forestal, mis compañeros, los cuales me han acompañado día a día y sin los que esta tesis y este trabajo nunca habría salido adelante. Empiezo por Maite, una de las personas más trabajadoras que conozco, siempre amable, atenta y dispuesta a ayudar y una persona con una extraordinaria calidez humana. Continuo con Laura, la cual termino la tesis justo antes de que yo la empezara y que por lo tanto siempre la he tenido de ejemplo y ayuda. También a Marga, la cual a pesar de que decidiera continuar su vida profesional por otro camino compartió conmigo mis primeros años en el grupo, echare de menos nuestras conversaciones comentando las últimas noticias con el café de la mañana. También a todas las personas que han pasado por el edificio para hacer prácticas, TFGs, TFMs, etc. he aprendido de vosotros casi más que lo que yo os he podido enseñar, en especial a Andrea, por hacer conmigo la parte del crecimiento del patógeno con la resina, mucha suerte y mucho ánimo con tu tesis. Por último, a Rosa, mi directora y la cabeza del grupo, muchas gracias por invitarme a trabajar con vosotras, acogerme y hacerme sentir uno más desde el primer día. Has trabajado mucho más de lo que cualquier director de tesis estaría obligado a hacer y siempre estaré agradecido por ello.

También quiero agradecerles a mis compañeros del edificio de corcho, en especial al doctor Lee Robertson, mi vecino de mesa, por sus consejos sobre los experimentos y por debatir con nosotros para llegar a buen puerto y a la doctora Maite de Troya, la cual siempre ha tenido la puerta de su despacho abierta para mí y ha sido un apoyo en los momentos en los que he querido tirar la toalla. Siempre he considerado nuestro edificio como una especie de “república independiente” dentro del INIA y estoy contento de haberlo compartido con excelentes personas.

Dentro del CIFOR y del INIA este trabajo le debe mucho al grupo de aquel entonces de Maribri, gracias al cual se pudo hacer toda la parte del análisis del

perfil terpénico de este trabajo, tengo que agradecerles especialmente por hacerme sentir muy cómodo trabajando en vuestro laboratorio y por guiarme en la farragosa tarea de interpretar los espectros. En especial quiero agradecerle a Susana, no solo por pincharme las muestras en el cromatógrafo sino también por su amabilidad y amistad. También al grupo de Jaime Cubero, ya no solo por haberles gorroneado el lector de placas durante casi un año entero, sino por su calidez y por sus consejos. Por último, a María Conde, la cual es la responsable de las magníficas imágenes de microscopia óptica que analizo en esta tesis y con la que aprendí mucho el tiempo que estuve haciendo cortes con ella.

Fuera del INIA quiero agradecerle a Mónica Berbegal, con la cual realizamos el trabajo de la estructura de la población del patógeno. Gracias por sacar tiempo de donde no lo tenías y por ayudarnos. También me gustaría agradecerles a todas las personas que nos proporcionaron parte de los aislados que hemos utilizado y al grupo de Rafa Zas y Luis Sampedro en la Misión Biológica de Galicia, por recibirnos en su centro y por acompañarnos al campo a buscar a *Fusarium*. Por último, a Eugenia Iturrutxa y la gente del País Vasco, gracias por prestarnos vuestras instalaciones para poder realizar los ensayos de bioseguridad y por la gran calidez personal mostrada lo cual me hizo romper los tópicos infundados que traía sobre la “gente del norte”.

Fuera de lo profesional quiero empezar dándole las gracias a las dos personas con las que he vivido en esta ciudad. Marta, amiga de ya 12 años, quien lo iba a decir cuando venías al piso a hacer los trabajos de la carrera con Andrea. Me aguantaste en Granada en el Máster y me diste la bienvenida a Madrid. Pasaste conmigo el confinamiento en nuestro zulito de Carabanchel y te viniste conmigo a nuestro zulo de verdad de Quevedo. Gracias por todas las conversaciones, consejos, chistes y risas, por apoyarme y por aguantarme, no hubiera sido lo mismo sin ti. Y a Raúl, madrileño de pura cepa, el cual me arrastró a la periferia para vivir mejor. Aunque no te lo reconozca he aprendido mucho de ti y de tu manera de ver las cosas. Has estado a mi lado en las épocas más difíciles sirviéndome de apoyo y de compañía, gracias.

A todos mis amigos de la palma, Tamara, Andrea, María, Ales y Airam. Os debo horas de playa y de planes y el único motivo por el que todavía Tamara no me ha hecho de taxi después de sacarse el carnet ha sido terminar la tesis. Muchas gracias por recargarme las pilas cada vez que iba y darme la energía para continuar. También a todos mis excompañeros del ICIA en Tenerife, en especial a Marta y a Mery, os recuerdo con mucho cariño.

Por último, a los más importantes, mi familia. A mi familia de Gran Canaria por ser un ejemplo para seguir, por su cariño y por criarme durante todas las vacaciones cuando era niño. En especial mi abuela, que ha sido como una segunda madre, y mi abuelo, que ha sido como un segundo padre. A mi padre, el cual me motivó a estudiar la naturaleza. Finalmente, a mi madre, Teresa, la cual ha sido un pilar fundamental en mi vida y en mi desarrollo, ha luchado por mí más allá de lo imaginable y aunque la vida no ha sido siempre fácil para los dos siempre ha sido la mejor madre. Estos últimos años han sido especialmente duros para ella y me ha pesado no poder estar ahí, aun así, siempre me ha apoyado y ayudado, gracias.



## Abstract

Pine Pitch Canker (PPC), caused by the fungus *Fusarium circinatum* Nirenberg & o'Donnell, is a disease that causes significant economic and ecological losses in nurseries and forest plantations worldwide. PCC affects at least 60 species of the *Pinus* genus and is considered one of the most important diseases in conifers. In Spain, *F. circinatum* is an introduced fungal pathogen extended to the northern regions of the country. Here, *Pinus radiata* and *P. pinaster* are the two species most affected by the disease. *P. radiata* is one of the most susceptible species, while *P. pinaster* is moderately resistant.

An analysis of the genetic structure of the pathogen population in Spain, carried out shortly after it was established in the Peninsula, showed that the population was structured in two clusters, each one with a predominant haplotype, a situation compatible with two independent pathogen introductions in Spain. Moreover, this analysis showed that the population was mainly clonal and that there was no evidence that sexual reproduction was producing. In the time since its introduction, the change that may have occurred in the genetic structure is unknown.

The PPC is characterized by cankers in the branches and main stem with abundant resin production. Typically, resin is part of the constitutive defensive system of conifers and as part of the defensive response to invading organisms, pines synthesize de novo induced resin which accumulates and produces in the constitutive and induced resin canals. This resin is mainly composed of terpenes and it acts as a chemical defense because it contains compounds that are toxic or inhibitory to the growth of the pathogen. Nevertheless, *F. circinatum* colonizes the plant using constitutive and traumatic resin ducts, suggesting that it is resin tolerant. There is also evidence that the most susceptible species produces more resin.

The work presented here is structured into three distinct sections. The objective of the first of them is to quantify the genetic diversity of Spanish *F. circinatum* populations infecting pine stands and to determine how this variation is distributed in a temporal and spatial scale. For this purpose, we analyzed the population structure using six polymorphic SRR markers, and identified 15 MLGs in 66 isolates. In general, genotypic diversity was low and decreased over time in the northwestern regions (Galicia and Asturias) while maintained at País Vasco,

where only one haplotype was detected. This region also includes a single mating group with two VCGs, while the isolates from the northwest area were from one of the two possible mating groups and from one of the 11 VGCs. The pathogen in País Vasco remains clearly differentiated from other northwestern populations. Results are explained by the asexual reproduction, but also selfing, at least to a lesser extent, that leads to identification of two new haplotypes.

The second objective was to evaluate the growth of *F. circinatum* in the presence of constitutive and induced resin of *P. pinaster* and *P. radiata* using spectrophotometric techniques. The pathogen was grown in minimum medium supplemented with resin in the wells of a microplate for 6 days, and the absorbance at 597 nm was measured as an indicator of fungal biomass. The results showed that resin from *P. pinaster* and *P. radiata* stimulated fungal growth. Besides, *F. circinatum* grew 40% more in the hexane extract of the induced resin than in the constitutive resin of *P. radiata*.

Finally, we compared the anatomical resin system and terpene profiles in both species infected with *F. circinatum*. We used a previous transcriptomic study of the *P. pinaster*-*F. circinatum* to study the expression of genes related to terpene biosynthesis. The formation of induced ducts occurred in the cortex and xylem of *P. radiata*, these ducts having a greater diameter, density and conductive area than in *P. pinaster*. In this last species, the expression of genes related to the mevalonate pathway responsible for the synthesis of terpene precursors increased, as well as the expression of sesquiterpene synthases. In *P. radiata* the amount of total resin increased, as well as monoterpenes and diterpenes. Our results confirm that the species most susceptible to the pathogen, *P. radiata*, induced larger resin ducts and produced more resin than *P. pinaster*, which occurs in a similar way in pathogens that use resin ducts for host colonization. By comparing terpene profiles, we identified a group of terpenes potentially involved in plant defense. The greater resistance of *P. pinaster* may also be due to a faster response in terpene abundance to infection.

## Resumen

El chancro resinoso del pino (PPC), causado por el hongo *Fusarium circinatum* Nirenberg & o'Donnell, es una enfermedad que provoca importantes pérdidas económicas y ecológicas en viveros y plantaciones alrededor del mundo. PPC afecta al menos a 60 especies del género *Pinus* y es considerada como una de las enfermedades más importantes en coníferas. En España *F. circinatum* es un hongo patógeno introducido y está extendido a lo largo de la región septentrional del país. Aquí *P. radiata* y *P. pinaster* son las dos especies mayormente afectadas por la enfermedad. *P. radiata* es una de las especies más susceptibles, mientras que *P. pinaster* es moderadamente resistente.

Un análisis de la estructura genética de la población del patógeno en España, hecho al poco tiempo de haberse establecido en la Península, mostraba que la población se estructuraba en dos grupos, cada uno con un haplotipo dominante, una situación compatible con dos introducciones independientes del patógeno en el país. Además, este análisis evidenciaba que la población era principalmente clonal y que no había evidencias de que se estuviera produciendo reproducción sexual. En el tiempo transcurrido desde su introducción, se desconoce el cambio que puede haberse producido en la estructura genética.

El PPC se caracteriza por chancros en las ramas y en el tallo principal con abundante producción de resina. Típicamente la resina forma parte del sistema defensivo constitutivo de las coníferas y los pinos sintetizan *de novo* resina inducida la cual se acumula y produce en los canales resiníferos constitutivos e inducidos. Esta resina está compuesta principalmente por terpenos y actúa como una defensa química debido a que contiene compuestos tóxicos o inhibitorios para crecimiento del patógeno. Sin embargo, *F. circinatum* coloniza la planta usando los canales resiníferos constitutivos y traumáticos, lo que sugiere que es tolerante a la resina. Además, hay evidencia de que las especies más susceptibles producen más cantidad de resina.

El trabajo aquí presentado se puede estructurar en tres apartados diferenciados. El objetivo del primero de ellos es cuantificar la diversidad genética de la población española de *F. circinatum* que infecta a las plantaciones de pinos y determinar cómo se ha distribuido la variación en una escala temporal y espacial. Para ello hemos analizado la estructura de la población usando seis marcadores polimórficos SRR y hemos identificado 15 MLGs en 66 aislados. En general, la diversidad genotípica fue baja y disminuyó con el tiempo en las regiones del noroeste (Galicia

y Asturias), mientras que se mantuvo en el País Vasco, donde solo se ha detectado un haplotipo. En esta región también se incluye un solo grupo de apareamiento con dos VCGs, mientras que los aislados del área noroeste eran de uno de los dos grupos posibles de apareamiento y de alguno de los 11 VGCs. El patógeno en el PV se mantiene claramente diferenciado de otras poblaciones del noroeste. Los resultados se explican por la reproducción asexual, pero también por el autocruzamiento, al menos en menor medida, que conduce a la identificación de dos nuevos haplotipos.

El segundo objetivo consistió en evaluar el crecimiento de *F. circinatum* en presencia de la resina constitutiva e inducida de *P. pinaster* y *P. radiata* utilizando para ello técnicas espectrofotométricas. Para esto, el patógeno fue cultivado en medio mínimo suplementado con resina en los pocillos de una microplaca durante 6 días, y se midió la absorbancia a 597 nm como indicador de biomasa fúngica. Los resultados mostraron que la resina de *P. pinaster* y *P. radiata* estimulaban el crecimiento fúngico. Además, *F. circinatum* creció un 40% más en el extracto de hexano de la resina inducida que en la resina constitutiva de *P. radiata*.

Por último, comparamos los canales resiníferos y el perfil terpénico de ambas especies infectadas por el hongo. También utilizamos un estudio transcriptómico previo de la interacción *P. pinaster*-*F. circinatum*, con el fin de estudiar la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de terpenos. La formación de canales inducidos se produjo en el córtex y xilema de *P. radiata*, teniendo estos un diámetro, densidad y área conductora mayor que en *P. pinaster*. En esta última especie aumentó la expresión de los genes relacionados con la vía del mevalonato, responsable de síntesis de precursores terpénicos, así como la expresión de las sesquiterpenos sintetas. En *P. radiata* aumento la cantidad de resina total, así como los monoterpenos y diterpenos. Nuestros resultados confirman que la especie más susceptible al patógeno, *P. radiata*, indujo canales resiníferos más grandes y produjo más resina que *P. pinaster*, lo cual ocurre de manera similar en patógenos que utilizan canales resiníferos para la colonización del huésped. Mediante la comparación de los perfiles terpénicos identificamos un grupo de terpenos potencialmente involucrados en la defensa de las plantas. La mayor resistencia de *P. pinaster* también puede ser debida a una respuesta más rápida en el contenido de terpenos frente a la infección.

# Tabla de Contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Fusarium circinatum</i> Nirenberg & O'Donnell.....	1
1.1.1. Taxonomía e identificación .....	1
1.1.2. Biología del patógeno.....	3
1.2. El género <i>Pinus</i> .....	4
1.3. El chancro resinoso del pino .....	5
1.3.1. Origen y distribución actual .....	8
1.3.2. Infección y colonización de la planta .....	9
1.3.3. Dispersión del patógeno .....	10
1.3.4. Condiciones ambientales y cambio climático .....	12
1.4. Métodos de control .....	15
1.4.1. Programas de mejora y manejo de la resistencia genética.....	17
1.4.2. Estrategias basadas en el control biológico.....	17
1.4.3. Otras medidas .....	19
1.5. Mecanismos de variación genética en hongos .....	21
1.5.1. Diversidad genética de <i>Fusarium circinatum</i> .....	22
1.6. Mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos .....	24
1.6.1. Mecanismos moleculares en el reconocimiento e interacción planta-patógeno y defensa vegetal .....	25
1.6.2. La oleoresina como defensa en <i>Pinus</i> spp .....	26
1.6.3. Perfil transcriptómico de la interacción entre <i>Pinus</i> spp y <i>Fusarium circinatum</i> .....	32
<b>2. Objetivos</b>	<b>35</b>
<b>3. Material y métodos</b>	<b>37</b>
3.1. Variación temporal y espacial en la estructura genética de la población española de <i>Fusarium circinatum</i> .....	37
3.1.1. Muestreo y material fúngico .....	37
3.1.2. Extracción de ADN .....	39
3.1.3. Determinación del Grupo de apareamiento.....	40
3.1.4. Determinación de haplotipos por marcadores SSR .....	40
3.1.5. Determinación de los grupos de compatibilidad vegetativa.....	41
3.1.6. Análisis estadístico de los datos.....	43
3.2. Efecto de la resina de <i>Pinus pinaster</i> y <i>Pinus radiata</i> en el crecimiento de <i>Fusarium circinatum</i> .....	45
3.2.1. Material vegetal y fúngico, inoculación y extracción de la resina .....	45
3.2.2. Medida del crecimiento de <i>Fusarium circinatum</i> .....	47
3.2.3. Análisis estadístico .....	49
3.3. Respuesta defensiva de <i>Pinus pinaster</i> y <i>Pinus radiata</i> frente a <i>Fusarium circinatum</i> .....	49
3.3.1. Material vegetal, inoculación y extracción de la resina .....	49

3.3.2.	Respuesta anatómica .....	50
3.3.3.	Respuesta del perfil terpenico frente a <i>Fusarium circinatum</i> .....	52
3.3.4.	Respuesta transcriptómica.....	54
<b>4.</b>	<b>Resultados</b>	<b>59</b>
4.1.	Variación temporal y espacial de la estructura genética de la población española de <i>Fusarium circinatum</i> . .....	59
4.1.1.	Diversidad genética.....	59
4.1.2.	Reproducción sexual y clonalidad .....	62
4.1.3.	Estructura genética. ....	64
4.1.4.	VCGs.....	69
4.2.	Efecto de la resina de <i>Pinus pinaster</i> y <i>Pinus radiata</i> en el crecimiento de <i>Fusarium circinatum</i> .....	70
4.3.	Respuesta defensiva de <i>Pinus pinaster</i> y <i>Pinus radiata</i> frente a <i>Fusarium circinatum</i> .....	76
4.3.1.	Longitud de la lesión .....	76
4.3.2.	Respuesta anatómica .....	76
4.3.3.	Respuesta del perfil terpenico frente a <i>Fusarium circinatum</i> .....	80
4.3.4.	Respuesta del perfil transcriptómico.....	100
<b>5.</b>	<b>Discusión</b>	<b>107</b>
5.1.	Variación temporal y espacial de la estructura genética de la población española de <i>Fusarium circinatum</i> .....	107
5.2.	Respuesta defensiva de la planta y especialización del patógeno .....	110
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>119</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>121</b>

# Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> A. Crecimiento de <i>F. circinatum</i> en PDA. B. Conidióforos con microconidias. C. Conidioforos polifilídios D. Microconidias E. Circinos de <i>F. circinatum</i> en SNA. F. Macro y microconidias. ....	4
<b>Figura 2</b> Distribución del género <i>Pinus</i> a escala global (tomado de Farjon, 2021). ....	5
<b>Figura 3.</b> Principales síntomas del PPC. A. Daño en plántula inoculada artificialmente. B. Daño en plántulas infectadas en vivero. C. Chancro con abundante producción de resina y daños ocasionados en ramas secundarias. D. Chancro en rama secundaria de <i>P. pinaster</i> . E. Chancro en el tronco principal con abundante producción de resina .....	7
<b>Figura 4.</b> Mapa de la distribución de <i>F. circinatum</i> . A: Países y fechas de la primera detección. B: Distribución global de <i>F. circinatum</i> , incluyendo aquellos países en los que ha sido erradicado. Tomado de Drenkhan et al., 2020. ....	9
<b>Figura 5.</b> Vías de propagación de la enfermedad del Chancro Resinoso de Pino (tomado de Zamora-Ballesteros et al., 2019). ....	12
<b>Figura 6.</b> Esquema de los principales factores bióticos y abióticos negativos en relación al cambio climático que afectan a los ecosistemas forestales europeos (tomado de Vacek et al., 2023) .....	13
<b>Figura 7.</b> A: distribución geográfica de las especies susceptibles a <i>F. circinatum</i> en Europa (Health (PLH), 2010) y condiciones de idoneidad climática para el PPC generadas por el modelo CLIMEX (Ganley et al 2009). B: Porcentaje de riesgo en España de ocurrencia del PPC utilizando un modelo de distribución de especies (tomado de Serra-Varela et al., 2017). ....	15
<b>Figura 8.</b> Principales modos de reproducción y sistemas de apareamiento en hongos (Adaptado de Billiard et al., 2012). ....	22
<b>Figura 9.</b> Minimum spanning network que muestra la relación entre los MLGs individuales observados en la muestra global (A) y España (B). La distancia entre los nodos es proporcional a la distancia genética de Bruvo (tomado de Berbegal et al., 2013).....	23
<b>Figura 10.</b> Rutas MVA y MEP para la síntesis de terpenos.....	28
<b>Figura 11</b> Sección de un corte transversal del ápice de una plántula de <i>P. radiata</i> de 11 meses de edad.....	31

<b>Figura 12.</b> A: Fenotipado de mutante <i>nit</i> de <i>F. circinatum</i> en medio mínimo suplementado con hipoxantina. Arriba a la izquierda se encuentra el aislado original, en la mitad derecha mutantes <i>nit1/3</i> , que presentan un crecimiento igual al del aislado original. Abajo a la izquierda, un mutante <i>nitM</i> , con el crecimiento característico del micelio con hifas finas y transparentes y sin parte aérea. B: Cruzamientos entre mutantes <i>nitM</i> y mutantes <i>nit1/3</i> en Czapeck. Se observa la formación de un micelio denso en el área donde se entrecruzan los aislados del mismo VCG .....	43
<b>Figura 13.</b> Crecimiento de <i>F. circinatum</i> en medio basado en peptona y en presencia de hexano y metanol a las concentraciones del 0,8, 1,5 y 3%, utilizadas posteriormente para analizar el efecto de la resina. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar. Se incluye la significancia de los valores de absorbancia entre el crecimiento del hongo sin disolvente y el crecimiento con el disolvente a las concentraciones utilizadas....	48
<b>Figura 14.</b> Proceso de preparación de muestras. A: Material vegetal de partida. B: Procesador de tejidos. C: Muestras embebidas en bloques de parafina. D: Corte de secciones transversales en el micróscopio de rotación. E: Montaje de las secciones en el portaobjetos. F: Muestras teñidas .....	52
<b>Figura 15.</b> Frecuencia de MLGs identificados en la población española de <i>F. circinatum</i> . A. Por muestreo. B. Por origen geográfico. Se ha adoptado el número de identificación de cada MLG de Berbegal et al., 2013. MLG 101 y MLG 102 son los nuevos haplotipos detectados en el muestreo 2. Los aislados del muestreo 1 se recolectaron entre los años 2004-2011 y los del muestreo 2 entre los años 2018-2021, obteniéndose de viveros (Nurs), País Vasco (PV), Galicia (Gal) y Asturias (Ast).....	60
<b>Figura 16.</b> Curva de acumulación genotípica. Numero de MLGs identificados en función del número de loci muestreados. La distribución para cada boxplot se basa en 1000 permutaciones.....	61
<b>Figura 17.</b> Minimum spanning network basado en la distancia genética de Bruvo para los haplotipos observados en la población española de <i>F. circinatum</i> estratificada por muestreos y origen geográfico .....	66
<b>Figura 18.</b> Dendrograma NJ de los aislados españoles de <i>F. circinatum</i> basado en seis marcadores polimórficos SRR y generado mediante la distancia genética de Bruvo. Los grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) y los tipos de apareamiento (MAT-1 y MAT-2) se muestran en el lado derecho. Los valores de Bootstrap están basados en 1000 repeticiones y se muestran aquellos superiores al 50%. Aislados recogidos en el muestreo	

1 (1_) y en el muestreo 2 (2_), en las regiones de Galicia (Gal), Asturias (Ast), País vasco (PV) y viveros (Nurs).....	67
<b>Figura 19.</b> Dendrograma NJ basado en la distancia genética de Bruvo de la población española de <i>F. circinatum</i> estratificada por muestreo y origen geográfico .....	68
<b>Figura 20.</b> Efecto de la resina constitutiva e inducida de <i>P. pinaster</i> y <i>P. radiata</i> en el crecimiento de <i>F. circinatum</i> medido por la absorbancia a 597 nm a los 6 días. Las líneas entre columnas con * indican diferencias significativas según el test de Tukey ( $p>0,05$ ). ....	72
<b>Figura 21.</b> Efecto del extracto de resina constitutiva de <i>P. pinaster</i> y <i>P. radiata</i> al 3% en hexano sobre la biomasa fúngica medida por absorbancia a 597 nm después de 168 h (7 días) de crecimiento. Los valores son las medias de los mínimos cuadrados y el error estándar de 5 réplicas.....	72
<b>Figura 22.</b> Curvas de crecimiento de <i>F. circinatum</i> obtenidas mediante mediciones de absorbancia a 597 nm durante 7 días, con el fin de evaluar el efecto de terpenos individuales. Se probaron cinco réplicas para cada concentración (0, 0,5, 1, 2, 3 y 4% disueltos en DMSO).....	74
<b>Figura 23.</b> Efecto de terpenos específicos sobre el crecimiento de <i>F. circinatum</i> medido mediante absorbancia a 597 nm después de 168 h de incubación. Los valores son las medias de cinco réplicas $\pm$ el error estándar para cada concentración (0, 0,5, 1, 2, 3 y 4%) analizada. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ ). El análisis estadístico se realizó de forma independiente para cada terpeno. ....	75
<b>Figura 24.</b> Longitud de lesión en <i>P. pinaster</i> y <i>P. radiata</i> inoculados con dos aislados de <i>F. circinatum</i> (7 y 26), medida a los 12 y 19 dpi. La longitud de la lesión entre especies mostró diferencias significativas en un ANOVA ( $p=0,0001$ ), así como la interacción entre dpi y aislado a los 12 dpi ( $p=0,022$ ) .....	76
<b>Figura 25.</b> Características de los canales resiníferos medidas en el córtex (izquierda) y xilema (derecha) de plántulas de <i>P. pinaster</i> y <i>P. radiata</i> medidas a los 12 y 19 días después del tratamiento (inoculación con dos aislados de <i>F. circinatum</i> (aislados 7 (17) y 26 (126)), inoculación con agua destilada estéril (MI) y sin herida (UW). Para cada especie, las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha=0,05$ ) según un test de Tukey. Las barras unidas con * muestran diferencias significativas por pares entre especies.....	79
<b>Figura 26.</b> Ejemplo de secciones transversales del ápice de tallos de <i>P. pinaster</i> (arriba) y <i>P. radiata</i> (abajo), en los cuales se pueden observar canales resiníferos en el córtex y en el xilema en plántulas infectadas con <i>F. circinatum</i> a los 19. Las fotografías de la derecha se	

corresponden con plántulas inoculadas con el aislado 7 y las de la izquierda con el aislado 26. Nótese la alteración tisular del parénquima cortical en *P. radiata* (flechas). ..... 80

**Figura 27.** Contenido total ( $\mu\text{g/g}$  de planta) y error estándar de los distintos grupos de terpenos en plantas inoculadas con *F. circinatum* (I), plantas con inoculación con agua destilada estéril (MI), y plantas sin herida (UW). Monoterpenos (MT), Sesquiterpenos (ST), Diterpenos (DT), Ácidos resínicos (DRAs) y contenido total (T). Los valores se han obtenido a partir de la media de tres replicas y se han considerado como un solo tratamiento la inoculación con los dos aislados de *F. circinatum* al no existir diferencias significativas entre ellos. Para cada grupo de terpenos y especie, las medias con la misma letra no son significativamente distintas según un test de Tukey. Las barras unidas con \* muestran diferencias significativas entre especies..... 85

**Figura 28.** Gráficos del modelo PCA (A) y PLS-DA (B y C) para los datos normalizados del perfil terpénico obtenido mediante GC-MS de plántulas de *P. pinaster* (B) y *P. radiata* (C). Dichas plántulas se inocularon con los aislados 7 y 26 de *F. circinatum* y se recolectaron a los 12 (I712 y I2612) y 19 (I719 y I2619) dpi. También se realizó una inoculación con agua destilada estéril (MI12 y MI19) y se incluyeron plántulas sin herida (UW12 y UW19) cuyos datos se trataron de manera conjunta (UW) en los modelos PLS-DA. .... 90

**Figura 29.** Heatmaps basados en el VIP score de los 30 terpenos principales en un modelo PLS-DA para *P. pinaster* (A) y *P. radiata* (B). ..... 94

**Figura 30.** S-plot derivados de los modelos OPLS-DA para identificar los terpenos discriminantes entre las plántulas infectadas por *F. circinatum* y las inoculadas con agua destilada estéril de *P. pinaster* a los 12 y 19 dpi (A y B respectivamente) y *P. radiata* a los 12 y 19 dpi (C y D), así como los terpenos discriminantes para los 12 y 19 dpi de las plántulas de *P. pinaster* (E) y *P. radiata* (F). ..... 95

**Figura 31.** Significancia de los valores medios del contenido de los terpenos discriminantes entre plántulas infectadas y con inoculación con agua destilada estéril ..... 98

**Figura 32.** DEGs de las enzimas correspondientes en las vías MVA y MEP para la síntesis de terpenos identificadas en el transcriptoma de *P. pinaster* infectado por *F. circinatum*. Los heatmaps muestran los niveles relativos de expresión genética a los 3, 5 y 10 dpi. .... 101

**Figura 33.** Validación de los niveles de expresión relativos mediante RT-qPCR de los genes expresados diferencialmente identificados en el transcriptoma de *P. pinaster* infectado por *F. circinatum* y comparación con la expresión relativa en *P. radiata*. ..... 104

# Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Composición de los medios utilizados en el aislamiento e identificación de <i>F. circinatum</i> .....	37
<b>Tabla 2.</b> Número de aislados usados para este estudio con su procedencia geográfica y periodo de muestreo.....	39
<b>Tabla 3.</b> Loci SRR seleccionados para <i>F. circinatum</i> con sus correspondientes cebadores ...	41
<b>Tabla 4</b> Composición del medio mínimo utilizado para el fenotipado de los mutantes no utilizadores de nitrógeno ( <i>nit</i> ) de <i>F. circinatum</i> (Puhalla & Spieth, 1983) .....	42
<b>Tabla 5.</b> Proceso secuencial de deshidratación e inclusión en parafina del material vegetal	51
<b>Tabla 6.</b> Cebadores utilizados en el estudio por qPCR de los DEG codificantes para las enzimas relacionadas con la síntesis de terpenos .....	56
<b>Tabla 7.</b> Diversidad genética de los siete loci microsatélites (SRR) en la población española de <i>F. circinatum</i> .....	60
<b>Tabla 8.</b> Diversidad Genotípica para la población española de <i>F. circinatum</i> incluyendo subpoblaciones definidas por escala temporal y geográfica.....	61
<b>Tabla 9.</b> Índice estandarizado de asociación ( $\bar{r}_d$ ) y proporción de los grupos de apareamiento en las subpoblaciones españolas de <i>F.</i> estratificada temporalmente y por origen geográfico, calculados para los datos una vez realizada la corrección clonal.....	63
<b>Tabla 10.</b> Probabilidad de que un determinado MLG se encuentre en una población con reproducción sexual cuando este se observa más de una vez, para el conjunto de datos con corrección clonal de la población española de <i>F. circinatum</i> estratificada temporalmente y por origen geográfico. ....	63
<b>Tabla 11.</b> . Análisis de la variación molecular (AMOVA) para la población española de <i>F. circinatum</i> estratificada por muestreos y origen geográfico de los aislados dentro de cada muestreo.....	64
<b>Tabla 12.</b> Índice de Hendrick estandarizado de diversidad genética ( $G'st$ ) para una comparación por pares de la población española de <i>F. circinatum</i> estratificada por muestreos y origen geográfico. ....	65

<b>Tabla 13.</b> Medias de la tasa de migración (e intervalo de confianza del 95%) dentro y entre subpoblaciones de <i>F. circinatum</i> en España, estratificadas por escala temporal y geográfica. ....	68
<b>Tabla 14.</b> Grupos de compatibilidad vegetativa y de apareamiento en la población española de <i>F. circinatum</i> estratificada en escala temporal y geográfica.....	69
<b>Tabla 15.</b> Media de mínimos cuadrados de la absorbancia a 597 nm estimadas mediante un modelo mixto para analizar el efecto de la resina constitutiva e inducida de <i>P. pinaster</i> y <i>P. radiata</i> , a las concentraciones de 0.8, 1.5 y 3% en el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>F. circinatum</i> . ....	71
<b>Tabla 16.</b> Diferencias en las características de los canales resiníferos constitutivos en <i>P. pinaster</i> y <i>P. radiata</i> .....	77
<b>Tabla 17.</b> Test de tipo III en un modelo mixto para estudiar el efecto fijo de especies, días post-inoculación (dpi), y tratamiento (Inoculación con <i>F. circinatum</i> , inoculación con agua destilada estéril y plántulas sin herida), sobre los canales resiníferos de <i>P. pinaster</i> y <i>P. radiata</i> . Los efectos significativos se muestran en negrita. ....	77
<b>Tabla 18.</b> Tasa de cambio (FC) de los terpenos de la resina constitutiva que resultan significativos al comparar <i>P. pinaster</i> frente a <i>P. radiata</i> mediante un t-test de diferencia de medias.....	81
<b>Tabla 19.</b> Tasa de cambio (FC) de los terpenos de la resina constitutiva discriminantes entre <i>P. pinaster</i> y <i>P. radiata</i> .....	86
<b>Tabla 20.</b> Test de tipo III en un modelo mixto para estudiar el efecto fijo sobre la concentración total ( $\mu\text{g/g}$ planta) de cada grupo de terpenos de la especie, días post-inoculación (dpi) y tratamiento (inoculación con <i>F. circinatum</i> , inoculación con agua destilada estéril y plantas sin herida) en <i>P. pinaster</i> y <i>P. radiata</i> .....	88
<b>Tabla 21.</b> Contenido ( $\mu\text{g/g}$ de planta) y grupo (G) de los 30 terpenos incluidos en los heatmaps construidos en base a las abundancias después de los tratamientos (inoculación con <i>F. circinatum</i> (I), inoculación con agua destilada estéril (MI) y plantas sin herida (UW)) aplicados a plántulas de <i>P. pinaster</i> y <i>P. radiata</i> y medidos a los 12 y 19 dpi. Los terpenos fueron seleccionados por el VIP score $>1,3$ del modelo PLS-DA (parámetros de validación: $R^2= 0,9$ , $Q^2= 0,75$ ; $p=0,001$ para <i>P. pinaster</i> y $R^2= 0,85$ , $Q^2=0,74$ ; $p<0,0001$ , para <i>P. radiata</i> )91	91
<b>Tabla 22.</b> Tasa de cambio (FC) de los terpenos discriminantes entre las plántulas infectadas por <i>F. circinatum</i> y las plántulas inoculadas con agua destilada estéril para <i>P. pinaster</i> y <i>P. radiata</i> a los 12 y 19 dpi. Se han seleccionado los distintos terpenos a partir de un S-plot derivado del modelo OPLS-DA. Los parámetros de validación para los modelos OPLS-DA	

fueron:  $R^2Y=0.946$  y  $Q^2=0.901$  con  $p=0.014$  (*P. pinaster* a 12 dpi);  $R^2Y=0,906$  ( $p=0,028$ ) y  $Q^2=0,843$  ( $p=0,015$ ) (*P. pinaster* a 19 dpi);  $R^2Y=0,932$  (valor  $p=0,083$ ) y  $Q^2=0,870$  ( $p=0,026$ ) (*P. radiata* a 12 dpi); y  $R^2Y=0,910$  ( $p=0,007$ ) y  $Q^2=0,868$  ( $p=0,007$ ) (*P. radiata* a 19 dpi). ..... 96

**Tabla 23.** Terpenos discriminantes entre los 12 y 19 dpi para las plántulas de *P. pinaster* y *P. radiata* infectadas por *F. circinatum*. Los distintos terpenos se han seleccionado a partir de un S-plot derivado de un modelo OPLS-DA, solo se eligieron aquellos con un  $\log_2(FC) > |2|$  y significativos en la separación de clases ( $p > 0,05$ ). Parámetros de validación para los modelos OPLS-DA:  $R^2Y=0,839$ ,  $p=0,016$  y  $Q^2=0,715$  con  $p=0,002$  para *P. pinaster*; y  $R^2Y=0,969$ ,  $p=0,002$  y  $Q^2=0,905$ ,  $p=0,002$  para *P. radiata*..... 99

**Tabla 24.** Genes expresados diferencialmente relacionados con la biosíntesis de terpenos identificados en el transcriptoma de *P. pinaster* durante la infección por *F. circinatum* a los 3, 5 y 10 días después de la inoculación..... 102

## Abreviaturas y Acrónimos

<b>3Cs</b>	3-careno sintasa
<b>aBSS</b>	$\alpha$ -bisaboleno sintasa
<b>ACT</b>	actina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ADNg</b>	ADN genómico
<b>aFRS</b>	$\alpha$ -farneseno sintasa
<b>AMOVA</b>	análisis de varianza molecular
<b>ANOVA</b>	análisis de la varianza
<b>aPNS</b>	$\alpha$ -pineno sintasa
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>AST</b>	Asturias
<b>BCAs</b>	<i>Biological Control Agents</i> , agentes de control biológico
<b>BR</b>	replicas biológicas
<b>CECT</b>	colección española de cultivos tipo
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>COI1</b>	<i>Coronatine Insensitive 1</i>
<b>Cz</b>	medio de cultivo Czapeck
<b>DEG</b>	genes diferencialmente expresados
<b>DMAPP</b>	Pirofosfato de dimetilalilo
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>dpi</b>	días post inoculación
<b>DRA</b>	Diterpenos Ácidos
<b>dSLS</b>	$\delta$ -selineno sintasa
<b>DT</b>	Diterpenos

<b>DXR</b>	1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa
<b>E<sub>5</sub></b>	Uniformidad
<b>eFRS</b>	$\beta$ -farneseno sintasa
<b>eMLG</b>	número esperado de haplotipos
<b>EPPO</b>	<i>European Plant Protection Organization</i> , Organización europea de protección
<b>ETI</b>	<i>Effector-triggered immunity</i> , inmunidad activada por efectores
<b>ETS</b>	<i>Effector-Triggered Susceptibility</i> , susceptibilidad activada por efectores
<b>FC</b>	<i>Fold change</i> , tasa de cambio
<b>FPP</b>	Pirofosfato de farnesilo
<b>FSM</b>	<i>Fusarium Selective Medium</i> , medio selectivo de <i>Fusarium</i>
<b>G</b>	índice de Stoddart y Taylor de diversidad genotípica
<b>G'st</b>	Índice estandarizado de Hedrick
<b>Gal</b>	Galicia
<b>GC-MS</b>	cromatografía de gases-espectrometría de masas
<b>GFC</b>	Complejo <i>Gibberella fujikuroi</i>
<b>GGPP</b>	Pirofosfato de geranilgeranilo
<b>GPP</b>	Pirofosfato de geranilo
<b>GPS</b>	geranil difosfato sintasa
<b>H</b>	índice de Shannon-Wiener
<b>HDR</b>	4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato reductasa
<b>HIS</b>	<i>Heterokaryon self-compatibility</i> , heterocariones autocompatibles
<b>HMGR</b>	hidroximetilglutaril-CoA reductasa
<b>HR</b>	<i>Hypersensitive Response</i> , respuesta hipersensible
<b>I<sub>A</sub></b>	Índice de asociación
<b>ICSH</b>	<i>isochorismatase family hydrolase genes</i>
<b>IPMS</b>	isopiramadieno sintasa
<b>IPP</b>	Pirofosfato de Isopentenilo
<b>IPPI</b>	isopentenil-difosfato delta-isomerasa

<b>ITS</b>	<i>Internal Transcribed Spacer</i> , espaciador transcrito interno
<b>KEGG</b>	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
<b>LPMS</b>	levopimaradieno sintasa
<b>MAGRAMA</b>	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
<b>MAPK</b>	Proteínas Kinasas Activadas por Mitógenos
<b>MAT</b>	<i>Mating Type</i> , grupo de apareamiento
<b>MEP</b>	Metil Eritritol Fosfato
<b>MI</b>	Inoculación con agua destilada estéril
<b>MLG</b>	<i>Multilocus genotype</i> , genotipo multilocus
<b>MT</b>	Monoterpenos
<b>MVA</b>	<i>Mevalonate</i> , melanovato
<b>MYR</b>	mirceno sintasa
<b>NB-LRR</b>	<i>Nucleotide Binding- Leucine Rich Repeat</i> , Dominio proteico de unión a nucleótidos con repeticiones ricas en leucina
<b>NJ</b>	<i>Neighbor-Joining</i>
<b>OPLS-DA</b>	PLS-DA ortogonal
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> , patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PCA</b>	análisis de componentes principales
<b>PCR</b>	<i>Polimerasa Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDA</b>	<i>Potato dextrose agar</i> , agar de patata y dextrosa (medio de cultivo)
<b>PLS-DA</b>	análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
<b>PMVK</b>	fosfomevalonato
<b>PPC</b>	<i>Pitch Pine Canker</i> , chancro resinoso del pino
<b>PRRs</b>	<i>Pattern Recognition Receptors</i> , receptor de reconocimiento de patrones
<b>PTI</b>	<i>PAMP-triggered immunity</i> , inmunidad activada por PAMP
<b>PV</b>	País Vasco
<b>qPCR</b>	<i>quantitative Polimerasa Chain Reaction</i> , PCR cuantitativa
<b><math>\bar{r}_d</math></b>	Índice estandarizado de asociación

<b>RFLPs</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> , fragmentos de restricción de longitud polimorfica
<b>RI</b>	Índice de retención
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i> , especies reactivas de oxígeno
<b>RPW8</b>	<i>Resistance to Powdery Mildew 8</i>
<b>RT-qPCR</b>	<i>Reverse transcriptase-quantitative PCR</i> , qPCR con transcriptasa inversa
<b>Seco</b>	<i>1,3-dimethyl-2-ethyl-(3-isopropylphenyl)-cyclohexencarboxylic</i>
<b>SIR</b>	respuesta sistémica inducida
<b>SNA</b>	<i>Spezieller Nährstoffarmer agar</i> , Spezieller Nährstoffarmer con agar (medio de cultivo)
<b>SSR</b>	<i>Simple Sequence Repeat</i> , secuencias simples repetidas
<b>ST</b>	Sesquiterpenos
<b>TMAH</b>	Hidróxido de tetrametilamonio
<b>TPS</b>	Terpeno sintasa
<b>TRDs</b>	<i>traumatic resin ducts</i> , canales resiníferos traumáticos
<b>UBQ</b>	ubiquitina
<b>UW</b>	sin herida
<b>var</b>	Variedad
<b>VCG</b>	<i>Vegetative compatibility groups</i> , grupos de compatibilidad vegetativa
<b>VIP</b>	<i>Variable Importance in Projection</i> variable de importancia en la proyección



# 1. Introducción

## 1.1. *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell

### 1.1.1. Taxonomía e identificación

*Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell pertenece a la división Ascomycota, subdivisión Pezizomycota, clase Sordariomycetes, subclase Hypocreomycetidae, orden Hypocreales y familia Nectriaceae. Este hongo ha sufrido algunos cambios en su clasificación taxonómica desde que fue aislado por primera vez en 1945 en el Sureste de Estados Unidos (Hepting & Roth, 1946). Este trabajo describía un bosque mixto de *Pinus virginiana* Mill, *P. rígida* Mill y *P. echinata* Mill donde los árboles adultos mostraban síntomas de una patología caracterizada por la presencia de chancros con abundante producción de resina en la base de ramas principales y secundarias, las cuales a menudo estaban muertas. Debido a estos síntomas la enfermedad se denominó chancro resinoso del pino (*Pitch Pine Canker*, PPC). Los autores llegaron a la conclusión de que la enfermedad observada estaba producida por un patógeno fúngico aun no descrito, pero perteneciente el género *Fusarium* debido a la presencia de macroconidias, característica típica del género.

En una publicación tres años posterior, el patógeno fue nombrado como *Fusarium lateritium* f. sp. *pini* Hepting (Snyder *et al.*, 1949). En 1978 su nombre cambió a *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* (Kuhlman *et al.*, 1978) en base a la morfología de las células conidiógenas o fiálidas del patógeno, que pueden ser tanto monofiálidas como polifiálidas. El patógeno pasó a la categoría de especie en 1983, denominándose *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson (Nelson *et al.*, 1983) y su forma sexual *Gibberella fujikuroi*. Esta especie comprendía un gran grupo de hongos, de distribución ubicua y patógenos de especies como el arroz, maíz, caña de azúcar, sorgo, los pinos y la piña tropical. En 1991, se propuso la *forma specialis pini* para diferenciar al patógeno responsable del PPC, dentro del gran grupo taxonómico que era *F. subglutinans* (Correll *et al.*, 1991). Esto se corroboró un año más tarde gracias a los resultados obtenidos por RFLPs (Restriction Fragment Length Polimorphisms) realizado con el ADN mitocondrial de aislados procedentes de pinos afectados por PPC (Correll, 1992).

Finalmente, Nirenberg y O'Donnell en 1998 nombraron al agente causal del PPC como *Fusarium circinatum*, anamorfo de *Gibberella circinata*, aunque la forma sexual nunca ha sido observada en la naturaleza (Nirenberg & O'Donnell, 1998). Esto se hizo en base a caracteres morfológicos, como la presencia de circinos (hifas enrolladas estériles que dan nombre a la especie), o el tamaño y forma de las micro y macroconidias. Las macroconidias están divididas por tres o cuatro septos y están curvadas apicalmente. En cambio, las microconidias son ovaladas, no presentan tabiques y se encuentran normalmente en el micelio aéreo en conidióforos ramificados.

Actualmente, la identificación de *F. circinatum* está basada en los caracteres morfológicos del hongo y la posterior confirmación mediante técnicas moleculares de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con los cebadores específicos diseñados para la especie (Schweigkofler *et al.*, 2004). Estos cebadores amplifican la región ITS (secuencia espaciadora repetida del ribosoma), produciendo un amplicón de 360 pb.

Taxonómicamente, *G. circinata*, teleomorfo de *F. circinatum*, es una especie perteneciente al complejo de *Gibberella fujikuroi* (GFC), que se engloba concretamente en el clado americano (Kvas *et al.*, 2009). Este complejo es un taxón monofilético constituido por al menos 50 especies distintas o linajes filogenéticos, estando la mayoría de ellas relacionadas con enfermedades importantes del mundo vegetal, las cuales reportan numerosas pérdidas económicas anuales. Las especies de GFC se pueden separar en tres grandes clados, basados en la filogenia de numerosos genes (O'Donnell *et al.*, 1998, 2000), los cuales se denominan “Africano”, “Americano” y “Asiático”. El clado americano posee 18 linajes filogenéticos, y el carácter morfológico más importante para su definición es la producción de microconidias ovoides en falsas cabezas de mono y polifiálidas (Nelson *et al.*, 1993). Además, de él también forman parte otras especies asociadas con *Pinus* sp., algunas de ellas patógenas para el género (Herron *et al.*, 2015). El origen de estos clados es fruto principalmente de la coevolución de las especies de *Fusarium* con sus huéspedes específicos, distribuidos geográficamente a lo largo de la historia.

El origen de *F. circinatum* parece situarse en México (Kvas *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 1998; Wikler & Gordon, 2000). Esto está apoyado porque las poblaciones de estas regiones poseen la mayor diversidad genética en comparación con cualquier otra población examinada, existiendo numerosos haplotipos únicos (Wikler & Gordon, 2000). Además, la zona de México posee una enorme diversidad dentro del género *Pinus* y hay otras especies de *Fusarium* también patógenas dentro del GFC.

En esta zona parece que *F. circinatum* causa daños leves en los bosques nativos, lo que sugiere una coevolución hongo-patógeno (Storer et al., 1994), apoyando el origen de diversidad en México.

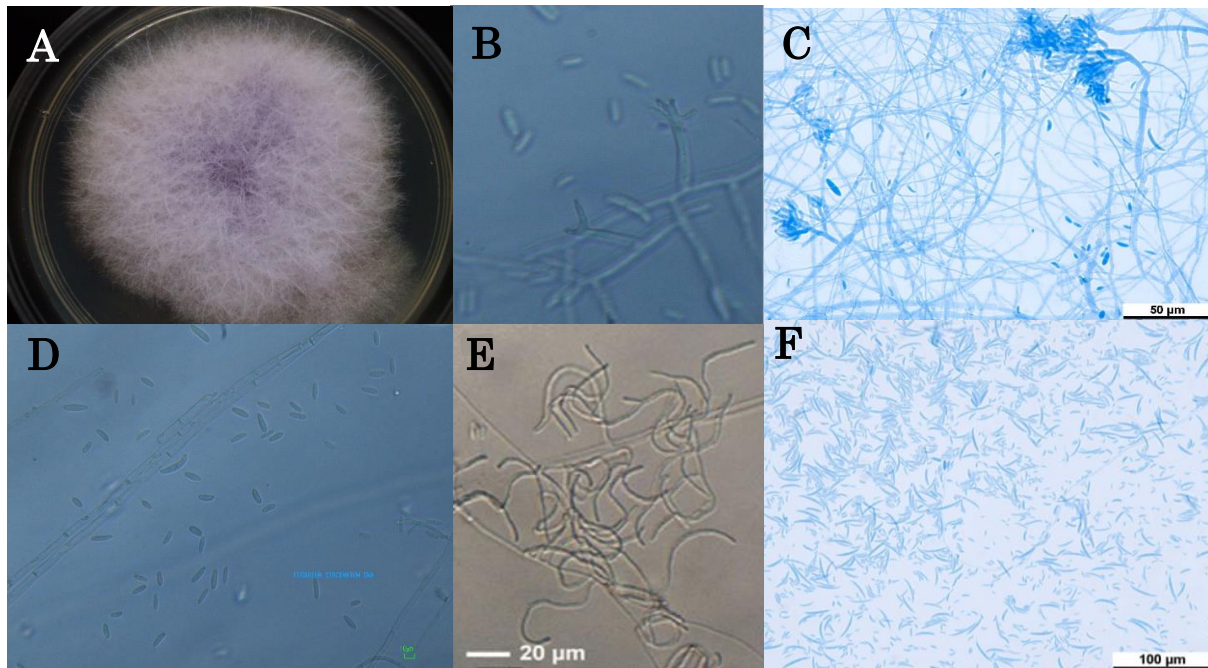
### 1.1.2. Biología del patógeno

El hongo crece relativamente rápido en PDA (*potato dextrose agar*) con un crecimiento promedio de 4,7mm por día a una temperatura de 20°C (Nirenberg & O'Donnell, 1998). A los 10 días, la colonia presenta un margen entero o, en ocasiones, ondulado o lobulado, micelio aéreo blanco o con tonalidades salmón, de aspecto algodonoso que puede presentar tonalidades violáceas en la zona en contacto con el agar (Mullett et al., 2017) (**Figura 1**). Las microconidias se agrupan en falsas cabezas con conidióforos mono y polifilídios ramificados en el micelio aéreo. Estas tienen una morfología obovoide y generalmente no están septadas, aunque en ocasiones pueden presentar un tabique; el tamaño va desde 8,5-10,9 x 2,8-3,6  $\mu\text{m}$  (**Figura 1**). Las macroconidias son menos abundantes y tienen un tamaño de 33,7-42,7 x 3,4-3,7  $\mu\text{m}$ , están septadas por 3 o 4 tabiques y curvadas apicalmente. Las clamidosporas están ausentes y la característica morfológica más relevante son los circinos, hifas estériles enrolladas, las cuales dan nombre a la especie, y se observan claramente cuando el hongo crece en SNA (*Spezieller Nährstoffarmer agar*), aunque éstas, en ocasiones, pueden no estar presentes (**Figura 1**).

El patógeno es un hongo hemibiotrófico. Se ha encontrado que puede colonizar la raíz de plántulas de *P. radiata* de manera biotrófica durante 52 semanas, sin que la planta presente ningún síntoma, antes de desarrollar la enfermedad (Swett et al., 2016).

*F. circinatum* es un hongo heterotálico cuyo grupo de apareamiento está determinado en un solo locus, con dos posibles idiomorfos: MAT-1 y MAT-2 (Kerényi et al., 1999). Las conidias, las cuales suponen su principal mecanismo de dispersión, se originan mediante reproducción asexual, de hecho, su estado sexual (*G. circinata*) nunca se ha observado en la naturaleza, aunque sí se ha logrado producir en condiciones controladas de laboratorio (Britz et al., 2002). Se han realizado estudios analizando la importancia relativa de la reproducción sexual y asexual en poblaciones naturales de *F. circinatum*, concluyendo que la reproducción asexual es la dominante y principal en la naturaleza (Berbegal et al., 2013; Fru et al., 2023; Iturritxa, Ganley, et al., 2011; Wikler & Gordon, 2000). Estos

resultados están basados en la determinación del número de VCGs, la frecuencia relativa de los dos grupos de apareamiento y la diversidad de haplotipos determinada mediante marcadores microsatélites (Berbegal et al., 2013; Britz et al., 2005).

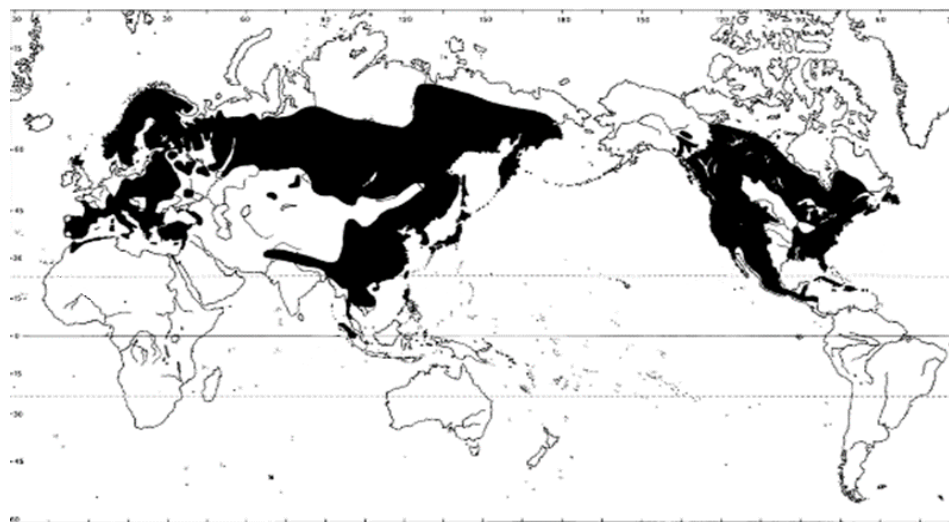


**Figura 1** A. Crecimiento de *F. circinatum* en PDA. B. Conidióforos con microconidias. C. Conidioforos polifilídios D. Microconidias E. Circinos de *F. circinatum* en SNA. F. Macro y microconidias.

## 1.2. El género *Pinus*

En el hemisferio norte los bosques de coníferas tienen un papel fundamental tanto ecológico como económico. Las coníferas, aunque con un número pequeño de especies, suponen el mayor sumidero de carbono de este hemisferio, al tiempo que proveen de materia prima para pasta de papel y madera. El género *Pinus* destaca dentro de las coníferas, en parte debido a su gran capacidad de adaptación a entornos muy variables, pudiendo encontrarse en casi todos los hábitats terrestres del hemisferio norte, así como, de manera introducida, en el hemisferio sur (**Figura 2**) (Farjon, 2021). El género *Pinus* pertenece al grupo de las Gimnospermas, concretamente orden Coniferales y la familia Pinaceae, con alrededor de 110 especies dentro del género (Farjon, 2021). El género incluye plantas leñosas, normalmente árboles, aunque también hay especies arbustivas.

En España *P. halepensis* Mill. es la especie más común, estando también presente *P. sylvestris* L., *P. pinaster* Ait., *P. nigra* J.F.Arnold, *P. pinea* L, *P. uncinata* Mill. y *P. canariensis* C.Sm. ex DC. (*Anuario de Estadística Forestal 2020*). Además, se ha introducido *P. radiata* D. Don. por su calidad maderera, existiendo numerosas plantaciones en la zona norte del país donde se intercala con *P. pinaster* (Serrada et al., 2008). *P. pinaster* es una especie que tiene una gran importancia en la cuenca mediterránea, ocupando 1.063.112 ha de superficie arbolada en España (*Anuario de Estadística Forestal 2020*). La importancia de esta especie en la zona es tanto ecológica como económica. Ecológica porque es utilizada ampliamente en proyectos de repoblaciones forestales. Así, en 2020, la cuarta parte de la superficie repoblada en el país fue con esta conífera (*Anuario de Estadística Forestal 2020*). Desde el punto de vista económico, *P. pinaster* se utiliza para producción de madera, pasta de papel y resina, siendo el árbol resinero tradicional del país (Calama et al., 2023; Vieito et al., 2019). *P. radiata* es la especie del género *Pinus* más utilizada en la industria maderera en todo el mundo, con importantes plantaciones en Chile, Argentina, Uruguay, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda (Manso et al., 2004). En España ocupa un área de 200.000 ha, distribuida fundamentalmente en la cornisa cantábrica (Blank et al., 2019) y, fundamentalmente, en el País Vasco.



**Figura 2** Distribución del género *Pinus* a escala global (tomado de Farjon, 2021).

### 1.3. El chancro resinoso del pino

*F. circinatum* es el agente causal de la enfermedad del chancro resinoso del pino (PPC), una de las enfermedades de coníferas más importantes a nivel mundial (Drenkhan et al., 2020; Martín-García et al., 2019; Wingfield et al., 2008). El

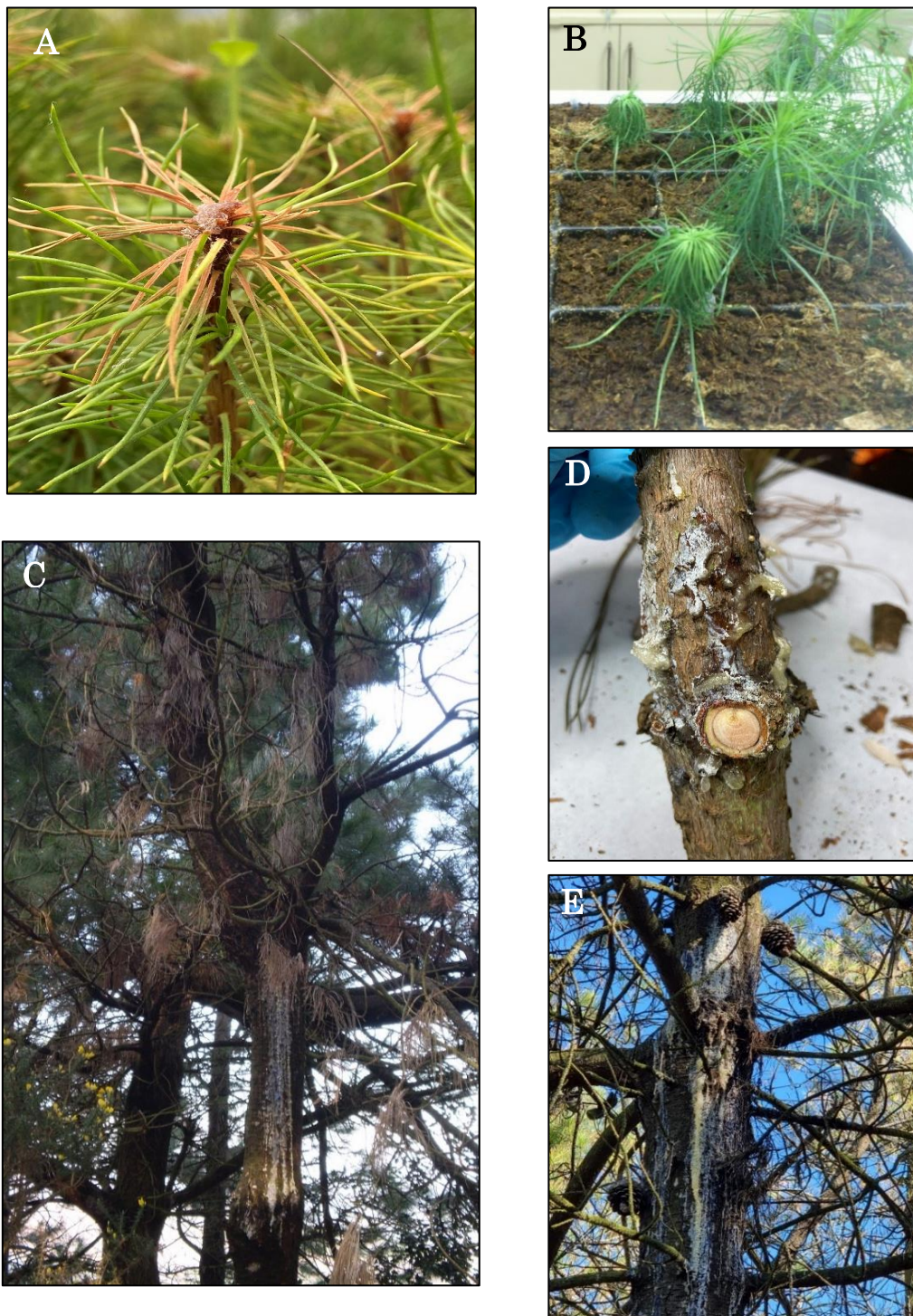
síntoma más característico en árboles adultos es la aparición de chancros en las ramas principales y secundarias, así como en el tronco principal (**Figura 3**). Estos chancros están acompañados de una abundante producción de resina (Hepting & Roth, 1946) y de un marchitamiento de las acículas por encima del punto de infección. Finalmente se produce la muerte de la rama afectada y un debilitamiento general del árbol que puede provocar su muerte, (Broaddus, 1985; Gordon et al., 2015; Snyder et al., 1949; Wingfield et al., 2008) especialmente cuando se producen múltiples infecciones en el mismo árbol.

*F. circinatum* no solo infecta las partes vegetativas aéreas del árbol. Recientemente se ha descrito la presencia del patógeno en raíces de árboles asintomáticos de *P. radiata* (Elvira-Recuenco et al., 2020). Aunque no se conoce su papel en el ciclo de la enfermedad, lo cierto es que puede suponer un importante reservorio del patógeno en el suelo. También puede infectar las estructuras reproductivas causando la mortalidad de las flores femeninas y los conos y produciendo daños en semillas (Broaddus, 1990). Los conos infectados son más pequeños e incluso pueden no llegar a la maduración (Correll et al., 1991). El hongo también puede infectar la semilla causando su deterioro y reduciendo su emergencia (Wingfield et al., 2008).

A partir de semillas infectadas, el hongo puede provocar daños en pre- y post-emergencia provocando *damping-off* (Viljoen & Wingfield, 1994). Las plántulas afectadas muestran un marchitamiento y daños en el cuello de la raíz, que provocan su muerte y ocasiona numerosas pérdidas en los viveros. Las plántulas también pueden infectarse asintomáticamente (Elvira-Recuenco et al., 2020; Martín-Rodríguez et al., 2015), lo que puede derivar en el establecimiento de la enfermedad en nuevas plantaciones y en la dispersión del patógeno a larga distancia.

Actualmente se sabe que son susceptibles a la enfermedad al menos 60 especies del género *Pinus*, así como *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Bezoes et al., 2017; Drenkhan et al., 2020; Martín-García et al., 2019). La mayoría de los pinos utilizados comercialmente son susceptibles al patógeno, lo que ocasiona numerosas pérdidas económicas en todo el mundo (Wingfield et al., 2008). La susceptibilidad de los huéspedes al patógeno ha sido estudiada en numerosos trabajos (Dwinell, 1978; Enebak & Stanosz, 2003; Gordon et al., 1998; Iturrutxa et al., 2012, 2013; Martínez-Álvarez et al., 2014) y varía ampliamente en función de la especie. Se considera que las especies más susceptibles son *P. radiata* y *P. patula* Schiede ex Schltdl. y Cham. (Wingfield et al., 2008) y las menos susceptibles son *P. thunbergii*

Parl., *P. canariensis* y *P. pinea*. *P. pinaster* se encuentra en un rango intermedio, siendo moderadamente resistente (Gordon et al., 1998; Iturritxa et al., 2012, 2013).



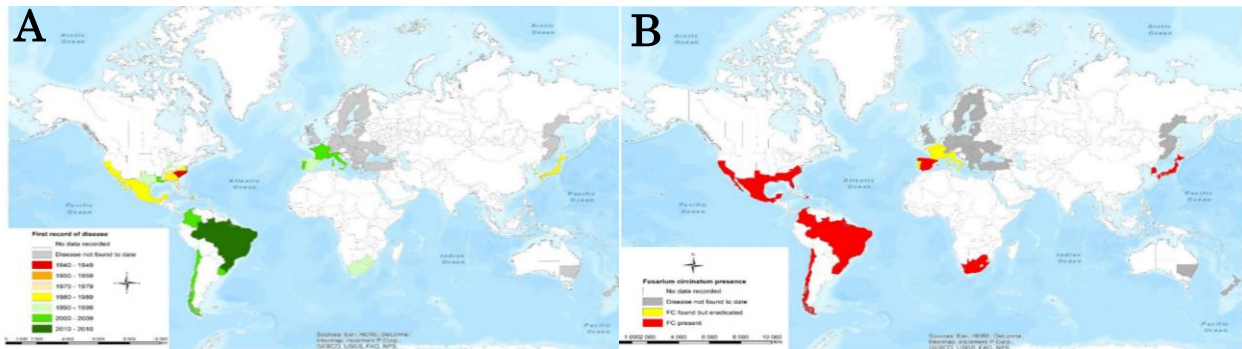
**Figura 3.** Principales síntomas del PPC. A. Daño en plántula inoculada artificialmente. B. Daño en plántulas infectadas en vivero. C. Chancro con abundante producción de resina y daños ocasionados en ramas secundarias. D. Chancro en rama secundaria de *P. pinaster*. E. Chancro en el tronco principal con abundante producción de resina

### 1.3.1. Origen y distribución actual

El primer informe de la enfermedad fue en 1946 en el Sureste de Estados Unidos (Hepting & Roth, 1946), concretamente en el estado de Carolina del Sur, donde al causar daños limitados no se consideró una enfermedad económicamente importante (Hansen et al., 1997). Fue en 1974 cuando la enfermedad emergió causando serios estragos en *P. taeda* L. en Carolina del Norte y en *P. elliotii* Engelm. en Florida y a partir de entonces, se fue extendiendo, afectando a la mayoría de las especies de pino del sur de EE.UU. En 1986 se detectó en las plantaciones de California (Wingfield et al., 2008) y en 1992 apareció en las poblaciones nativas de *P. radiata* de la península de Monterey (California). Desde 1976 la distribución de la enfermedad ha pasado, de estar localmente restringida en el sur de EE.UU., a considerarse una enfermedad muy importante a escala internacional.

La enfermedad se ha reportado en Haití (Hepting & Roth, 1953), donde afectaba de manera extensa a *P. occidentalis* Sw. En México se reportó por primera vez en 1989, en plantaciones de *P. halepensis* así como afectando a bosques de *P. douglasiana* Martínez y *P. leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. (Guerra-Santos, 1999; Santos & Tovar, 1991). En 2001 se encontró en Chile, afectando a *P. radiata* (Wingfield et al., 2002), también se ha encontrado en Uruguay (Alonso & Bettucci, 2009), Colombia (Rodas Pelaez, 2013; Steenkamp et al., 2012) y Brasil (Pfenning et al., 2014). En Chile, Uruguay y Brasil solo se ha descrito en vivero, mientras que en Colombia se ha encontrado tanto en vivero como en plantaciones forestales (**Figura 4**).

Fuera del continente americano, apareció en 1981 en Japón, concretamente en las islas de Okinawa y Amamiyoshima (Kobayashi & Muramoto, 1989) afectando a *P. luchuensis* Mayr, donde los árboles presentaban marchitamiento y muerte de ramas principales y secundarias, con chancros en la base de estas y abundante producción de resina en el chancro, síntomas característicos del PPC. También se encontró en Corea del Sur, en 1995, afectando a *P. rigida* Mill. (Lee et al., 2000). Por último, se detectó en Sudáfrica en 1991 (Viljoen & Wingfield, 1994) (**Figura 4**). En este país el primer informe se dio a partir de plántulas en vivero. Sin embargo, poco a poco se fue extendiendo a plantaciones de pinos, estableciéndose finalmente en el país (Coutinho et al., 2007) y aumentando su mortalidad en árboles adultos. Se cree que llegó a Sudáfrica a través del transporte de semillas contaminadas desde México (Britz et al., 2001).



**Figura 4.** Mapa de la distribución de *F. circinatum*. A: Países y fechas de la primera detección. B: Distribución global de *F. circinatum*, incluyendo aquellos países en los que ha sido erradicado. Tomado de Drenkhan et al., 2020.

En Europa, *F. circinatum* fue oficialmente descrito en 2005, concretamente en el norte de España (Landeras et al., 2005), aunque ya existían informes puntuales de su presencia en el País Vasco desde 1997 (Dwinell, 1998). Posteriormente se notificó en Francia (EPPO, 2006), Italia (Carlucci et al., 2007) y Portugal (Bragança et al., 2009), aunque actualmente se ha erradicado de todo el territorio europeo menos de la Península ibérica (Drenkhan et al., 2020) (**Figura 4**). En España, *F. circinatum* se ubica principalmente a lo largo de la cornisa cantábrica. Se ha detectado en las comunidades autónomas de Galicia, Asturias, Cantabria, Navarra, Castilla y León y País Vasco, en donde se encuentran la mayoría de plantaciones de *P. radiata*, especie muy susceptible (Iturrutxa et al., 2012, 2013). También afecta a bosques y plantaciones de *P. pinaster*. Así mismo, resulta una seria amenaza para los viveros de la zona, provocando numerosas pérdidas (Pérez-Sierra et al., 2007).

### 1.3.2. Infección y colonización de la planta

La infección de los árboles, en áreas donde el patógeno ya está establecido, se produce a través de heridas existentes, que dejan el tejido del huésped expuesto, o mediante heridas producidas por insectos, que actúan como vectores (Gordon et al., 1998; Wingfield et al., 2008). La frecuencia de infección aumenta con heridas recientes, profundas y cuando hay agua presente (Inman et al., 2008; Sakamoto & Gordon, 2006). Además, se ha demostrado que *F. circinatum* es capaz de colonizar de manera endófitas las plantas herbáceas presentes en una parcela infectada, actuando como fuente de inóculo y reservorio del patógeno (Hernández-Escribano,

Iturritxa, Elvira-Recuenco, et al., 2018). También es capaz de colonizar de manera asintomática las raíces de *P. radiata* y *P. pinaster* durante un tiempo indeterminado (Hernandez-Escribano, Iturritxa, Aragonés, et al., 2018).

Se ha estudiado la dinámica temporal y espacial de la colonización de *F. circinatum* mediante microscopía confocal en plántulas de *P. radiata* infectadas artificialmente (Martín-Rodrigues et al., 2013). La invasión progresa a través del córtex desde la zona de inoculación hasta llegar a la médula moviéndose por los espacios intercelulares. Según aumenta la presencia de hifas, el floema colapsa y se produce ruptura del tejido de la zona cambial. El hongo invade los radios medulares y los canales resiníferos del xilema. También penetra las traqueidas del xilema. Cuando el hongo ha invadido extensamente el xilema, el tejido parenquimatoso se desintegra dando lugar a amplios huecos donde se forman conidióforos y tiene lugar la esporulación.

Los cambios anatómicos más importantes en el huésped durante la invasión están relacionados con los canales resiníferos del xilema y estos incluyen la hipertrofia de las células epiteliales y la formación de tilosas (Barrows-Broaddus & Dwinell, 1983; Martín-Rodrigues et al., 2013). Las hifas del patógeno se encuentran cercanas a las células epiteliales y dentro de los canales resiníferos del xilema (tanto inducidos como traumáticos). Por el contrario, el patógeno no muestra afinidad por los canales resiníferos del córtex, donde no se observan hifas en el lumen o en el interior de las células epiteliales. *F. circinatum* utiliza los canales resiníferos del xilema para la propagación vertical dentro de la planta (Martín-Rodrigues et al., 2013).

### 1.3.3. Dispersión del patógeno

*F. circinatum* se dispersa fundamentalmente por esporas que son transportadas por varios agentes (Figura 5), principalmente el viento y los insectos vectores. (Wingfield et al., 2008). El movimiento de esporas por el aire puede ocurrir a lo largo de todo el año y se ve favorecido por periodos previos de temperaturas bajas y una baja humedad en las hojas (Dvořák et al., 2017). Las esporas del hongo son capaces de sobrevivir en el suelo manteniendo la viabilidad durante 6 meses en suelo húmedo y 12 meses en suelo seco (Serrano et al., 2017). Además, el micelio puede sobrevivir en los restos de madera muerta, siendo capaz de esporular en esta (Gordon et al., 2001). De esta manera la madera puede constituir un reservorio del

patógeno que posibilita la dispersión del hongo cuando existan las condiciones para la esporulación.

El patógeno puede también colonizar de manera endófito algunas plantas mono y dicotiledóneas del tapiz vegetal de plantaciones infectadas (Hernandez-Escribano, Iturritxa, Elvira-Recueno, et al., 2018; Swett et al., 2014). Se desconoce la importancia relativa como fuente de inóculo y su papel actuando como reservorio.

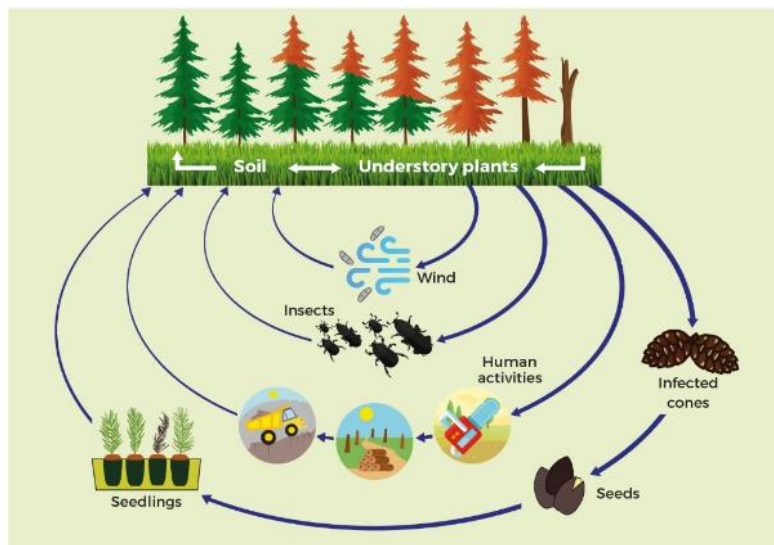
Los insectos pueden tener un papel importante como vectores del patógeno (Gordon et al., 2001; Wingfield et al., 2008). Estos pueden actuar ocasionando heridas en los árboles, lo que da lugar a puntos de entrada a partir de los cuales el patógeno puede colonizar al huésped. O bien pueden actuar como vectores *per se*, transportando el inóculo entre árboles (G. Blakeslee et al., 1978).

Tanto las condiciones ambientales como la presencia y presión de insectos capaces de actuar como vectores de la enfermedad juegan un papel fundamental a la hora de establecer la vía de dispersión preferente en una región. Por ejemplo, en el sudeste de Estados Unidos se ha considerado que la vía natural de dispersión es la infección de heridas (provocadas por daños mecánicos ocasionados por actividades humanas o por fenómenos climatológicos adversos) por esporas transportadas por el viento (Dwinell, 1985; Dwinell & Phelps, 1977). Por otro lado, en el área de California, la dispersión del hongo está fuertemente correlacionada con los insectos, siendo baja la frecuencia de infección a través de heridas en la planta por inóculo transportado por aire y agua (Sakamoto & Gordon, 2006).

Existen numerosas especies de insectos que son capaces de transportar el inóculo del patógeno dispersándolo entre huéspedes. En plantaciones de *P. radiata* se han descrito algunas especies del género *Ips* (Coleoptera: Scolytinae) (Fox et al., 1991), *Pityophthorus* (Coleoptera: Scolytinae) (Sakamoto et al., 2007) y *Ernobius* (Coleoptera: Anobiidae) (Hoover et al., 1995) como potenciales vectores. En España se ha encontrado el patógeno asociado a 7 especies de insectos, destacando *Pityophthorus pubescens* Marsham, *Brachyderes incanus* L. y *Hylurgops palliatus* Gyllenhal (Romón et al., 2007). El patógeno se encontró respectivamente en el 25%, 14,28% y 11,96% de los individuos capturados. La presencia del hongo por encima de un 10% en estas especies muestran que están asociados con el PPC y que pueden actuar como vectores.

Por último, es muy importante la dispersión del patógeno como consecuencia de las actividades humanas. El movimiento de material vegetal, incrementado en gran medida por la globalización, desempeña hoy en día un papel clave en la

redistribución de patógenos, huéspedes y vectores. El comercio con material vegetal y plántulas infectadas, así como con semillas, ha sido una vía importante de introducción de *F. circinatum* en países como España, Sudáfrica y Chile (Berbegal et al., 2013; Carey et al., 2005; Coutinho et al., 2007; Fru et al., 2023) y constituye una fuente importante de inóculo desde los viveros a las plantaciones. El micelio puede sobrevivir en madera muerta, por lo que el uso industrial de madera no tratada procedente de individuos infectados también supone una vía de dispersión (Serrano et al., 2017), siendo el patógeno capaz de sobrevivir 18 meses en ésta (Gordon et al., 2000).

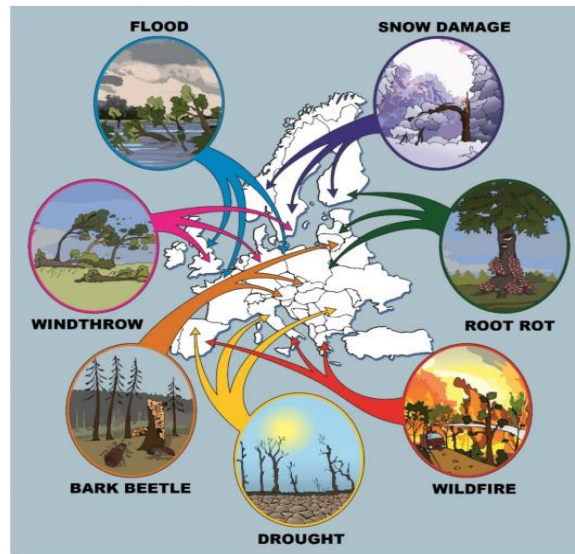


**Figura 5.** Vías de propagación de la enfermedad del Chancro Resinoso de Pino (tomado de Zamora-Ballesteros et al., 2019).

#### 1.3.4. Condiciones ambientales y cambio climático

Una de las consecuencias más importantes del cambio climático es el incremento de las perturbaciones, que son más frecuentes y severas (Vacek et al., 2023). Incendios, sequías, inundaciones, deslizamientos de tierra, emergencia de plagas de insectos y de enfermedades afectan a la estructura, composición y funciones ecosistémicas de los bosques y favorece la propagación de especies no nativas (incluido diversos patógenos) (Dale et al., 2001). En Europa se está viendo un rápido aumento de la temperatura del aire y un cambio en los patrones estacionales y distribución de precipitaciones, disminuyendo estas en la parte sur del continente y aumentando en el norte de Europa central, lo que causa un aumento de los periodos de sequía e inundaciones, respectivamente (Christidis & Stott, 2022) (**Figura 6**). Todos estos cambios se relacionan con una alteración en la fisiología de

los árboles, que los hace más susceptibles frente a plagas de insectos y enfermedades ocasionadas por hongos (Ayres & Lombardero, 2000). Además, se espera un desplazamiento este-oeste de patógenos y plagas, aumentando el riesgo de introducción de nuevos organismos invasores y cambiando el comportamiento y distribución de los existentes, ya que debido al aumento generalizado de las temperaturas, se espera una migración hacia latitudes que actualmente son más frías de las plagas y enfermedades (Vacek et al., 2023; Vanhanen et al., 2007).



**Figura 6.** Esquema de los principales factores bióticos y abióticos negativos en relación al cambio climático que afectan a los ecosistemas forestales europeos (tomado de Vacek et al., 2023).

Como en la mayoría de los patógenos, los factores claves para la distribución, diseminación y desarrollo de la enfermedad PPC son la humedad ambiental y la temperatura (Martín-García et al., 2019). Así, se considera que la elevada humedad relativa de las áreas costeras de California, ocasionada por las frecuentes nieblas (Blank et al., 2019; Garbelotto et al., 2008), es la causa de la alta incidencia y severidad registrada en la zona comparada con el interior. Las temperaturas que favorecen el desarrollo de síntomas están en el rango de 14-26°C, no desarrollando lesión por debajo de temperaturas de 10°C. Además, existen otros factores que pueden afectar directamente a la susceptibilidad del huésped frente al patógeno, incrementándola. Por ejemplo, un alto nivel de nutrientes en el suelo y hojas, periodos de sequía, suelos anegados y poco profundos, especialmente en plantaciones con una alta densidad (Wingfield et al., 2008). Por último, los fenómenos meteorológicos extremos, cuyo incremento y severidad se correlaciona positivamente con el cambio climático, se relacionan con un aumento de la

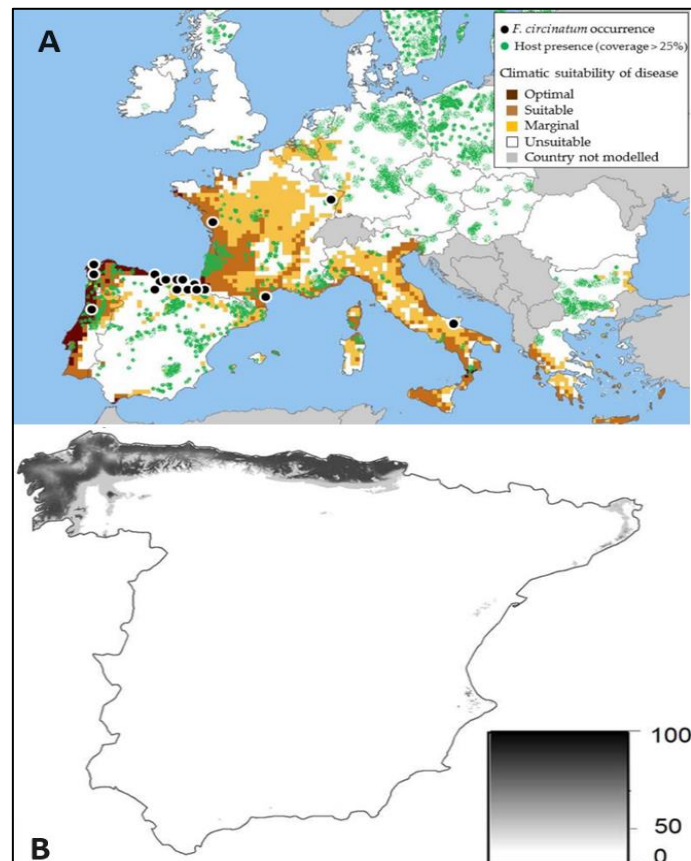
vulnerabilidad de los sistemas forestales europeos y con una disminución de la capacidad defensiva de los huéspedes, aumentando así la incidencia de PPC en zonas donde esté presente y favoreciendo la dispersión del patógeno a zonas nuevas (Watt et al., 2011).

También los factores ambientales influyen en el establecimiento de la enfermedad. La infección de las plantas a partir de esporas requiere de la existencia de heridas y tejido expuesto en el huésped (Gordon et al., 1998). En general, el origen de estas heridas son los fenómenos meteorológicos, tales como granizo o fuerte viento, o la maquinaria que realiza operaciones selvícolas en las plantaciones. Factores como la edad de la madera y tipo de herida están directamente correlacionados con el éxito de la infección. (Dwinell, 1985; Dwinell & Phelps, 1977; Kelley, 1982). La frecuencia de infección aumenta con heridas recientes, profundas y cuando hay agua presente (Elvira-Recuenco et al., 2021; Inman et al., 2008; Sakamoto & Gordon, 2006).

El riesgo potencial de que PPC se establezca en nuevas áreas o países se ha estudiado mediante simulación, aplicando el modelo de nicho CLIMEX™ (Sutherst & Maywald, 1985). Usando una base de datos de clima global (New et al., 1999) se ha predicho el riesgo global de establecimiento potencial de la enfermedad (Ganley et al., 2009), (**Figura 7A**) el cual se corresponde bien con la distribución actual de la enfermedad en países tales como España o suroeste de EEUU. En España, el modelo predice el establecimiento en la cornisa cantábrica, donde ya existe, pero también en la costa este y sur (Ganley et al., 2009). El estudio de las predicciones de este modelo ha permitido determinar que las variables climáticas más importantes que marcan los límites en la distribución del patógeno son las temperaturas de invierno y las precipitaciones (invierno y verano) durante los períodos de supervivencia del patógeno junto con el hospedante (Ganley et al., 2009; Watt et al., 2011).

Varios escenarios posibles de cambio climático predicen el aumento de la frecuencia y severidad de fenómenos climatológicos tormentosos, así como un incremento de la temperatura, lo que favorecerá las condiciones para que se establezca PPC mundialmente (Watt et al., 2011), aunque dependerá de la existencia de especies hospedadoras y de vectores adecuados. La distribución actual en Europa de acuerdo con CLIMEX se ampliará hacia el norte del continente coincidiendo con el aumento de las temperaturas, llegando a países como Dinamarca (Watt et al., 2011). Sin embargo, el modelo desarrollado por Serra et al., (2017) predice en España una reducción de la superficie adecuada para la

enfermedad, restringiéndose a una franja costera del norte y oeste, probablemente debido a la reducción prevista de la precipitación. Según este modelo, las variables climáticas más relevantes para la distribución de *F. circinatum* son: el rango anual de temperatura, la temperatura mínima durante el mes más frío, la precipitación total anual y durante la estación más seca. A partir de este modelo, se estableció el riesgo de ocurrencia de la enfermedad (**Figura 7 B**).



**Figura 7.A:** distribución geográfica de las especies susceptibles a *F. circinatum* en Europa (Health (PLH), 2010) y condiciones de idoneidad climática para el PPC generadas por el modelo CLIMEX (Ganley et al 2009). **B:** Porcentaje de riesgo en España de ocurrencia del PPC utilizando un modelo de distribución de especies (tomado de Serra-Varela et al., 2017).

#### 1.4. Métodos de control

El control y manejo de la enfermedad PPC es difícil debido a que el patógeno puede infectar las partes vegetativas y reproductivas del huésped a todas las edades (Gordon, 2006; Wingfield et al., 2008). Actualmente, el control de la enfermedad incluye la integración de medidas tales como el establecimiento de zonas cuarentenas para evitar la dispersión del patógeno, el manejo adecuado del

material vegetal en viveros y plantaciones y el uso de especies con un menor grado de susceptibilidad frente a la enfermedad (Wingfield et al., 2008).

En viveros resulta fundamental impedir la entrada del patógeno, utilizando para ello semillas y material vegetal libre de este. En el caso de que el patógeno se haya establecido en un vivero, toman especial relevancia las medidas para asegurar una elevada higiene y evitar nuevas infecciones, tales como el uso de agua de riego libre de patógenos, la correcta esterilización de los contenedores y del sustrato utilizado, así como la eliminación de todo el material vegetal infectado (Wingfield et al., 2008). Existen otra serie de medidas que ayudan a evitar la propagación del patógeno. La primera de ellas es la desinfección de las semillas utilizadas en viveros, ya que estas suponen una fuente importante de transmisión de la enfermedad, además las semillas pueden estar colonizadas por *F. circinatum* en su capa externa y en su interior (Serrano et al., 2017; Wingfield et al., 2008). Para la desinfección de las semillas se pueden utilizar tratamientos químicos (Berbegal et al., 2015), eficaces principalmente en la desinfección superficial, y térmicos (Agustí-Brisach et al., 2012; J. Jones et al., 2002).

En plantaciones es posible evitar o disminuir el daño ocasionado por PPC, tomando una serie de medidas destinadas a reducir el estrés ambiental, lo que influye directamente en la susceptibilidad frente a *F. circinatum* (Wingfield et al., 2008). Estas incluyen evitar densidades de plantación muy elevadas, favorecer el drenaje evitando el anegamiento de las raíces (Blakeslee et al., 1999) y establecer unos niveles adecuados de fertilización (Blakeslee et al., 1999). Existe un amplio rango de susceptibilidad de las especies de pino a *F. circinatum*, por lo que el uso de especies resistentes puede ser un buen método de control, especialmente cuando se adecúa el grado de resistencia de la especie con la intensidad de la enfermedad esperable en función de las condiciones ambientales. También pueden usarse especies resistentes intercalándolas entre plantaciones de especies susceptibles con interés comercial, de manera que especies resistentes actúen como una barrera, reduciendo la velocidad con la que la enfermedad se propaga. Esta medida es por tanto muy prometedora a la hora de controlar PPC aunque su uso no está extendido (Gordon et al., 2015; Martín-García et al., 2019; Wingfield et al., 2008; Zamora-Ballesteros et al., 2019).

Por último, cabe destacar una serie de buenas prácticas destinadas a evitar la dispersión del patógeno y de PPC a causa de la actividad humana. Estas prácticas incluyen aquellas realizadas en vivero como la limpieza de material, vehículos, herramientas, calzado y equipo de los operarios con el fin de evitar la dispersión

del hongo. También resulta fundamental una detección temprana y adecuada del patógeno con el fin de poder aplicar lo antes posible medidas destinadas a evitar su dispersión.

A continuación, se detallan otras medidas potenciales para la gestión y manejo de PPC, como el control biológico, que actualmente se encuentran en fase de investigación y/o experimentación.

#### **1.4.1. Programas de mejora y manejo de la resistencia genética**

La variación de la resistencia genética en los pinos ante *F. circinatum* sigue un mecanismo poligénico (Kayihan et al., 2005; Quesada et al., 2010) y aunque la heredabilidad varía ampliamente dependiendo de la especie esta suele ser lo suficientemente alta como para permitir programas de mejora genética clásicos (Elvira-Recuenco et al., 2014; Kayihan et al., 2005; Nel et al., 2014).

También se puede implementar la selección de material vegetal reproductor de poblaciones resistentes. La comercialización de material reproductor resistente al PPC a través de la selección y mejora de las poblaciones e individuos, o incluso, el uso de semillas de distintas procedencias de poblaciones resistentes, puede ayudar a evitar o reducir los brotes de PPC (Martín-García et al., 2019; Zamora-Ballesteros et al., 2019). Con el mismo fin, también se puede utilizar la hibridación de especies o poblaciones resistentes, como es el caso de *P. patula* y *P. tecunumanii* en Sudáfrica (Kanzler et al., 2014).

#### **1.4.2. Estrategias basadas en el control biológico**

El control biológico consiste en el uso de agentes de control biológico (*biological control agents*, BCAs) para reducir, controlar o impedir el desarrollo de una enfermedad producida por un patógeno (Alabouvette et al., 2006). Los BCAs pueden actuar de diversas maneras. Algunos de ellos, como es el caso de las micorrizas, interactúan directamente con las plantas activando la respuesta sistema inducida (SIR) antes de que se produzca el ataque por parte de un patógeno (Köhl et al., 2019). Otros compiten por el espacio y por los nutrientes con el patógeno, inhibiendo así su crecimiento (Köhl et al., 2019). Nos encontramos también con BCAs que interactúan directamente con el patógeno, mediante procesos, parasitismo o depredación, impidiendo así su crecimiento (Köhl et al., 2019). Además, estos también pueden actuar mediante la producción *in vitro* de metabolitos que interfieran o inhiban en el crecimiento del microorganismo

patógeno. Por último, los microorganismos simbióticos pueden tener efecto protector en las plantas frente a enfermedades (Pal & Gardener, 2006). En el caso de las enfermedades de plantas y, específicamente en la interacción de *F. circinatum*-*Pinus* spp, los BCAs incluyen bacterias, hongos y virus.

**Uso de hongos.** Los hongos pueden proveer de diversos beneficios a la planta, los cuales incluyen mejorar su crecimiento y aumentar la resistencia frente a estreses abióticos y bióticos (Arnold et al., 2003; Backman & Sikora, 2008; Romón et al., 2008). También pueden tener un efecto protector al competir con los patógenos por el espacio y los nutrientes. Además, algunos son capaces de parasitar o depredar a los microorganismos invasores. Para el manejo de PPC, se han probado numerosos hongos (Bezós et al., 2017; Martín-García et al., 2019; Moraga-Suazo et al., 2014) destacando especies del género *Trichoderma*. Este es uno de los BCA mejor estudiados con fines agronómicos y que cuenta con numerosos productos en el mercado (Martín-García et al., 2019), aprovechando sus capacidades para parasitar otros hongos (Weindling, 1933), producir sustancias antibióticas (Guo et al., 2022) y su habilidad para competir por el espacio y los nutrientes (Pylak et al., 2019). Se ha demostrado mediante varios ensayos *in vitro* la eficacia de *Trichoderma* como BCA frente a *F. circinatum* (Iturritxa, Desprez-Loustau, et al., 2011; Martínez-Álvarez et al., 2016; Moraga-Suazo et al., 2011), aunque los ensayos *in vivo* no son del todo concluyentes.

La comunidad microbiana del suelo también puede desempeñar un papel importante a la hora de luchar frente a *F. circinatum*, destacando aquí las micorrizas. Aún no hay estudios relacionados con la capacidad protectora de las micorrizas frente a PPC, sin embargo estas resultan clave en la lucha frente a otras enfermedades (Azcón-Aguilar et al., 2002; Dyshko et al., 2024; Strobel & Sinclair, 1992; Varma et al., 2018), incluso frente a algunas producidas por otras especies de *Fusarium* (Chakravarty & Unestam, 1987a; Poveda et al., 2024) y frente a numerosos tipos de estreses abióticos en pinos (Chakravarty & Unestam, 1987b; Strobel & Sinclair, 1992; Van Tichelen et al., 2001; Y. Wang et al., 2024). El papel protector de las micorrizas en otras especies vegetales es bien conocido, por lo que se necesitaría avanzar en el conocimiento actual para explorar su posible papel como BCAs en el caso de PPC, principalmente en viveros (Zamora-Ballesteros et al., 2019).

**Uso de bacterias.** Aunque el uso de bacterias como BCAs en la agricultura está muy extendido, aplicándose como agentes externos y como promotores del crecimiento (PGPB), su uso en los ecosistemas forestales no está tan estudiado. Se

ha demostrado que bacterias tales como *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia billingiae* y *Bacillus simplex* han reducido el crecimiento *in vitro* de *F. circinatum* y las lesiones provocadas en plántulas de *P. radiata* (Iturritxa et al., 2017). *Bacillus subtilis* y *Burkholderia sp* han inhibido el crecimiento *in vitro* del patógeno (Soria et al., 2012) así como algunas cepas de *Micromonospora* (Martínez-Hidalgo et al., 2015).

**Uso de micovirus.** Los micovirus son parásitos intracelulares de hongos y están muy extendidos, afectando a los principales grupos taxonómicos de hongos patógenos y Oomycetes (Pearson et al., 2009).

La capacidad de un micovirus como BCA se demostró en *Cryphonectria parasítica*, causante de la enfermedad del chancro del castaño. Aquí se vio que la enfermedad se reducía de forma espontánea y se demostró que era debido a un hipovirus que reduce la patogenicidad del patógeno (Rigling & Prospero, 2018). El uso de micovirus supone una medida prometedora para el control de las enfermedades. Para desarrollar una estrategia de control biológico eficaz basada en micovirus se deben de seguir los siguientes pasos (Martín-García et al., 2019).

- Identificar un virus con potencial para reducir los daños del patógeno frente al que se lucha
- Comprobar la capacidad del virus para infectar a la gran mayoría de cepas del patógeno
- Desarrollar un método eficaz y rentable para difundir el micovirus como BCA
- Comprobar que el micovirus puede mantenerse en la población del patógeno y seguir desempeñando su efecto como BCA

El uso de micovirus como BCAs resulta más interesante cuando se pueden utilizar virus de la propia población del patógeno. En el caso de *F. circinatum* se conoce la existencia de varios micovirus (Martínez-Álvarez, Vainio, et al., 2014; Vainio et al., 2015) aunque el papel sobre la modulación de la virulencia del patógeno aún no se conoce en profundidad.

### 1.4.3. Otras medidas

Otra medida importante es el uso de fitoquímicos para el control y mitigación de PPC (Martín-García et al., 2019). Por ejemplo, existen numerosos estudios sobre el

(Alvarez-Castellanos et al., 2001; Andrews et al., 1980; Celedon & Bohlmann, 2019; Keeling & efecto de diversos terpenos en el control de hongos patógenos Bohlmann, 2006; Marei et al., 2012; Slinski et al., 2015). Los terpenos son los constituyentes mayoritarios de los aceites esenciales extraídos de plantas, de los cuales se ha estudiado el efecto de algunos en el crecimiento de *F. circinatum* (Iturritxa, Desprez-Loustau, et al., 2011; Y.-S. Lee et al., 2009).

### **Medidas legislativas en Europa**

En Europa, el patógeno se ha incluido en la lista EPPO A2 de plagas y patógenos que se establecen como organismos de cuarentena ([https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/A2\\_list](https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list) Consultado: 27/06/2024) de la *European Plant Protection Organisation* (EPPO). Las listas de alertas de la EPPO son una compilación de insectos, ácaros, bacterias, nemátodos, virus, hongos y plantas invasoras que representan un riesgo fitosanitario dentro de la unión europea. Concretamente la lista A2 se refiere a aquellos organismos perjudiciales que están presentes en cualquier país del espacio económico europeo y desde la Unión Europea (UE) se legisla con el fin de evitar su dispersión a áreas geográficas donde aún no está presente y lograr su erradicación de las zonas donde ya se ha establecido. Concretamente, *F. circinatum* está regulado mediante la decisión de ejecución (EU) 2019/2023 de la comisión europea, por la que se establecen medidas para evitar la introducción y propagación del hongo en la UE . Estas medidas incluyen la demarcación del hongo como patógeno de cuarentena, la obligatoriedad de informar en caso de observar al organismo y de la realización de inspecciones periódicas con el fin de detectar su presencia, el establecimiento de zonas demarcadas en el caso de confirmarse su establecimiento, y las medidas de erradicación de este, las cuales incluyen la retirada de los individuos infectados, o que se sospeche que están infectados y la tala de los posibles huéspedes en un área de 100 metros de los individuos infectados, incluyendo la extracción y eliminación de las raíces, al menos de los primeros 50 cm del cuello y de la corteza. Además, el país afectado deberá identificar el origen de la infección e informar al resto de estados miembros.

También se regula la circulación de material vegetal de las especies susceptibles dentro de la EU, así como la regulación en materia de importación y exportación. El plan nacional español de erradicación y control del hongo está recogido en el Real Decreto 637/2006 de 26 de mayo, modificado por Real Decreto 65/2010, de 29 de enero. Es fundamental mantener la legislación destinada al control del patógeno actualizada en función del conocimiento actual.

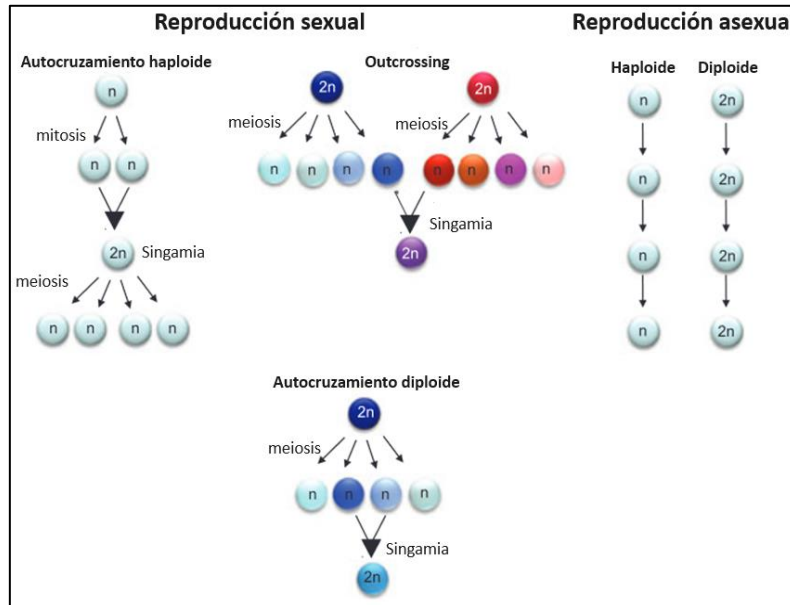
## 1.5. Mecanismos de variación genética en hongos

Comprender los factores que conforman el modelo reproductivo de un organismo es fundamental, ya que estos afectan de manera directa a los procesos evolutivos y ecológicos (Billiard et al., 2012) y determinan la estructura genética de una población. Los organismos eucariotas pueden optar por tener únicamente reproducción sexual, optar por una estrategia mixta alternando periodos de clonalidad, o bien depender exclusivamente de la reproducción asexual, aunque estos organismos siguen conservando en su genoma la maquinaria necesaria para realizar la meiosis (Halary et al., 2011; Schurko et al., 2009). Esto es especialmente importante en muchos grupos de hongos en los que nunca se ha observado reproducción sexual. En estos se creía que los cambios genéticos de la población eran debidos exclusivamente a la recombinación ocurrida durante la mitosis, pero actualmente hay numerosas evidencias sobre la existencia de sexo críptico (Kück & Pöggeler, 2009). La reproducción sexual tiene una serie de ventajas sobre la asexual, como la limitación de la acumulación de mutaciones nocivas y la aparición de combinaciones genéticas nuevas y ventajosas; también presenta una serie de desventajas tales como el mayor gasto energético y el tiempo requerido para realizar la meiosis (Billiard et al., 2012).

La reproducción sexual puede ocurrir mediante tres tipos posibles de cruzamientos (**Figura 8**): 1) autocruzamiento haploide (singamia de células haploides originadas por mitosis de un solo individuo haploide, normalmente son células idénticas excepto porque han sufrido alguna mutación); 2) autocruzamiento diploide (singamia de células haploides procedentes de un solo individuo diploide); 3) cruzamiento (singamia entre células haploides derivadas de la meiosis de dos individuos diploides) (Billiard et al., 2012). En hongos, la singamia está controlada por el grupo de apareamiento, de forma que las células solo son compatibles si son de distinto grupo. En *F. circinatum*, la existencia de dos idiomorfos, MAT-1 y MAT-2 (Kerényi et al., 1999), descarta la posibilidad de que exista autocruzamiento haploide, ya que esta no es posible en los hongos heterotálicos.

Otro concepto clave para el modelo reproductivo de los hongos son los grupos de compatibilidad vegetativa (*Vegetative compatibility group*, VCGs). La compatibilidad vegetativa se refiere a la capacidad de individuos distintos de una especie de hongo de formar un heterocarión (célula somática que contiene dos o más núcleos genéticamente distintos) estable mediante la fusión hifal (anastomosis). Para que tenga lugar este proceso, los dos individuos fúngicos deben

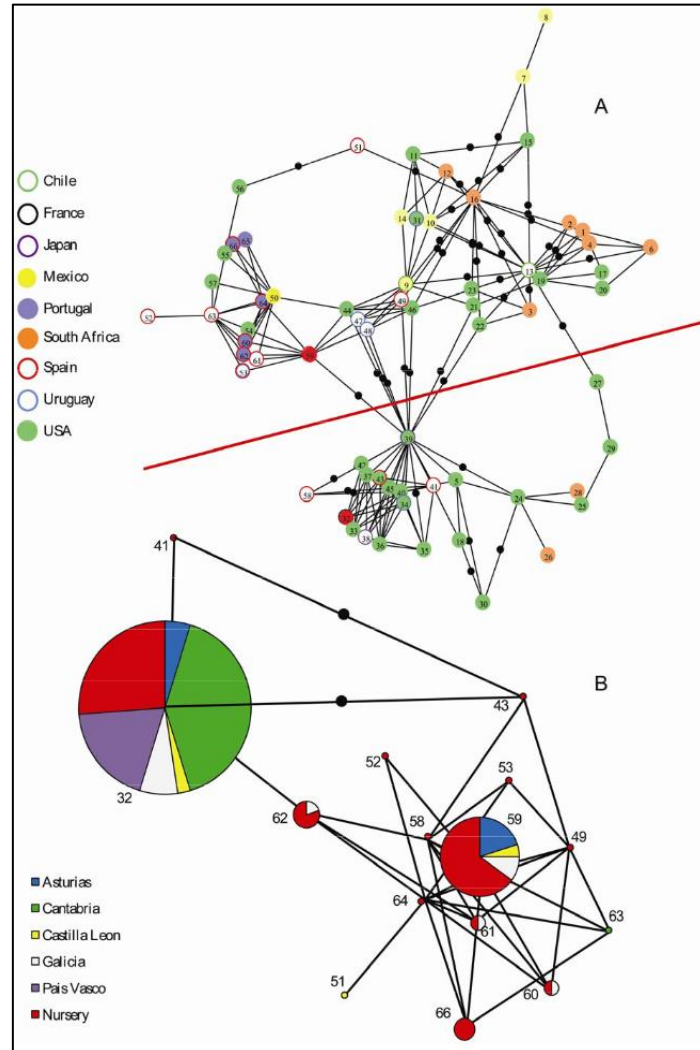
ser del mismo VCG (Leslie, 1993). Se considera que ésta es la principal fuente de variabilidad genética para los hongos que aparentemente solo se reproducen asexualmente.



**Figura 8.** Principales modos de reproducción y sistemas de apareamiento en hongos (Adaptado de Billiard et al., 2012).

### 1.5.1. Diversidad genética de *Fusarium circinatum*

En el caso de *F. circinatum*, la importancia relativa de la reproducción sexual o asexual se ha estudiado mediante la caracterización de los VCGs, determinando la frecuencia relativa de los dos idiomorfos existentes para los grupos de apareamiento y analizando la diversidad genotípica mediante marcadores polimórficos de ADN, como los microsatélites (Britz et al., 2005). La conclusión es que la reproducción asexual es la dominante y principal en la naturaleza, si bien la autocruzamiento también es posible y tampoco se puede excluir el outcrossing (Berbegal et al., 2013; Fru et al., 2023; Iturrutxa, Ganley, et al., 2011; Wikler & Gordon, 2000).



**Figura 9.** Minimum spanning network que muestra la relación entre los MLGs individuales observados en la muestra global (A) y España (B). La distancia entre los nodos es proporcional a la distancia genética de Bruvo (tomado de Berbegal et al., 2013)

La diversidad genética de la población de *F. circinatum* se ha analizado en un estudio global que incluye 223 aislados de España, Chile, Francia, Japón, México, Portugal, Sudáfrica, Uruguay y Estados Unidos (Berbegal et al., 2013). Para este estudio se eligieron 10 marcadores microsatélites (SSR) que presentaban polimorfismo en el conjunto de las poblaciones por países. En total se encontraron 66 genotipos multilocus (multilocus genotype, MLGs), estando presentes 15 en España. Los resultados mostraron que las poblaciones de México, Portugal, Sudáfrica, Uruguay y Estados Unidos eran genéticamente muy diversas, por encima de las poblaciones de países como España, Chile, Francia y Japón (**Figura 9**). Un análisis discriminante de componentes principales (PCA-DA) mostró similitudes entre las poblaciones de España, Francia, Portugal, Uruguay y Estados

Unidos, estando los individuos de este último país incluidos en todos los grupos observados, sugiriendo que podría ser el origen común de las respectivas introducciones. Además, este estudio confirma que México es el origen de la población sudafricana de *F. circinatum*, ya apuntado por Wikler & Gordon (2000), agrupándose la mayoría de MLGs de México y Sudáfrica en un único clúster, y que se separa claramente de los MLGs españoles y portugueses. También se rechazó la ocurrencia de reproducción sexual para EEUU y España, aunque no para Chile y Sudáfrica. Sin embargo, para este último país se ha concluido que la gran diversidad genética observada se debe principalmente a múltiples introducciones independientes y no a la reproducción sexual (Fru et al., 2023).

En el estudio de Berbegal et al., (2013), se analizó más profundamente la población en España, utilizando 70 aislados muestreados entre 2004 y 2011 de plantaciones de cinco regiones del noreste español (Asturias, Cantabria, Galicia, León y País Vasco) y 61 aislados obtenidos de viveros, localizados en las mismas regiones. Los resultados mostraron que la población está estructurada en dos grupos (**Figura 9**), cada uno con un haplotipo dominante (denominados MLG32 y MLG59), situación compatible con dos introducciones independientes del patógeno en el país. El análisis de la asociación genética mostraba un desequilibrio de ligamiento y clonalidad en la población, apoyando la hipótesis de la no existencia de reproducción sexual, a pesar de que se encontraron los dos grupos de apareamiento. También se mostró que el grupo con haplotipo dominante MLG32 solo contenía aislados MAT-2 procedentes del área noreste del país (País Vasco). Un estudio anterior realizado exclusivamente con aislados del País Vasco basándose en los VCGs, había determinado la existencia de una población genéticamente homogénea con dos VCGs (Iturritxa, Ganley, et al., 2011). Hasta la fecha no se ha realizado ningún otro estudio de VCGs en España.

## **1.6. Mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos**

Las plantas han desarrollado una serie de sistemas y estrategias de defensa frente a los patógenos, de manera que solo un pequeño grupo de ellos resulta capaz de causar enfermedades (Heath, 1997). Las plantas además son organismos sésiles que, a diferencia de los animales, no pueden esconderse o huir cuando son atacados por otros.

En cualquier interacción entre las plantas y los patógenos existe una amplia gama en la respuesta vegetal la cual ocasiona desde una extrema susceptibilidad hasta

una completa resistencia (Eyles et al., 2010). Esta resistencia se debe a la existencia de una amplia variedad de defensas constitutivas e inducibles (Franceschi et al., 2005). Las constitutivas están presentes en todo momento y constituyen la primera línea de defensa frente a las plagas y los patógenos. Dentro de estas defensas nos podemos encontrar con la resina constitutiva, la cual por su composición química puede inhibir el crecimiento de patógenos. Cuando se rompen o superan las defensas constitutivas se activan las respuestas inducidas, que dependen de la correcta detección del patógeno y están basadas en una serie compleja de mecanismos moleculares de señalización y regulación molecular. Las respuestas inducidas incluyen entre otras las defensas químicas inducibles, como la resina inducida, la cual posee mayor actividad tóxica y antimicrobiana que la constitutiva (Eyles et al., 2010).

### **1.6.1. Mecanismos moleculares en el reconocimiento e interacción planta-patógeno y defensa vegetal**

Con el fin de poder defenderse, la detección de los patógenos y la transducción en respuestas adecuadas resultan fundamentales. Para esto, las plantas han desarrollado un sistema inmunológico innato, cuyo origen se remonta al de las algas verdes (Ortiz & Dodds, 2018) y ha evolucionado hasta culminar en un sistema altamente eficaz capaz de resistir el ataque de numerosos patógenos microbianos (Chisholm et al., 2006). La inmunidad innata se puede clasificar como en primaria o secundaria (de Wit, 2007) y es la primera línea de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos. Esta está basada en los receptores PRRs (*pattern recognition receptors*) o receptores de reconocimiento de patrones, localizados en la membrana celular de la planta, los cuales reconocen una serie de moléculas microbianas que se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) (Boutrot & Zipfel, 2017; de Wit, 2007; Newman et al., 2013; Zipfel, 2014). Los PAMP son moléculas conservadas e indispensables para la vida de los distintos microorganismos patógenos y por lo tanto están muy conservados y sufren pocas mutaciones (Zipfel, 2008). Esta interacción entre los PAMPs y los PRRs se conoce como inmunidad desencadenada por PAMP (PTI, *PAMP-triggered immunity*) y a veces es suficiente para frenar la infección. La PTI desencadena las respuestas de defensa primaria tales como alteraciones de la pared celular, deposición de callosa (de Wit, 2007), la acumulación de proteínas relacionadas con la defensa vegetal (quitinasas, glucanasas y proteasas) (van Loon et al., 2006), la activación de la vía de proteínas

cinastas activadas por mitógenos (vía MAPK) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zipfel, 2008).

Las especies patógenas han evolucionado y desarrollado la capacidad de superar las defensas de la planta, para evadir PAMP y/o superar la respuesta defensiva de la planta y así infectar a una o varias especies de plantas causando enfermedad. Con el fin de suprimir o escapar de la PTI, los patógenos secretan una serie de efectores. Esto se conoce como susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS) (Bhar et al., 2022; Zipfel, 2008). En hongos, en los últimos años se ha logrado un gran avance en el conocimiento de estos procesos y de sus agentes implicados (de Wit, 2007; Deller et al., 2011). Nuevamente, gracias a una coevolución dinámica entre plantas y patógenos, algunas plantas han desarrollado una serie de proteínas de resistencia las cuales permiten reconocer estos efectores de manera indirecta o de manera directa mediante la unión al dominio NB-LRR, dando lugar así a la inmunidad mediada por efectores (ETI) (J. D. G. Jones & Dangl, 2006; Veluthakkal & Dasgupta, 2010). Muchas veces la ETI va acompañada de una muerte celular local conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR), cuyo principal objetivo es bloquear el avance del patógeno (de Wit, 2007; Greenberg & Yao, 2004; Zipfel, 2008, 2014). La presión de la selección natural lleva a los patógenos a modificar sus efectores o adquirir nuevos para suprimir la ETI, a su vez las plantas desarrollan nuevas resistencias con el objetivo de poder activar nuevamente la ETI (J. D. G. Jones & Dangl, 2006). Así pues, la patogenicidad de un microorganismo estará determinada por su capacidad de superar o eludir el sistema de defensa de las plantas, a su vez la resistencia de estas estará determinada por su capacidad de frenar al patógeno.

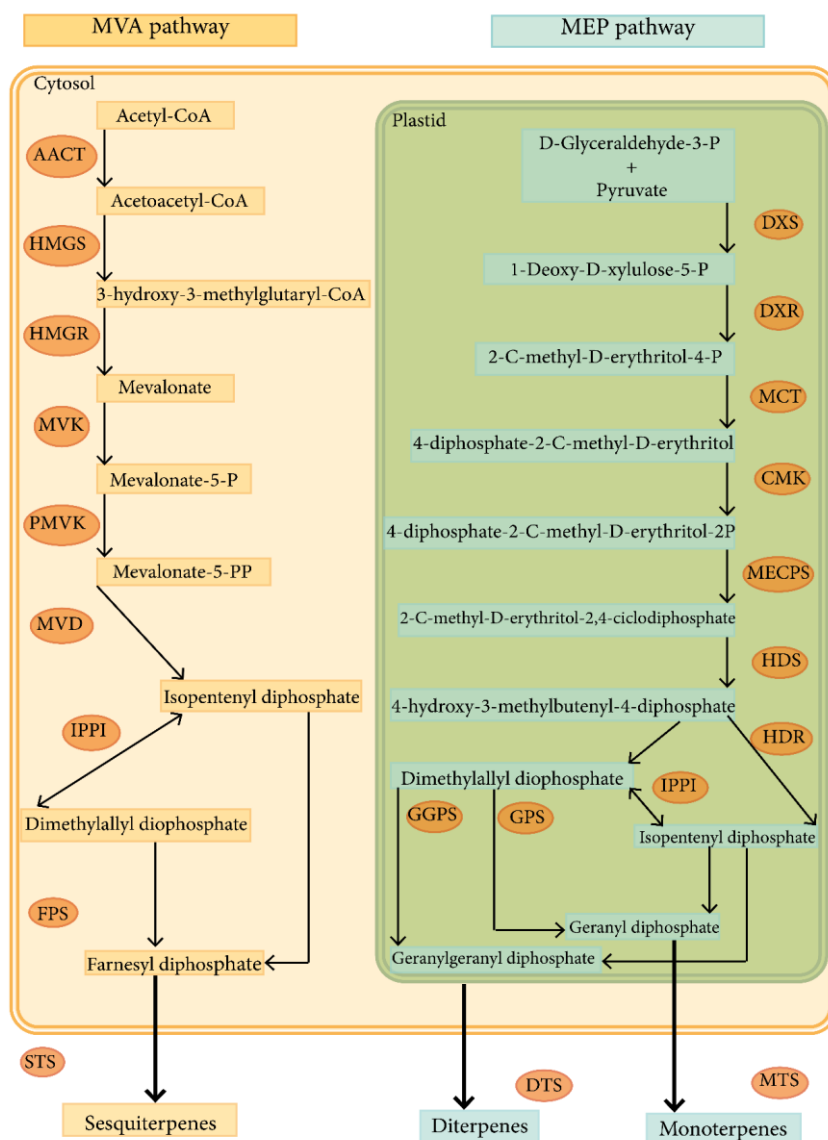
### **1.6.2. La oleorresina como defensa en *Pinus* spp**

La resina constituye uno de los principales mecanismos de defensa en coníferas (Keeling & Bohlmann, 2006; Celedon & Bohlmann, 2019). Las coníferas producen abundante cantidad de oleorresina (comúnmente llamada resina) en sus tejidos (Phillips & Croteau, 1999), que se almacena en estructuras anatómicas específicas (Celedon & Bohlmann, 2019). La resina preformada (constitutiva) fluye hacia donde se ha producido una herida o al punto de entrada del patógeno, sellando la herida, aislando al organismo invasor y formando una barrera que impide su avance, constituyendo así una defensa física (Luchi et al., 2005; Phillips & Croteau, 1999). La exudación de la oleorresina también es una defensa química, debido a que algunos compuestos de su composición resultan tóxicos o inhibidores (Celedon

& Bohlmann, 2019; Phillips & Croteau, 1999) frente a insectos (Eyles et al., 2010; Faccoli & Schlyter, 2007; Keeling & Bohlmann, 2006) y microorganismos como hongos (Savluchinske-Feio et al., 2006; Fraser et al., 2016). Bajo estrés biótico o abiótico, la biosíntesis de resina aumenta y se inducen cambios en su composición (resina inducida) que ocasionan que tenga un efecto más tóxico debido a un aumento de los terpenos que la constituye (Celedon & Bohlmann, 2019; Kim et al., 2010; Liu et al., 2021).

La resina en coníferas está compuesta por una mezcla compleja de terpenoides (o terpenos) que incluye los volátiles monoterpenos (MTs), sesquiterpenos (STs) y diterpenos neutros (DTs), estos últimos los menos volátiles, y diterpenos ácidos (DRAs) no volátiles (Phillips & Croteau, 1999). Se ha descrito el papel antimicrobiano de numerosos compuestos terpénicos individuales. Por ejemplo, se sabe que el MT  $\alpha$ -pineno es un compuesto con actividad antifúngica (Andrews et al., 1980) o que terpenos como citronellol y geraniol poseen un fuerte efecto antimicrobiano (Guimarães et al., 2019).

Los terpenoides se sintetizan a partir de dos rutas metabólicas: la ruta del mevalonato (MVA), localizada en el citosol, y la ruta del metileritritol fosfato, o ruta independiente de mevalonato (MEP), localizada en el cloroplasto (Alicandri et al., 2020) (**Figura 10**). A partir de estas dos rutas se sintetiza pirofosfato de isopentenilo (IPP) y pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), dos moléculas de 5 átomos de carbono las cuales son precursores del resto de terpenos (Pazouki & Niinemets, 2016). Estas dos moléculas se pueden ensamblar por la acción de preniltransferasas dando lugar a pirofosfato de geranilo (GPP, C10), pirofosfato de farnesilo (FPP, C15), pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP, C20) y escualeno (C30) (Alicandri et al., 2020; Pazouki & Niinemets, 2016). Estos compuestos se transforman en los distintos terpenos por la acción de las terpeno sintasas (TPSs), las cuales dan lugar a: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) y diterpenos (C20), clasificados en función del número de átomos de carbono que poseen (Tholl & Lee, 2011). Además de su implicación en defensa, los terpenoides tienen un papel fundamental en la planta ya que son precursores de algunas fitohormonas, como giberelinas, ácido abscísico, citoquininas, brasinoesteroides y estrigolactonas. También son precursores de los carotenoides, ubiquinona y plastoquinona (Alicandri et al., 2020).



**Figura 10.** Rutas MVA y MEP para la síntesis de terpenos

Se han estudiado los cambios cualitativos y cuantitativos de los terpenos constituyentes de la oleorresina en las coníferas en respuesta a organismos invasores. Por ejemplo, tras la infección de *Picea abies* (L.) H.Karst. por *Heterobasidion* spp., se detectó un aumento de algunos MTs, concretamente el alfa-pineno y el 3-careno (Zamponi et al., 2007). Además, los genotipos resistentes de *Picea* se correlacionaron con mayores contenidos de MTs y STs (Liu et al., 2021). También se han estudiado los cambios en la composición de la resina en *P. pinaster* y *P. radiata* en respuesta a la alimentación de insectos como *Hylobius abietis* L. y *Thaumetopoea pityocampa* Den. & Schiff, o a la aplicación exógena de metiljasmonato (Lombardero et al., 2019; Lundborg et al., 2019; Moreira et al.,

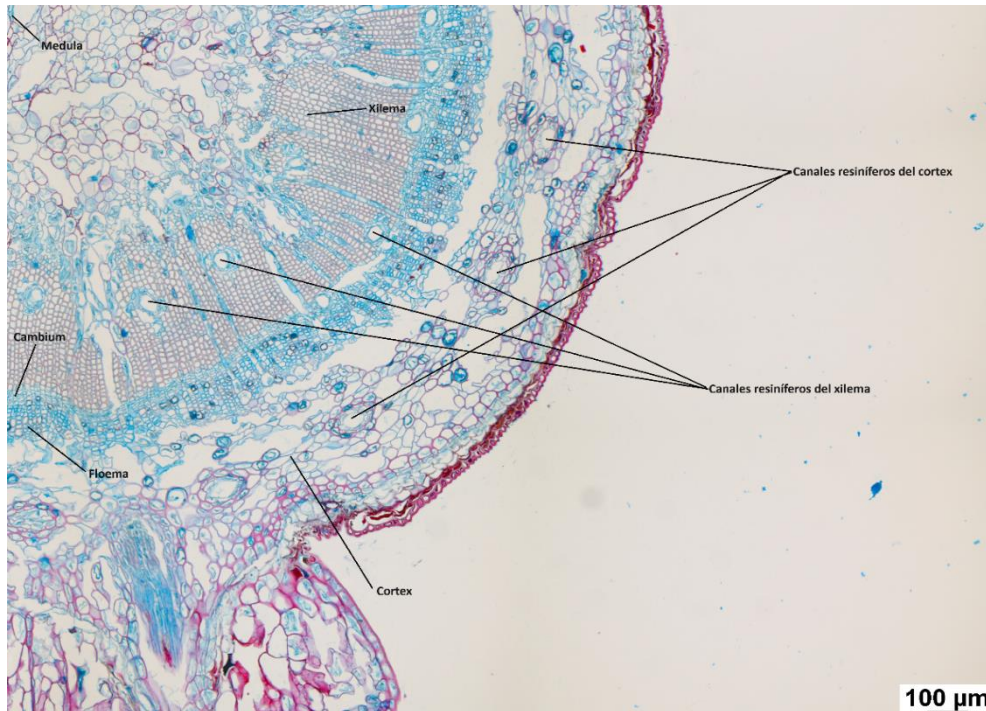
2013). En el estudio de Lombardero et al., (2019) se describen cambios en algunos terpenos en respuesta a *Tomicus piniperda* L., el cual es vector y se encontraba asociado con *F. circinatum*. En este estudio se vio que *P. pinaster* aumentó la cantidad de terpenos en respuesta al ataque de *T. piniperda* pero no en respuesta a *F. circinatum*. Al contrario, *P. radiata* aumentó la concentración de terpenos frente al insecto y frente al hongo. Por desgracia, en este estudio solo se analizaba un reducido número de terpenos, principalmente MTs, y no se incluía ningún DRAs. El grupo que menos atención ha recibido es el de los DRAs, a pesar de que alguno de ellos presenta importantes propiedades antifúngicas (Kusumoto et al., 2014). López-Goldar et al., (2020) demuestran que tanto *P. pinaster* como *P. radiata* aumentan la concentración de DRAs después del ataque de *H. abietis*, siendo la respuesta en *P. pinaster* mayor que en *P. radiata*.

La oleorresina se sintetiza y acumula en estructuras anatómicas especializadas (Franceschi et al., 2005; Hudgins et al., 2004). En el caso del género *Pinus*, estas estructuras son fundamentalmente los canales resiníferos (**Figura 11**), los cuales se encuentran de manera constitutiva en el xilema y córtex y se encuentran conectados entre sí, formando una red ramificada y compleja (Franceschi et al., 2005; Phillips & Croteau, 1999). Los canales resiníferos se encuentran rodeados de células epiteliales y por una o más capas de células acompañantes, caracterizadas por ser células de paredes gruesas no lignificadas muy ricas en sustancias pectínicas y cuya lámina interna contiene suberina (Rodrigues, 2016) Además de los canales preformados (constitutivos), la formación de canales resiníferos puede ser inducida por factores externos, tales como heridas o ataques de insectos y patógenos (Chen et al., 2019; Franceschi et al., 2005; Kim et al., 2010; Luchi et al., 2005; Phillips & Croteau, 1999) así como por la aplicación exógena de ácido metiljasmónico (Hudgins et al., 2004; López-Villamor et al., 2021). Estos canales resiníferos inducidos se denominan canales traumáticos (*traumatic resin ducts* TRDs) que se encuentran normalmente en 1 o 2 series de anillos tangenciales en el xilema del año en el que se produjo el daño (Bannan, 1936).

La inducción de los TRDs también implica una mayor biosíntesis y acumulación de resina (Franceschi et al., 2005). Este aumento en la cantidad de resina en respuesta a un estrés biótico normalmente se correlaciona positivamente con la resistencia en los pinos (Krokene & Nagy, 2012; Nagy et al., 2006). Además, se han asociado algunas características de los canales resiníferos, tanto constitutivos como inducidos, con la resistencia frente a distintos patógenos y herbívoros (Ferrenberg et al., 2014; Kane & Kolb, 2010; Vázquez-González et al., 2020). Por

ejemplo, un aumento en el tamaño, la abundancia y la densidad de los canales resiníferos son rasgos frecuentemente relacionados con individuos resistentes, mejorando las defensas químicas y físicas (Krokene & Nagy, 2012; Nagy et al., 2006). Tanto la composición química de la resina como las características de los canales resiníferos son rangos adaptativos que resultan de un proceso coevolutivo de los patógenos y las coníferas (Keeling & Bohlmann, 2006; Krokene & Nagy, 2012). De esta manera, las coníferas se defienden exitosamente de la mayoría de los organismos invasores y estos, también han desarrollado diferentes estrategias para superar las defensas de los árboles, siendo incluso capaces de utilizar los terpenos en su propio beneficio (Celedon & Bohlmann, 2019; Keeling & Bohlmann, 2006; Vázquez-González et al., 2020).

La asociación positiva observada entre la cantidad de resina y la resistencia a patógenos parece que no es cierta para patógenos que utilizan los canales resiníferos para propagarse en las plantas. En este caso, la infección se ve favorecida por el tamaño de los canales resiníferos (Krokene & Nagy, 2012; Rodríguez-García et al., 2023; Vázquez-González et al., 2020). Por ejemplo, los pinos susceptibles al nematodo *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner poseen canales resiníferos constitutivos más anchos en el córtex y canales más pequeños en el xilema que las especies menos susceptibles. Además, los canales inducidos del xilema son más numerosos en las especies susceptibles (Rodríguez-García et al., 2023). *F. circinatum* también es un patógeno que utiliza los canales resiníferos para propagarse dentro del huésped (Martín-Rodríguez et al., 2013) pero no se ha estudiado la influencia del tamaño de los canales en la susceptibilidad frente al patógeno.



**Figura 11** Sección de un corte transversal del ápice de una plántula de *P. radiata* de 11 meses de edad

Además, el hecho de que se mueva en la planta por los canales resiníferos sugiere que el patógeno debe al menos tolerar la resina. Existen además otras evidencias sobre la tolerancia de *F. circinatum* frente a la resina. Se ha ensayado el efecto de varios monoterpenos en el crecimiento del micelio y en la germinación de esporas, comparándolo con *Fusarium temperatum* Scaufl. & Munaut, especie no patogénica (Slinski et al., 2015). En este estudio se demostró que la inhibición en crecimiento y germinación causada por los monoterpenos estudiados es menor en *F. circinatum* que en *F. temperatum*. Barrows-Broadbent & Dwinell, 1983 observaron que la producción de resina no ofrecía una acción protectora en planta contra *F. circinatum*, sugiriendo que el patógeno utiliza la resina en su propio beneficio cuando coloniza el huésped. En general, se ha establecido que hay una correlación positiva entre la resistencia a patógenos y la emisión de terpenos volátiles y la producción de resina (Hammerbacher et al., 2019). Sin embargo, la inoculación artificial de *F. circinatum* en diferentes especies de pino demostró que los niveles de resina son mayores en plantas infectadas por *F. circinatum* que en plantas a las que se les ha producido una herida artificial, sin que esta producción de resina aumente la resistencia frente al hongo (Kim et al., 2010; Martín-Rodríguez et al., 2013). Además, la resina se produce de manera más abundante en especies susceptibles que en resistentes (Enebak & Stanosz, 2003; Kim et al., 2010).

### 1.6.3. Perfil transcriptómico de la interacción entre *Pinus spp* y *Fusarium circinatum*

Se han realizado varios estudios sobre la interacción de *Pinus spp.* con *F. circinatum* usando la secuenciación dual de RNA como aproximación. En estos estudios se enfatizó en el papel de la regulación de las fitohormonas en la resistencia de las distintas especies de pinos. Por ejemplo, se ha demostrado una respuesta más temprana a la infección por parte de *P. tecunumanii*, especie resistente, respecto a *P. patula*, especie susceptible (Visser et al., 2019). Lo mismo se ha observado en *P. pinea* (resistente) y *P. radiata* (susceptible) (Zamora-Ballesteros et al., 2021).

En el caso de *P. pinaster*, el estudio transcriptómico realizado por Hernandez-Escribano et al., (2020) a los 3, 5 y 10 dpi mostró que la resistencia moderada de esta especie a *F. circinatum* podría explicarse por la activación de las vías de señalización reguladas por fitohormonas. Además, la expresión de los genes del patógeno sugiere la manipulación en el equilibrio de fitohormonas del huésped para su propio beneficio. Concretamente mediante la perturbación de la homeostasis del etileno mediante la expresión de genes fúngicos relacionados con la biosíntesis de esta hormona, el bloqueo del ácido jasmónico mediante la supresión de *COI1* (*coronatine insensitive 1*) y la inhibición de la biosíntesis del ácido salicílico mediante la síntesis de la familia de genes *ICSH* (*isochorismatase family hydrolase genes*).

En este trabajo se identificaron un total de 13323 DEG en *P. pinaster* inoculado en comparación con las plantas inoculadas con agua. Se observó un aumento notable de la expresión de DEG de los 3 a los 10 dpi. Además, se identificó un gen codificante para una proteína de resistencia tipo CC-NBS-LRR, con dominios LRR, NB-ARC y RPW8, el cual es el DEG cuya expresión se indujo más, con un  $\log_2 FC$  (*Fold change*, tasa de cambio) 25,08, 34,81 y 23,50 a los 3, 5 y 10 dpi respectivamente. En *F. circinatum* a los 3, 5 y 10 dpi se encontraron 4070, 4366 y 4372 DEG respectivamente. Al comparar los DEG a los 3 dpi respecto a los de los 5 dpi, en las plántulas inoculadas se encontraron 3427 genes cuya expresión disminuía y solo 11 regulados positivamente. Este patrón se repitió de los 3 a los 10 dpi, con 4307 genes regulados negativamente y 21 positivamente y de los 5 a los 10 dpi, con 1599 genes regulados negativamente y 24 regulados positivamente.

En Hernandez-Escribano et al., (2020) se clasificaron los DEG en 30 grupos, de los cuales 12 poseían términos GO (*Gene Ontology*) enriquecidos y representaban el

92,7% de estos. Los GO se tratan de términos descriptivos que permiten asociar a un producto génico con un procesos biológicos (BP), una función molecular (MF) y un componente celular (CC). Aquí presentamos de manera resumida como se distribuyeron estos términos GO dentro de los grupos más importantes.

Los genes del grupo 1 estaban regulados positivamente a los 5 y 10 dpi y ligeramente a 3 dpi. Los términos GO incluidos en la categoría BP estaban relacionados con la respuesta frente a estímulos, la respuesta frente a la quitina, la regulación de las especies reactivas de oxígeno, la respuesta frente al estrés oxidativo, la regulación positiva de la muerte celular y la transducción de fosforilación, todas respuestas comúnmente relacionadas con el estrés biótico. En este grupo también se detectaron términos relacionados con el etileno, ácido jasmónico y salicílico, así como resistencia sistémica adquirida (SAR) mediada por SA. En la categoría MF, los términos estaban relacionados con la actividad glicosiltransferasa, actividad catalítica, actividad lipasa y actividad liasa. En la categoría CC solo había términos referentes a la membrana plasmática y periferia celular.

La expresión de los DEG del grupo 2 estaba inducida en todos los dpi, especialmente a los 3 dpi. En la categoría BP encontramos términos relacionados con procesos metabólicos celulares, localización celular, biogénesis de componentes celulares, transporte citosólico, transporte mediado por vesículas y proceso catabólico proteico dependiente de ubiquitina mediado por proteasoma. Los términos MF estaban relacionados principalmente con actividades de unión, unión a proteínas, unión a compuestos heterocíclicos, unión a nucleótidos y actividades de fosforilasa e hidrolasa. Los términos CC se relacionaron con la membrana de la vacuola, la cubierta de la membrana celular y la cubierta de la vacuola.

En el grupo 3 la mayoría de los DEG estaban regulados positivamente a los 10 dpi. Estos se encontraron en la categoría BP con DEG relacionados con procesos metabólicos de flavonoides y antocianinas, transporte hormonal, respuesta al estrés oxidativo, respuesta al ácido jasmónico y transporte polar de auxinas. No había términos GO enriquecidos relacionados con la categoría MF y en la categoría CC se encontraron DEG relacionados con el complejo NADH deshidrogenasa, la vacuola y las mitocondrias. En el grupo 5 solo había tres términos GO enriquecidos dentro de la categoría BP, todos relacionados con el transporte.

Por último, los DEG dentro de los grupos 18, 19, 27 y 29 se regularon negativamente principalmente a los 10 dpi, y de menor manera a los 3 y 5 dpi. Los

términos GO dentro de estos grupos estaban relacionados con el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, la morfogénesis y la fotosíntesis. También se encontraron términos relacionados con procesos metabólicos tales como metabolismo de isoprenos, terpenoides y carotenoides.

## 2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el conocimiento de la interacción de *Pinus* y *Fusarium circinatum*. La producción de resina es un mecanismo general de defensa en pinos frente a patógenos, pero como se ha mencionado anteriormente, hay evidencias que indican que *F. circinatum* es tolerante a ella. El estudio se realizará utilizando como huéspedes *P. pinaster* y *P. radiata*, las dos especies afectadas por la enfermedad en España y con distinto grado de susceptibilidad. Por otro lado, desde la introducción del patógeno en la Península no se ha estudiado su evolución genética, a pesar de que es un aspecto fundamental para desarrollar medidas de control adecuadas frente a la enfermedad.

Los objetivos específicos que se plantean son:

- 1) Determinar la variación espacial y temporal de la población española de *F. circinatum* desde su introducción en España

Se estudiará la estructura genética actual, determinada a partir de un muestreo hecho en 2020. Los resultados obtenidos se compararán con el análisis de la población hecho alrededor de 2010, después de la introducción del patógeno.

- 2) Evaluar el efecto de la resina inducida y constitutiva en el crecimiento de *F. circinatum*.

Se medirá el crecimiento *in vitro* de *F. circinatum* en presencia de resina inducida y constitutiva obtenida de las dos especies, *P. pinaster* y *P. radiata*. También se medirá el crecimiento en presencia de algunos de los terpenos individuales que forman parte de la resina.

- 3) Estudiar los cambios inducidos en *P. pinaster* y *P. radiata* como mecanismo de defensa frente a *F. circinatum*.

Se compararán los cambios anatómicos y de la composición de la resina de las dos especies de pino infectadas con *F. circinatum*. Además, se utilizará el transcriptoma obtenido anteriormente durante la interacción de *P. pinaster*

frente a *F. circinatum* para identificar los genes implicados en la biosíntesis de terpenos.

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Variación temporal y espacial en la estructura genética de la población española de *Fusarium circinatum*

##### 3.1.1. Muestreo y material fúngico

El muestreo de *F. circinatum* se realizó entre los años 2018 y 2020 en Galicia, Asturias y País Vasco. Todos los aislados se obtuvieron de chancros de árboles adultos que mostraban síntomas de PPC. Para ello, se cortaron pequeñas piezas de tejido de la zona marginal de los chancros y se esterilizó la superficie de la madera sumergiéndola durante 1 minuto en una solución de hipoclorito sódico al 30% con Tween 20 (100 µl L<sup>-1</sup>). Después se realizaron dos lavados con agua destilada estéril y se plaquearon en medio selectivo para *Fusarium* (FSM) (Aegerter & Gordon, 2006) (Tabla 1). Las placas se incubaron en oscuridad a una temperatura de 22-24°C.

**Tabla 1.** Composición de los medios utilizados en el aislamiento e identificación de *F. circinatum*

Medio selectivo de Fusarium (FSM)	
Peptona	15 g/L
Agar	20 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
PCNB	0,2 g/L
Estreptomina	0,3 g/L
Medio Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA)	
Agar	15 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
KNO <sub>3</sub>	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
KCL	0,5 g/L
Glucosa	0,2 g/L
Sacarosa	0,2 g/L

La identificación de los aislados se realizó en base a sus características morfológicas y por técnicas moleculares. Para la identificación morfológica, los aislados obtenidos se transfirieron a medio Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) (Nirenberg, 1981) (**Tabla 1**) y se incubaron en oscuridad durante 7-10 días a 25°C. Después de este periodo, los aislados se observaron bajo el microscopio óptico en búsqueda de circinos, los cuales son característicos de *F. circinatum*.

La identificación molecular se realizó mediante PCR, utilizando los cebadores específicos CIRC1A y CIRC4A (Schweigkofler et al., 2004), en un volumen final de la reacción de 25 µl utilizando 1 µl de ADN como molde. El ADN se extrajo del micelio crecido en PDA (Condalab, Madrid, Spain) utilizando el kit NZY Plant/Fungi gDNA Isolation (NZYTech, Lisbon, Portugal), según las instrucciones del fabricante. La amplificación mediante PCR se realizó en un termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: una etapa inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 45 ciclos de amplificación con una fase de desnaturalización a 94°C durante 35 segundos, alineamiento a 66°C durante 55 segundos y elongación a 72°C durante 50 segundos, por último, una extensión final a 72°C durante 12 minutos. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa (Agarose MS-12, Condalab, Madrid, Spain) al 1%, teñido con RedSafe (RedSafe Nucleic Staining Acid Solution, Intron Biotechnology, Seongnam-si, Republic of Korea) bajo luz UV. Los aislados de *F. circinatum* producen un amplicon de 360 pb.

Se obtuvieron un total de 45 aislados monospóricos de *F. circinatum*, 5 aislados de Galicia, 9 de Asturias y 31 de País Vasco (**Tabla 2**). Para el estudio se utilizó un único aislado por árbol en cada plantación afectada. Además, para el análisis de la variación genética del patógeno en el tiempo, se utilizó un conjunto de aislados mantenidos en el Instituto Agroforestal Mediterráneo (Universitat Politècnica de València) y recolectados desde 2004 hasta 2011 (**Tabla 2**), durante el inicio de la primera epidemia en España. Los aislados se seleccionaron por procedencia, para poder estudiar la evolución de la diversidad genética en el tiempo, durante los dos periodos de muestreo entre 2004-2011 y 2018-2021. Además, se incluyeron aislados obtenidos en vivero, los cuales se consideraron como una única población, independientemente de la zona. El conjunto de aislados seleccionados representaban el total de haplotipos identificados en Berbegal et al., (2013), trabajo en el que se describió la estructura genética de la población de *F. circinatum* en España.

**Tabla 2.** Número de aislados usados para este estudio con su procedencia geográfica y periodo de muestreo.

Región	Año de Muestreo	Origen	Aislados (N)	Usados para		
				VCG <sup>a</sup>	SSR <sup>b</sup>	Grupo de apareamiento
Galicia	2004-2011	Plantación	8	8	8	8
	2018-2021	Plantación	5	5	5	5
Asturias	2004-2011	Plantación	5	4	5	5
	2018-2021	Plantación	9	9	9	9
País Vasco	2004-2011	Plantación	15	15	15	15
	2018-2021	Plantación	31	31	15	31
Cantabria	2004-2011	Plantación	20	20	-	20
Castilla y León	2004-2011	Plantación	5	5	-	5
Viveros <sup>c</sup>	2004-2011	Vivero	9	9	9	9
Total			107	106	66	107

<sup>a</sup> grupo de compatibilidad vegetativa

<sup>b</sup> marcadores microsatélites

<sup>c</sup> Localización de los viveros. Asturias: Castropol, Siero, Grado, Navia y Valdés; Castilla y León: Cembrano; Cantabria: Torrelavega; Galicia: ubicación desconocida

### 3.1.2. Extracción de ADN

El micelio fresco del hongo crecido en PDA (Condalab, Madrid, Spain) a 22°C se trituró hasta polvo fino en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido. El ADN se extrajo mediante el kit E.N.Z.A Plant DNA (Omega Biotek, Norcross, GA, USA) o mediante el kit NZY Plant/Fungi gDNA Isolation (NZYTech, Lisbon, Portugal), siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. El ADN obtenido mediante el kit NZY Plant/Fungi gDNA Isolation se utilizó exclusivamente para el análisis por microsatélites. La cantidad y calidad del ADN se evaluó utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Solamente se usó ADN con una relación de absorbancia 260/280 y 260/230 > 1.8.

### 3.1.3. Determinación del Grupo de apareamiento

El grupo de apareamiento de cada aislado se determinó en una PCR multiplex usando los cebadores descritos en Schweigkofler et al., (2004) y Wallace & Covert, (2000) MAT1p1 (AGAAACTGACTGATACATCAAGGGG) MAT1p3 (TCATAAGAAGTGTTGAAGGAATCACAG) y GcHMG1 (CTTTACCGTAAGGAGCGTCACCAT)- GcHMG2 (TGATCCGCCATCTGCTTGTAGAGT) para los alelos MAT-1 y MAT-2 respectivamente. El volumen final de reacción fue de 25 µl con 1 µl de ADN como molde. Las condiciones fueron las siguientes: una etapa inicial a 94°C seguida de 30 ciclos de amplificación con una fase de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento 61°C durante 50 segundos y elongación 72°C durante 50 segundos, por último, se realizó una extensión final a 72°C durante 12 minutos. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa (Agarose MS-12, Condalab, Madrid, Spain) al 1.5% teñido con RedSafe (RedSafe Nucleic Staining Acid Solution, Intron Biotechnology, Seongnam-si, Republic of Korea). Los aislados MAT-1 mostraron un amplicón de 380 pb, mientras que los MAT-2 de 190 pb.

### 3.1.4. Determinación de haplotipos por marcadores SSR

La cuantificación del número de repeticiones de los microsatélites fue realizada por AllGenetics and Biology S.L. (A Coruña, España). Se utilizó un conjunto de siete microsatélites diseñados previamente para *F. circinatum* (Santana et al., 2009) y seleccionados por Berbegal et al. (Berbegal et al., 2013) debido a su polimorfismo, amplificación específica y reproducibilidad (Tabla 3). La amplificación de los loci SRR se realizó mediante 3 PCR multiplex donde el polimorfismo de los loci fue analizado en 66 aislados de *F. circinatum* (Tabla 2). Cada reacción se hizo en un volumen final de 12.5 µl e incluía tres componentes: (1) un cebador directo específico para los microsatélites, (2) Un cebador reverso con una cola de oligonucleótidos en el extremo 5', (3) un oligonucleótido marcado con fluorescencia idéntico a la cola del extremo 5' del cebador reverso. Las colas de oligonucleótidos utilizadas fueron las secuencias universales M13 (GGA AAC AGC TAT GAC CAT), CAG (CAG TCG GGC GTC ATC) y T3 (AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG) que se marcaron con el fluoroforo HEX, FAM y TAMRA, respectivamente. Los productos de PCR se sometieron posteriormente a un análisis de fragmentos en un ABI 3730xl ADN Analyzer (Applied Biosystems, MA, USA).

**Tabla 3.** Loci SRR seleccionados para *F. circinatum* con sus correspondientes cebadores

<i>Locus</i>	Secuencia repetida	Nombre del cebador <sup>a</sup>	Secuencia del cebador
<b>FCM-2</b>	(TTTC) <sub>6</sub>	FCM-2F	CGGAAGCAATCAGGACATTT
		FCM-2R	GAGCATGATGTCTCTCGAAGC
<b>FCM-4</b>	(TTCTT) <sub>5</sub>	FCM-4F	TGGTCCCGGCTCATTACTA
		FCM-4R	AAAAGAAGACCCGCCTGATG
<b>FCM-6</b>	(GTGC) <sub>7</sub>	FCM-6F	GATGGAGATGAATGGGGAAA
		FCM-6R	GCCTCAGGTTGGTCTGGTTA
<b>FCM-7</b>	(AGGAGA) <sub>5</sub>	FCM-7F	ACGGCAGTGAAAAGAAGCAT
		FCM-7R	CAAGACCCTCTTGGCATCTC
<b>FCM-19</b>	(A) <sub>13</sub>	FCM-19F	GCGTCTTCCTCTGCCATTT
		FCM-19R	TAAGATTGAGGTTGTGCGGTTG
<b>FCM-25</b>	(TGTCT) <sub>6</sub>	FCM-25F	TGATTCCTCCTGCCTCATTC
		FCM-25R	TAGGGCGATGTCTCTGGTTT
<b>FCM-26</b>	(A) <sub>12</sub>	FCM-26F	CAAACCGGCCAGAGACAG
		FCM-26R	TTCTCCAACCACCCTTGAAC

<sup>a</sup> F: cebador directo, R: cebador inverso

### 3.1.5. Determinación de los grupos de compatibilidad vegetativa

Los grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) se determinaron en base a la metodología desarrollada por Correll et al. (1987), aunque con ligeras modificaciones. La determinación de los VCGs se basa en los emparejamientos de mutantes no utilizadores de nitrato (mutantes *nit*). Para la generación de mutantes *nit*, los aislados se cultivaron en medio Czapeck (Cz) (Condalab, Madrid, España) suplementado con un 4% de clorato potásico, a 25°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Los sectores de micelio que presentaron un crecimiento rápido en los primeros 4-10 días fueron transferidos a medio Cz. En este medio, los aislados que presentaban un crecimiento con hifas delgadas, expansivas y sin micelio aéreo fueron considerados mutantes *nit* (**Figura 12A**). Para confirmar la estabilidad de los mutantes *nit* estos se pasaron a PDA y posteriormente se volvieron a sembrar en Cz y en Cz más clorato potásico y se evaluó que se mantuviera la condición de mutante

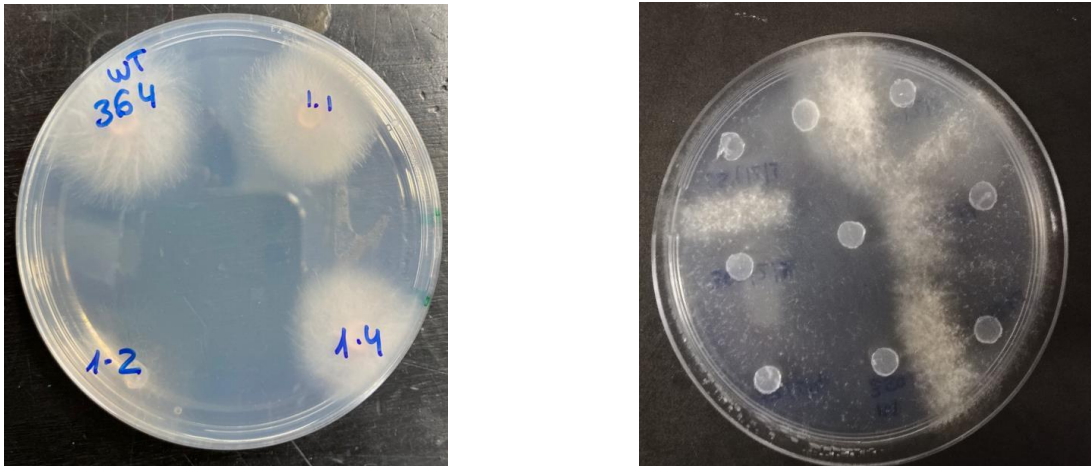
Para el fenotipado de los mutantes *nit* (*nit1/3* o *nitM*), estos se cultivaron en medio mínimo (Puhalla & Spieth, 1983) (**Tabla 4**), suplementado con 0.2g/L de hipoxantina (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las placas se incubaron a 25°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas durante 4 días. Aquellos

mutantes que presentaban un crecimiento del micelio fino y delgado, sin parte aérea en comparación con el no mutante, se consideraron *nitM*. Por el contrario, el aislado era considerado mutante *nit1/3* (**Figura 12 A**). No se intentó distinguir entre mutantes *nit1* y mutantes *nit3* debido a que el emparejamiento entre estos dos mutantes, en el caso de que pertenezcan al mismo VCG, desarrolla el heterocarion de manera muy lenta (Klittich & Leslie., 1988).

**Tabla 4** Composición del medio mínimo utilizado para el fenotipado de los mutantes no utilizadores de nitrógeno (*nit*) de *F. circinatum* (Puhalla & Spieth, 1983)

Medio mínimo	
Agar	20 g/L
Sacarosa	30 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
KCL	0,5 g/L
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 mg/L

Para determinar los VCGs se realizaron emparejamientos entre mutantes *nit1/3* y mutantes *nitM* de pares de aislados distintos en todas las combinaciones posibles. Para ello, se colocaron discos de micelio de aproximadamente 0,5 cm de diámetro con una separación de 3 cm entre ellos en medio Cz, de manera que los mutantes *nit1/3* quedaran enfrentados a los mutantes *nitM* (**Figura 12 B**). Las placas se incubaron a 25°C en oscuridad durante 4-15 días y se observaron periódicamente en búsqueda de la aparición de micelios densos en la zona de contacto entre los pares de aislados, formando el heterocarion (**Figura 12 B**). Los mutantes que con el cruzamiento originaban un crecimiento denso forman parte del mismo grupo de compatibilidad vegetativa. También se realizaron cruzamientos entre mutantes de un mismo aislado con el fin de comprobar la autocompatibilidad del heterocarion (HIS), hecho que se ha descrito para el complejo *Gibberella fujikuroi* (Klittich & Leslie., 1988).



**Figura 12.** A: Fenotipado de mutante *nit* de *F. circinatum* en medio mínimo suplementado con hipoxantina. Arriba a la izquierda se encuentra el aislado original, en la mitad derecha mutantes *nit1/3*, que presentan un crecimiento igual al del aislado original. Abajo a la izquierda, un mutante *nitM*, con el crecimiento característico del micelio con hifas finas y transparentes y sin parte aérea. B: Cruzamientos entre mutantes *nitM* y mutantes *nit1/3* en Czapeck. Se observa la formación de un micelio denso en el área donde se entrecruzan los aislados del mismo VCG.

### 3.1.6. Análisis estadístico de los datos

Para poder realizar el análisis de los datos obtenidos estos se estratificaron en poblaciones definidas por el momento de muestreo, denominadas respectivamente muestreo 1, para los aislados obtenidos entre los años 2004 y 2011, y muestreo 2 para los aislados obtenidos entre los años 2018 y 2021. A su vez estos muestreos se subestratificaron en función del origen geográfico de los aislados (Galicia, Asturias y País Vasco) (**Tabla 2**). Además, se determinaron los VCGs de los aislados del muestreo 1, los cuales no se habían identificado previamente, y que además se habían recolectado en otras regiones (Cantabria y Castilla y León) (**Tabla 2**) no muestreadas en el muestreo 2.

La diversidad genética se estimó mediante marcadores moleculares basándose en el número de alelos y las frecuencias alélicas para cada *locus* SRR. Para cada aislado, se definió un MLG combinando el número de repeticiones en los alelos de cada *locus* SSR. Se utilizó la terminología publicada en Berbegal et al., 2013 para los MLGs previamente identificados, denominándose de igual manera que en este trabajo. Además, el análisis de datos se realizó para la totalidad del conjunto de los aislados, es decir, incluyendo aislados clonales, y para el conjunto de datos una vez efectuada la corrección clonal, con un solo aislado por MLG y muestreo.

El análisis de datos se realizó en su mayoría utilizando el software R (versión 4.2.0), utilizando los paquetes *adegenet* (Jombart, 2008) y *poppr* (Kamvar et al., 2014). Con el objetivo de evaluar si los marcadores utilizados tenían la suficiente variabilidad para identificar todos los MLG en el conjunto de datos se creó una curva de acumulación de genotipos. Además se calculó el índice de Shannon-Wiener (H) (Shannon, 2001), el índice de Stoddart y Taylor de diversidad genotípica (G) (Stoddart & Taylor, 1988) y la uniformidad ( $E_5$ ) (Grünwald et al., 2003; Ludwig & Reynolds, 1988; Pielou, 1975). Estos, se utilizaron con el fin de estimar la diversidad de los MLGs (Arnaud-Haond et al., 2007) teniendo en cuenta la clonalidad de las poblaciones. La riqueza genotípica se calculó utilizando el número esperado de haplotipos (eMLG) basado en las curvas de rarefacción (Grünwald et al., 2003), ya que este método permite comparar distintas poblaciones cuando el tamaño de estas difiere entre sí. Además, se utilizó el índice estandarizado de asociación ( $\bar{r}_d, 0-1$ ) (Agapow & Burt, 2001), en lugar del índice de asociación ( $I_A$ ) (Brown et al., 1980), ya que este no está tan influenciado por el número de *loci* utilizados en el análisis. El test de significación para la hipótesis de  $\bar{r}_d = 0$  (valor cuando la población está bajo apareamiento aleatorio y los alelos en diferentes *loci* no están ligados) se basa en la distribución esperada de *loci* no vinculados utilizando 1000 permutaciones.

Para representar las relaciones entre haplotipos, se construyeron dendrogramas Neighbor-joining (NJ) y Minimum spanning network basados en la distancia genética de Bruvo (Bruvo et al., 2004) con un Bootstrap de 1000 permutaciones. Paralelamente, se realizaron dos tests más para evaluar la ocurrencia de reproducción sexual. En primer lugar, se probó la hipótesis nula para el ratio de tipos de apareamiento, siendo este 1:1 en el caso de un apareamiento aleatorio. Para esto, se calculó la probabilidad teórica del resultado observado utilizando una distribución de probabilidad binomial de la hipótesis nula, con  $p = q = 0,5$ , rechazándose la hipótesis nula cuando  $p < 0,05$ . Esto se hizo en lugar de realizar un test de chi-cuadrado debido a que la frecuencia observada en algunos tipos de apareamiento es inferior a cinco. En segundo lugar, se estudió el peso de la reproducción sexual en la diversidad genética observada. Para esto, se utilizó el software *MLGsim 2.0* (<https://www.rug.nl/research/gelifes/tres/software>, consultado el 10 de octubre de 2022), con el fin de comprobar si dos aislados que poseen haplotipos idénticos surgen de forma independiente mediante el apareamiento aleatorio ( $P_{sex}$ ), basándose en una simulación con 1000 permutaciones.

Se estimó la diferenciación genética entre subpoblaciones utilizando el paquete de R *rmmmod* (Winter, 2012) utilizando el índice estandarizado de Hedrick ( $G'st$ ) (Hedrick, 2005), el cual no está influenciado por los niveles de variación genética interna. También se utilizó el método de análisis de varianza molecular (AMOVA) con el fin de estimar la partición jerárquica de la población entre muestreos, entre distintos orígenes geográficos y dentro de cada muestreo y cada región (Excoffier et al., 1992). En este AMOVA, la significación del estadístico phi se basó en 999 permutaciones. Para el estudio de la variación espacial se realizó un test de Mantel con el objetivo de analizar la correlación existente entre la distancia geográfica (calculada como la distancia euclídea entre las coordenadas geográficas donde se recolectaron los diferentes aislados) y la distancia genética de Bruvo. Este test se ejecutó mediante el software R y el paquete *ade4* (Dray & Dufour, 2007) utilizando la función *mantel.randtest* y su significación se basó en 9999 permutaciones. Este, además, se realizó entre las regiones dentro de cada muestreo y entre los dos muestreos. Por último, los migrantes entre poblaciones se analizaron mediante el software *Bayesass* v. 3.4 (Wilson & Rannala, 2003). Los valores finales de los parámetros utilizados, establecidos mediante un proceso iterativo, fueron:  $a$  (tasa de migración) = 0,5,  $f$  (frecuencia alélica) = 1 y  $m$  (coeficiente de endogamia) = 0,1, lo que arroja un ratio de aceptación de 0,48, 0,56 y 0,65. Este último no se pudo reducir a los valores recomendados (20%-60%), probablemente debido al pequeño número de muestras. Las estimaciones del número de migraciones se calcularon mediante el algoritmo de Monte Carlo basado en las cadenas de Markov.

### **3.2. Efecto de la resina de *Pinus pinaster* y *Pinus radiata* en el crecimiento de *Fusarium circinatum***

#### **3.2.1. Material vegetal y fúngico, inoculación y extracción de la resina**

Las plántulas de *P. pinaster* (Sierra Gredos ES-26-06) y *P. radiata* (ES Monte Vasco Navarro) se obtuvieron de un vivero comercial. En el momento de la inoculación tenían 11 meses de edad y se mantuvieron en una cámara de crecimiento (Fitotron, Weiss Gallenkamp) a 24 °C con 12 h de luz durante el experimento.

Para la inoculación se utilizó un aislado virulento de *F. circinatum* (CECT 20759). Además, se evaluó el crecimiento de aislados de otros hongos en presencia del extracto en hexano de la resina constitutiva de *P. pinaster* y *P. radiata*. Estos

hongos fueron *Ophiostoma minus* (Hedgc.) Syd. & P. Syd. (hongo del azulado en *Pinus*) (ID n° 259 almacenado en ICIFOR, INIA-CSIC, España), *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai) Crous & W. Gams, (patógeno de la vid) (Filamentous Fungi Database: CBS 229.95) y *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud, (endófito de *Pinus*) (Filamentous Fungi Database: CBS 621.80). Con el fin de obtener esporas de los aislados, se cultivaron en placa Petri con medio PDA durante 7-10 días a una temperatura de 20°C en oscuridad. La suspensión de esporas se preparó en agua destilada estéril raspando la superficie de la placa, filtrando la suspensión a través de lana de vidrio y estimando el número de esporas en un hematocitómetro. La suspensión de esporas se ajustó a  $5 \times 10^5$  esporas/ml.

Las resinas constitutiva e inducida se obtuvieron respectivamente, de plántulas sanas e infectadas con *F. circinatum*. Las plántulas se aclimataron durante una semana antes de proceder con la inoculación. Para hacer ésta, se cortaron los dos primeros centímetros del ápice y se depositó en la herida una gota de 2 µl de la suspensión de esporas (1000 conidias) con una micropipeta. Las plántulas se cubrieron con una bolsa plástica durante 24h para mantener la humedad y favorecer el proceso infectivo. Para la extracción de resina se utilizaron un total de 48 plántulas de *P. pinaster* y *P. radiata*. La mitad de ellas fueron inoculadas con el patógeno, mientras que la otra mitad no recibió tratamiento. Se utilizaron tres réplicas biológicas (BR) por grupo (sanas e inoculadas), constituidas por ocho plántulas cada una. Para la extracción se cortaron los 1,5 cm superiores del tallo y se congelaron inmediatamente a -80°C hasta su uso. La longitud final de la lesión se midió antes de recolectar las plantas a los 20 dpi.

Para la extracción de resina, el material vegetal se trituró en nitrógeno líquido usando un mortero siguiendo las instrucciones de Sampedro et al., 2010 con modificaciones. Se extrajeron 200 mg del tejido triturado durante 24 h en 1 ml de hexano (Sigma-Aldrich) a 4 °C. El extracto se utilizó para el análisis de terpenos neutros volátiles (MTs, STs y DTs). Posteriormente, el sedimento se resuspendió en 1 ml de hexano. El sobrenadante se secó bajo un flujo de N<sub>2</sub> y el extracto seco se diluyó en 1 ml de metanol, el cual contenía los DRAs.

En resumen, la resina se extrajo de cada replica biológica de *P. pinaster* y *P. radiata* a los 20 dpi. La resina constitutiva proviene del conjunto de plántulas sanas, mientras que la resina inducida proviene del conjunto de inoculadas con *F. circinatum*. Para cada tipo de resina se obtuvieron dos extractos, uno en hexano (que contiene MTs, STs y DTs) y otro en metanol (con DRAs).

### 3.2.2. Medida del crecimiento de *Fusarium circinatum*

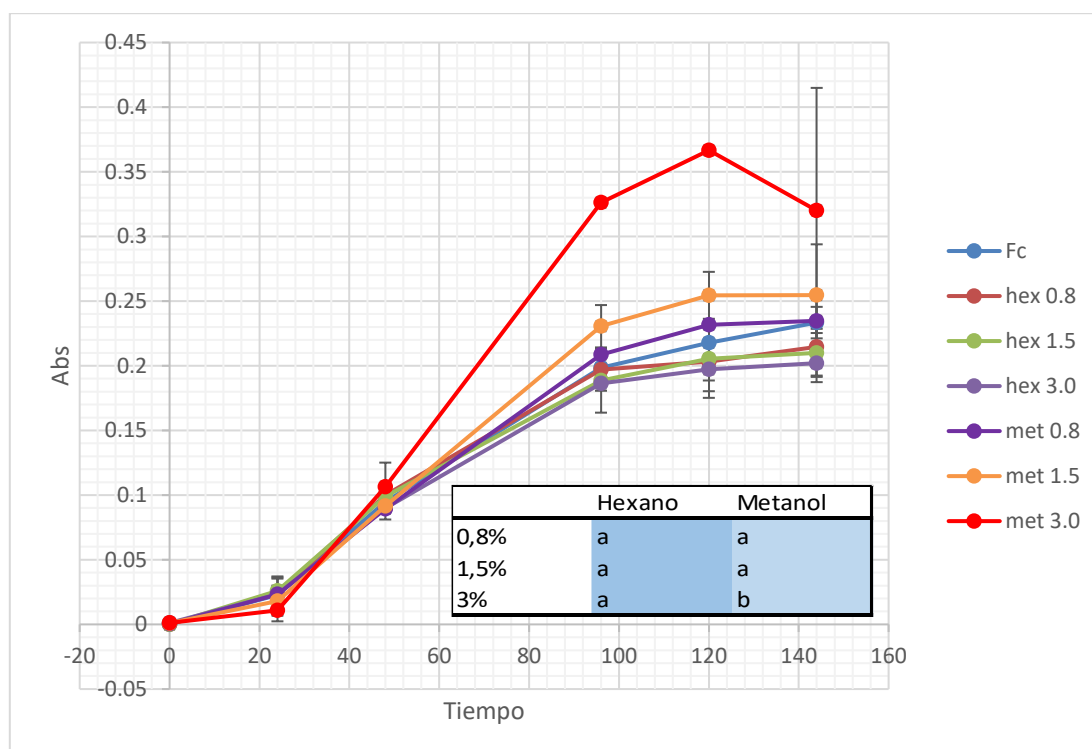
El efecto de la resina constitutiva e inducida en el crecimiento de *F. circinatum* se midió espectrofotométricamente con un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo Fisher), utilizando la absorbancia a 570 nm como indicador de la biomasa fúngica (Pinilla et al., 2022).

Para la puesta a punto del método, se evaluaron los siguientes parámetros: La concentración inicial de esporas, el medio de cultivo y la adición o no de aceite mineral. Además, se evaluó el crecimiento del hongo en el medio seleccionado suplementado con hexano o metanol en distintas concentraciones con el fin de determinar la concentración en el que estos disolventes no afectan al crecimiento del patógeno.

Finalmente se utilizó una microplaca (PS U96 estéril, Fisher Scientific) cuyos pocillos se llenaron con un volumen final de 150  $\mu$ l, que contenía: medio de crecimiento basado en peptona (1 g/l de peptona, 1,05 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 g/l  $\text{NaNO}_3$  y 0,1 g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); 10 esporas/ $\mu$ l de una suspensión fúngica obtenida de cultivo de hongo crecido durante 10 días en PDA; y 0,8%, 1,5% o 3% del extracto de la resina, disuelta en hexano o en metanol en función de la fracción analizada (MTs, STs y DTs en hexano y DRAs en metanol). Finalmente, solamente se utilizaron las concentraciones 0,8% y 1,5% con el extracto en metanol y 0,8%, 1,5 y 3% con el extracto en hexano. La concentración del disolvente metanol al 3%, sin la resina, afectaba al crecimiento del hongo (**Figura 13**).

Los pocillos se cubrieron con 37,5  $\mu$ l de aceite mineral (Sigma-Aldrich) para evitar la evaporación de los terpenos. Para cada muestra se ensayaron 4 réplicas técnicas y cada extracto de resina se evaluó en dos bioensayos independientes. Las microplacas se incubaron bajo agitación (agitador orbital ELMi DOS-20L) a 130 rpm con una temperatura de 25°C en oscuridad. La medición final de absorbancia fue a las 144 h (6 días). Antes de medir la absorbancia, la placa se agitó a velocidad media durante 5 segundos, seguido de una pausa de 2 segundos. Los datos se registraron utilizando el software Skanlt 4.0 proporcionado por el fabricante y se exportaron a Excel (Microsoft Office 2016, Washington, EE. UU.). Los controles se prepararon reemplazando el extracto de resina por el disolvente respectivo (hexano o metanol) en los pocillos. Además, se utilizaron réplicas que contenían las esporas de los hongos muertas (después de 3 h bajo luz ultravioleta) con el fin de eliminar el posible efecto en la turbidez del inóculo sin crecimiento. La lectura de la absorbancia de estas réplicas se utilizó para corregir la medida en las réplicas

donde crecían los hongos en presencia de la resina. Por tanto, los valores finales de absorbancia de una réplica se calculan como la diferencia de lecturas con esporas vivas menos las obtenidas con esporas muertas. El porcentaje de biomasa fúngica se calculó sobre el promedio de control del disolvente respectivo (que se calculó como la diferencia de lecturas de absorbancia en un tiempo dado menos las lecturas en el momento 0).



**Figura 13.** Crecimiento de *F. circinatum* en medio basado en peptona y en presencia de hexano y metanol a las concentraciones del 0,8, 1,5 y 3%, utilizadas posteriormente para analizar el efecto de la resina. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar. Se incluye la significancia de los valores de absorbancia entre el crecimiento del hongo sin disolvente y el crecimiento con el disolvente a las concentraciones utilizadas

Por último, se estudió el efecto de alguno de los terpenos constituyentes de la resina más abundantes (Arrabal et al., 2002; Slinski et al., 2015) en un gradiente de concentración de hasta el 4%. Los terpenos elegidos fueron  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol, citronelol y timol (todos en el grupo MTs), beta-elemeno, isolongifoleno (grupo STs) y ácido 15-hidroxidehidroabiético (DRA), también se estudió el efecto del isoeugenol, un fenilpropanoide derivado del eugenol. Se obtuvieron las curvas de crecimiento a lo largo del tiempo para *F. circinatum* en un medio basado en peptona y suplementado con diferentes concentraciones (0, 0,5, 1, 2, 3, 4%) de cada terpeno disuelto en DMSO. El crecimiento fúngico se midió de igual manera que lo descrito anteriormente.

### 3.2.3. Análisis estadístico

El efecto de la resina sobre la biomasa fúngica se analizó utilizando el software SAS Studio 3.8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.). Las lecturas de absorbancia a los 6 días se analizaron para cada extracto mediante un modelo mixto que incluía como factores fijos 'tipo de resina' (constitutiva e inducida de *P. pinaster* y *P. radiata*, y disolvente como control), 'concentración de resina' (0,8 y 1,5% para metanol y 0,8%, 1,5% y 3% para hexano), y su interacción. La microplaca se trató como un factor de agrupación de efectos aleatorios, ya que cada placa se llenó con un tipo de resina. Las comparaciones por pares de las medias de mínimos cuadrados para todos los efectos se realizaron utilizando un test de Tukey a un nivel de significación de 0,05. La repetición del experimento no mostró diferencias significativas, por lo que los datos de ambos bioensayos se combinaron en el análisis.

Se estudió el efecto de la resina constitutiva disuelta en hexano (a una concentración del 3%) sobre el crecimiento de otros hongos en una microplaca para cada especie de pino, y los resultados se analizaron de igual manera que lo descrito anteriormente. Solo se estudió el efecto del extracto en hexano puesto que el metanol al 3% afectaba al crecimiento de los hongos. El efecto sobre el crecimiento de *F. circinatum* de terpenos específicos disueltos en DMSO se analizó en un ANOVA, con la concentración de terpenos (0, 0,5, 1, 2, 3 y 4%) como único factor. Los valores medios de absorbancia se compararon mediante un test de Tukey de comparación múltiple.

## 3.3. Respuesta defensiva de *Pinus pinaster* y *Pinus radiata* frente a *Fusarium circinatum*

### 3.3.1. Material vegetal, inoculación y extracción de la resina

Se utilizaron plántulas de *P. pinaster* y *P. radiata* de la misma procedencia y edad que las usadas anteriormente. Las plántulas se mantuvieron en un invernadero de bioseguridad P2 a 18-22°C durante todo el experimento.

Para las inoculaciones se utilizaron dos aislados de *F. circinatum* (aislados con números de referencia 7 (CECT 20759) y 26). Estos aislados se obtuvieron entre los años 2004 y 2011 de la zona norte de España y se almacenaron a -20°C en papel de filtro colonizado (Whatman n°1). Las suspensiones de esporas se realizaron según lo descrito en Elvira-Recuenco et al., (2021) y la inoculación se realizó según

lo descrito en Hernandez-Escribano et al., (2020). Los controles se inocularon con una gota de agua. Los tratamientos aplicados fueron: inoculación con los aislados 7 y 26 (I7, I26) de *F. circinatum*, inoculación con agua estéril (MI) y plantas sin herida (UW). Se midió la longitud final de la lesión antes de recolectar las plantas a los 12 y 19 días después de la inoculación (dpi). Para el análisis del perfil terpénico, se utilizaron tres replicas biológicas constituidas cada una por un conjunto de ocho plantas. Se cortaron los 1,5 cm superiores del tallo y estos se conservaron inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para el estudio de la anatomía se recolectaron 5 plantas por tratamiento y por dpi, en estas se cortaron los 2,5 cm superiores, eliminando las acículas y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La extracción de la resina se realizó siguiendo el método descrito anteriormente. Además, con el fin de poder realizar la posterior cuantificación de los distintos terpenos se añadió  $0,025\text{ mg mL}^{-1}$  de ácido heptadecanoico (Sigma-Aldrich, Misuri, EE.UU.),  $0,0225\text{ mg mL}^{-1}$  de isobutilbenceno y  $0,025\text{ mg mL}^{-1}$  de heptadecano (Honeywell Fluka) como estándares internos. El sobrenadante se utilizó para el análisis de terpenos volátiles (mono, sesqui y diterpenos neutros). Para el análisis de diterpenos ácidos, el sedimento se secó bajo un flujo de  $\text{N}_2$  y el extracto seco fue redissuelto en metanol con hidróxido de tetrametilamonio 1:10 (v/v) (TMAH, Sigma-Aldrich, Misuri, EE.UU.), como agente de metilación.

### **3.3.2. Respuesta anatómica**

#### **3.3.2.1. Estudio anatómico de los canales resiníferos**

Se realizó un estudio anatómico de los canales resiníferos de 80 plántulas de *P. pinaster* y *P. radiata* (40 de cada especie), tratadas e inoculadas de igual manera que para la extracción de la resina (plántulas inoculadas con el aislado 7, inoculadas con el aislado 26, con herida inoculadas con agua y plántulas sanas) y recolectadas a los 12 y a 19 dpi.

Se cortaron secciones del ápice del tallo de 2,5 cm de longitud (5 réplicas por tratamiento) eliminando las acículas en el momento de la recolección. El material vegetal se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Una vez descongeladas las muestras, se eliminó la zona necrosada y se utilizó el tejido vegetal inmediatamente posterior.

La preparación de las muestras para su posterior observación en el microscopio óptico se realizó siguiendo el protocolo de Ferriz et al., (2023). En primer lugar, se

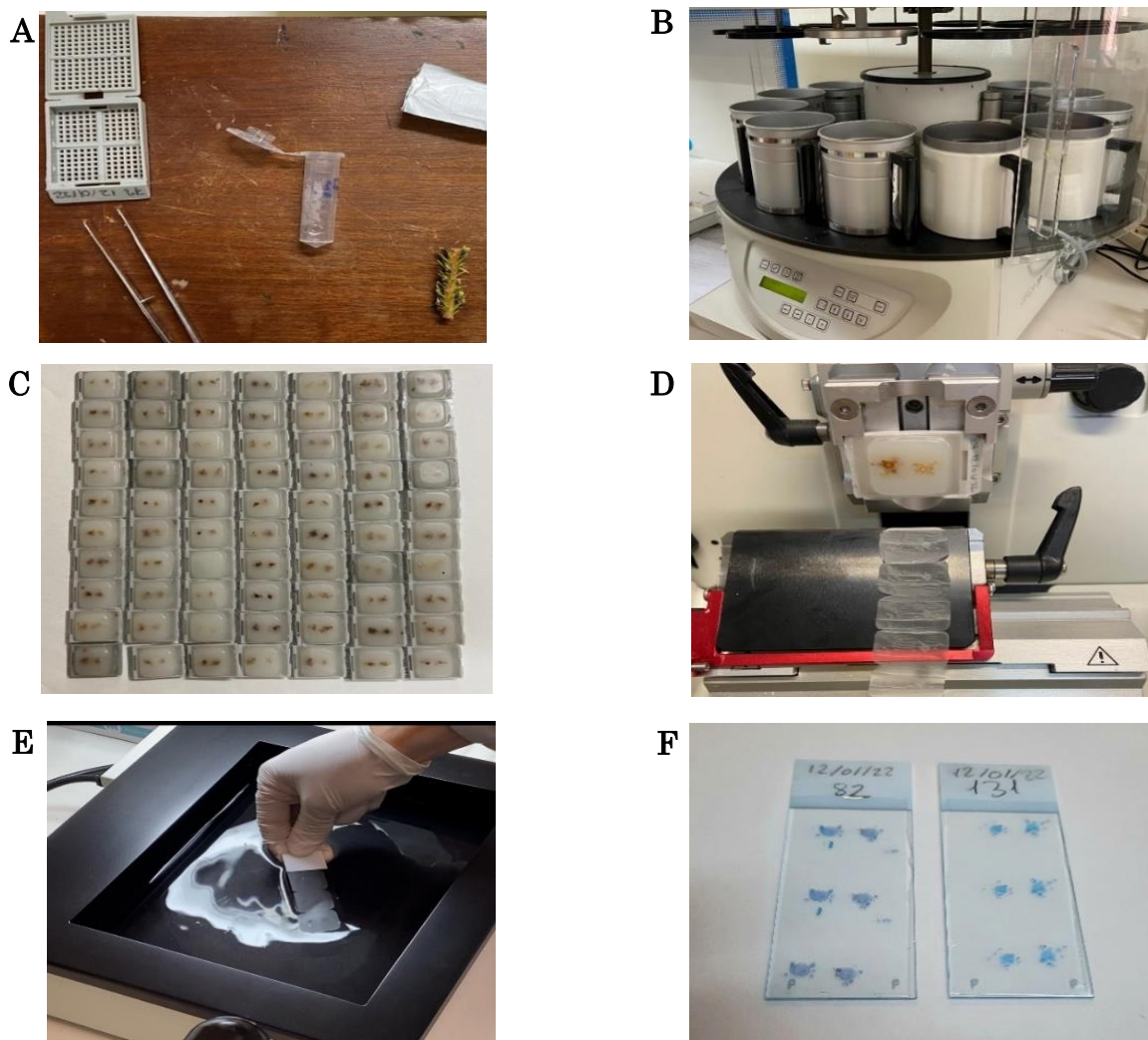
introdujeron en un procesador de tejidos (LEICA TP1020) para su deshidratación en series progresivas de etanol (70%-100%) seguido de xileno y parafina líquida según la siguiente tabla (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Proceso secuencial de deshidratación e inclusión en parafina del material vegetal

<b>Etapa</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Tiempo de inmersión</b>
1 <sup>a</sup>	Etanol 70%	2 horas
2 <sup>a</sup>	Etanol 70%	2 horas
3 <sup>a</sup>	Etanol 90%	1 hora y 30 minutos
4 <sup>a</sup>	Etanol 90%	1 hora y 30 minutos
5 <sup>a</sup>	Etanol 96%	1 hora y 30 minutos
6 <sup>a</sup>	Etanol 100%	1 hora y 30 minutos
7 <sup>a</sup>	Etanol 100%	1 hora y 30 minutos
8 <sup>a</sup>	Xileno	1 hora y 30 minutos
9 <sup>a</sup>	Xileno	1 hora y 30 minutos
10 <sup>a</sup>	Parafina (al vacío)	2 horas
11 <sup>a</sup>	Parafina (al vacío)	2 horas

Una vez realizado este proceso, las muestras se embebieron en bloques de parafina (Estación LEICA Arcadia H) y una vez desbastados, se introdujeron en agua destilada en una estufa a 30°C durante 24 horas para reblandecer los tejidos. Utilizando un micrótopo de rotación (LEICA RM2235) se cortaron secciones transversales de 12µm y se tiñeron con una mezcla de Safranina y Azul Astra para diferenciar el tejido lignificado (teñido de color rojo) del no lignificado (teñido de color azul). Por último, las láminas obtenidas se montaron en portaobjetos con pegamento Eukitt (**Figura 14**).

Las secciones se escanearon con un aumento de 200x utilizando una cámara digital (LEICA DMC 5400) acoplada a un microscopio óptico (LEICA DM6 B). Las imágenes obtenidas se procesaron mediante el software ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA). Se midió el área del tallo, el área del xilema y del córtex, así como el número y área de canales resiníferos (considerando las células acompañantes) del xilema y del córtex.



**Figura 14.** Proceso de preparación de muestras. A: Material vegetal de partida. B: Procesador de tejidos. C: Muestras embebidas en bloques de parafina. D: Corte de secciones transversales en el micrótopo de rotación. E: Montaje de las secciones en el portaobjetos. F: Muestras teñidas

### 3.3.3. Respuesta del perfil terpénico frente a *Fusarium circinatum*

#### 3.3.3.1. Análisis GC-MS del perfil terpénico de la resina

Los terpenos se analizaron, identificaron y cuantificaron por GC-MS. Este análisis se realizó con el instrumento GC Agilent 6890N (California, EE.UU.) equipado con un espectrómetro de masas cuadrupolo Agilent 5973N. Se usó una columna capilar DB-5MS+DG (30 m x 0,25 mm, espesor de película de 0,25  $\mu\text{m}$ , Agilent) con helio como gas portador. Las condiciones cromatográficas son las descritas en Fernández de Simón et al., (2017): temperatura del inyector, 260  $^{\circ}\text{C}$ ; temperatura de la

columna, 60 °C durante el período de división (2 min, 5:1) seguido de un calentamiento gradual de 4 °C min<sup>-1</sup>, a 272 °C (mantenido durante 10 min) con un caudal constante de 1 ml min<sup>-1</sup>; Línea de transferencia MSD, 290 °C (fuente MS a 230 °C y cuadrupolo del MS a 150 °C); la detección se realizó mediante el modo de impacto de electrones con una energía de ionización de 70 eV en un rango de m/z 35–400. Para el extracto trimetilsililado (ácidos resínicos) utilizamos el método de Fiehn preprogramado, suministrado en el software Agilent G1676AA Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library (2013). Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura del inyector, 250 °C; temperatura de la columna, 60 °C durante el período de división (1 min, 10:1), y calentamiento posterior a razón de 10 °C min<sup>-1</sup>, a 325 °C (mantenido durante 10 min); caudal constante de 0,8 ml min<sup>-1</sup>; Línea de transferencia MSD, 290 °C (fuente MS a 230 °C y cuadrupolo MS a 150 °C); la detección se realizó mediante el modo de impacto de electrones con una energía de ionización de 70 eV en un rango de m/z 50–600. Los compuestos se identificaron comparando su índice de retención (RI) y patrones de fragmentación de MS con una biblioteca de referencia interna construida con cerca de 300 estándares comerciales y analizada en las mismas condiciones. Las bibliotecas comerciales de MS (Agilent Fiehn GC–MS Metabolomics RTL Library, Wiley7/Nist17.L GC/MS Library y Adams, 1989) coinciden con más del 95% de los datos existentes en la literatura. Para la cuantificación se usó el método de estándares internos, con áreas de pico obtenidas de iones seleccionados. Se realizaron calibraciones utilizando compuestos de referencia puros, los cuales se analizaron en las mismas condiciones que las usadas para calcular las concentraciones de los terpenos individuales.

### 3.3.3.2. Análisis estadístico cuantitativo y cualitativo de la resina

Para el análisis estadístico de la resina las cantidades de los terpenos individuales se sumaron dentro de cada grupo (MTs, DTs, STs y DRAs) y se construyó un modelo mixto estimando el efecto de la especie de planta (*P. pinaster* o *P. radiata*), de los distintos tratamientos (I7, I26, MI, UW) y dpi (12 y 19 dpi). Para este modelo, todas las variables se consideraron como factores fijos y se incluyeron las interacciones de dos y tres términos. Las comparaciones por pares de medias de mínimos cuadrados para todos los efectos se realizaron mediante un test de Tukey con un nivel de significancia del 0,05. Además, las diferencias entre I7 y I26 así como la triple interacción no fueron significativas en el modelo, por lo que no se

consideraron finalmente. Este análisis se realizó mediante el software SAS Studio 3.8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.).

Para identificar los terpenos discriminantes se utilizó como punto de partida un Análisis de Componentes Principales (PCA), para confirmar la estructura de clases del conjunto de datos (Worley & Powers, 2015). También se llevaron a cabo métodos supervisados como un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y PLS-DA ortogonal (OPLS-DA) con el fin de encontrar los terpenos característicos altamente correlacionados con la separación de clases. La validación del modelo se evaluó con el estadístico  $Q^2$ , el cual es una estimación de la capacidad predictiva del modelo y se calcula mediante validación cruzada (CV). Los terpenos discriminantes en la separación de las clases se eligieron en función de la variable de importancia en la proyección (VIP) en el modelo PLS-DA. En los modelos OPLS-DA, los terpenos discriminantes se seleccionaron mediante el gráfico S-plot. Con el fin de evitar sesgos en su selección, solo se eligieron aquellos terpenos que fueron estadísticamente significativos en la separación de clases y que presentaron una tasa de cambio logarítmica superior a 2 (en valor absoluto). El análisis se realizó con el software Metaboanalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>). Los datos se normalizaron previamente con una transformación logarítmica (en base 10) y un escalado de Pareto para ajustar las diferencias sistemáticas.

### 3.3.4. Respuesta transcriptómica

#### 3.3.4.1. Análisis transcriptómico y RT-qPCR de los genes expresados diferencialmente relacionados con la síntesis de terpenos.

Se identificaron los genes expresados diferencialmente (DEG) codificantes para las enzimas relacionadas con la síntesis de terpenos en plántulas de *P. pinaster* (de siete meses de edad) inoculadas con *F. circinatum*. Esto se hizo a partir del transcriptoma obtenido anteriormente durante la interacción de *F. circinatum* y *P. pinaster* a los 3, 5 y 10 dpi. (acceso a Bioproject con número de referencia PRJNA543723) (Hernandez-Escribano et al., 2020). Estos genes se identificaron mediante una búsqueda de similitud BLAST de las secuencias del transcriptoma contra las secuencias contenidas en la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) de genes codificantes para enzimas relacionadas con la síntesis de terpenos y con las rutas metabólicas responsables de la formación de

sus precursores. Solo se seleccionaron secuencias con más de un 70% de similitud y una cobertura superior al 80%.

Los datos transcriptómicos en *P. pinaster* se validaron mediante una PCR cuantitativa a tiempo real. Para ello, se seleccionaron 15 genes del total de los DEG identificados relacionados con la síntesis de terpenos. Seis de ellos estaban relacionados con la biosíntesis de precursores en las rutas MVA y MEP, 3 con la biosíntesis de MTs, 2 con DTs y 4 con STs. El diseño de los cebadores específicos se realizó mediante el software Primer3Plus v.3.3.0 (**Tabla 6**) (Untergasser et al., 2007). Estos genes también se usaron para medir su expresión en plántulas de *P. radiata* inoculadas con *F. circinatum* a los 5 dpi. Se utilizaron la ubiquitina (UBQ) y la actina (ACT) como genes de referencia para normalizar los perfiles de expresión relativos en *P. pinaster* y *P. radiata*, respectivamente. Además, se comprobó la eficiencia de todos los cebadores y se descartaron aquellos que presentaron una eficiencia inferior al 92%.

El ARN total se extrajo utilizando el kit Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Thorold, Ontario) y se trató con TURBO DNA-free kit (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y conservando el ARN a -80°C hasta su uso. La integridad y concentración del ARN se midieron utilizando un bioanalizador 2100 (Agilent Technologies). La qPCR se realizó en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems, CA, EE. UU.) con el método de detección SYBR Green (NZYSpeed qPCR Green Master Mix 2x; Nzytech, Lisboa, Portugal). El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total y se amplificó en un volumen total de 20 µl utilizando el kit Iscript biorad RT-qPCR (Bio-Rad, California, EEUU) siguiendo las condiciones del fabricante. Para la qPCR, se añadió una dilución 1:20 de 2 µl de ADNc a 10 µl de mezcla SYBR Green. El programa consistió en un paso de desnaturalización inicial (2 min a 97 °C) seguido de 40 ciclos de desnaturalización (5 segundos a 95 °C), alineamiento y extensión (30 segundos a 60 °C). Finalmente, se realizó una etapa final de extensión (1 min a 60°C), seguida de un último ciclo a 95°C durante 15 segundos. Se utilizaron tres réplicas técnicas por cada tres réplicas biológicas. Los niveles de expresión de los genes se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak & Schmittgen, 2001). La significación de los genes de cada especie de pino se calculó mediante una t-student ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 6.** Cebadores utilizados en el estudio por qPCR de los DEG codificantes para las enzimas relacionadas con la síntesis de terpenos

Grupo	Enzima <sup>b</sup>	Nombre del cebador <sup>a</sup>	Secuencia del cebador
Precusores	GPS	GPP_F	ATGCACTTCTTTCACTGGCC
		GPP_R	CCACCCATAACCCCTTCAGA
	IPPI	IPP1_F	TCAGAAATGCAGCCCAAAGG
		IPP1_R	ATCGGCAACCTCTTCTGGAT
	PMVK	PMVK_F	CTCAGCTTTCAAAGGAGGCC
		PMVK_R	CATGTCTTGCTTGTGCTGGT
	HMGR	HMGR2_F	CAGGAGGAGTTTGAGGAGCT
		HMGR2_R	AAGAAGCCACTTTGCCACAG
	HDR	HDR_F	AAGATTGACTCGTGCAAGGC
		HDR_R	GCGTTTCTTCCTTGTGACCA
	DXR	DXPR1_F	GTTACAACACTGACGGCCTC
		DXPR1_R	AGGTGAGGAGATTCAAGCCA
MTs	MYR	MYR1_F	GGGAGGCTCGGAACCTTATC
		MYR1_R	GATATGACTCTGCCCACCAC
	3CS	3CS_F	G TTCAGGCACCATGTCAATG
		3CS_R	TTGCCCAGAACTAACCTTCG
	aPNS	aPNS2_F	CAGAAGCAGTCAGGAGATGG
		APNS2_R	GCGATCCACTTTGCTTCTTG
DTs	IPMS	IPMS_F	GCTGAGAGAGGTGAAGGTGA
		IPMS_R	CAGTCTCTTGCACTTGTCCG
	LPMS	LMS_F	AATGGGCTGTTCTTCCACAG
		LMS_R	TCGTCCATCACCTTTTCTCC
STs	aFRS	aFRS2_F	TATCGCGAACGTGCTGATAG
		aFRS2_R	ACGCTATCCACCATCCAAAG
	eFRS	eFRS_F	GCAAGCATGTTGAGCCTGTA
		eFRS_R	TTGCTTCTTGTTCCATGCAG
	aBSS	aBSS_F	CGATTGGAGGAGGAGAATCA
		aBSS_R	GAAATTGAGGGCAAGCAGAG
	dSLS	dSLS_F	ATCTTAACGCGACGGCTCTA
		dSLS_R	GCCCTTGAAATTCTCCATCA

<sup>a</sup> F: cebador directo, R: cebador inverso.

<sup>b</sup>GPS: geranil difosfato sintasa; IPPI: isopentenil-difosfato Delta-isomerasa; PMVK: Fosfomevalonato; HMGR: hidroximetilglutaril-CoA reductasa; HDR: 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato reductasa; DXR: 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa; MYR: mirceno sintasa; 3CS: 3-careno sintasa; aPNS: α-pineno sintasa;

IPMS: isopiramadieno sintasa; LPMS: levopimaradieno sintasa; aFRS:  $\alpha$ -farneseno sintasa, eFRS:  $\beta$ -farneseno sintasa; aBSS:  $\alpha$ -bisaboleno sintasa; dSLS:  $\delta$ -selineno sintasa



## 4. Resultados

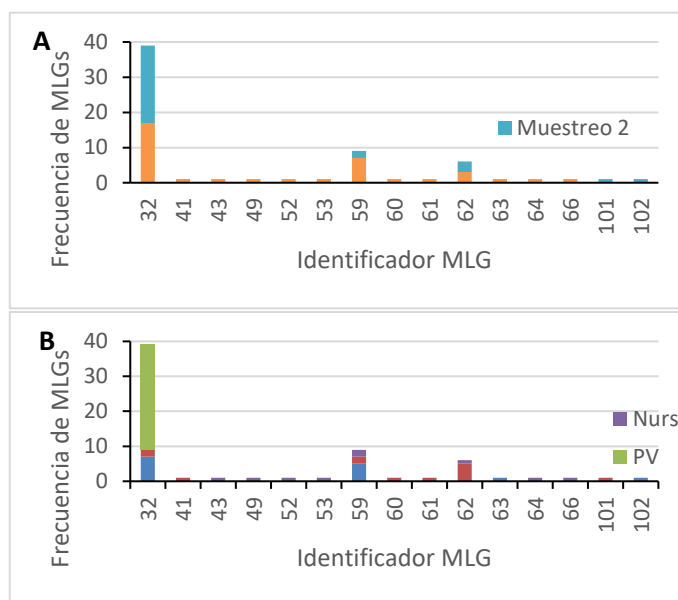
### 4.1. Variación temporal y espacial de la estructura genética de la población española de *Fusarium circinatum*.

#### 4.1.1. Diversidad genética

El haplotipo más frecuente en la población española de *F. circinatum* continúa siendo el MLG32 a pesar de que ha transcurrido un promedio de diez años entre muestreos (**Figura 15**). Este haplotipo está representado por un total de 39 de los 66 aislados totales analizados, es decir, constituye el 59% de los aislados y está presente en todos los muestreos y regiones. El MLG32 es el único haplotipo presente en la región del País Vasco en ambos muestreos, mientras que, en las regiones del noroeste (Asturias y Galicia) los haplotipos prevalentes fueron MLG59 y MLG62. (**Figura 15**). Se han identificado dos haplotipos nuevos en el muestreo 2, denominados MLG101 y MLG102, los cuales están presentes en Galicia y Asturias, respectivamente. Estos haplotipos no se habían detectado previamente ni en vivero ni en las poblaciones de campo muestreadas entre 2004 y 2011. En total, en el segundo muestreo hay 15 MLGs en 66 aislados y solo se encontraron tres haplotipos con una frecuencia superior a uno (**Figura 15**).

Respecto a la diversidad genética, todos los loci presentaron polimorfismo excepto FCM-6, el cual no mostró variación en el número de alelos (**Tabla 7**) y por tanto, no se incluyó en el análisis. Todos los demás loci poseían un número de alelos por locus de 2 a 10 (**Tabla 7**), con un valor medio de 3,3 alelos por locus. Dos de los aislados mostraron un número de secuencias microsatélites repetidas diferente para el mismo locus, uno de ellos en tres loci (FCM-2, FCM-7 y FCM-25) y el otro en un locus (FCM-25) y por tanto, fueron identificados como heterocariones. Cuando se analizaron los dos muestreos estratificados en función de la región, el porcentaje de loci polimórficos fue de un 0% para País vasco, de un 8,6 % para Asturias en el muestreo 1 (1\_Ast) y 71% para todos los demás. Respecto a la diversidad de los loci, el locus FCM-25 mostró la mayor diversidad según lo determinado por el índice de diversidad de Simpson (0,581), aunque disminuye después de realizar la corrección clonal. El locus FCM-7 fue el que estaba distribuido en la población de manera más uniforme ( $E_5=0,961$ ) (**Figura 15**). El índice de diversidad de Simpson aumentó para los loci FCM-7, FCM-19 y FCM-25 después de realizar la corrección clonal. Por

último, el número estimado de loci necesarios para diferenciar haplotipos en una población aleatoria es de cinco, según la curva de acumulación de genotipos (**Figura 16**), lo que indica que el análisis realizado en este caso, que es con 7 loci, es suficiente para poder diferenciar los haplotipos en la población estudiada.



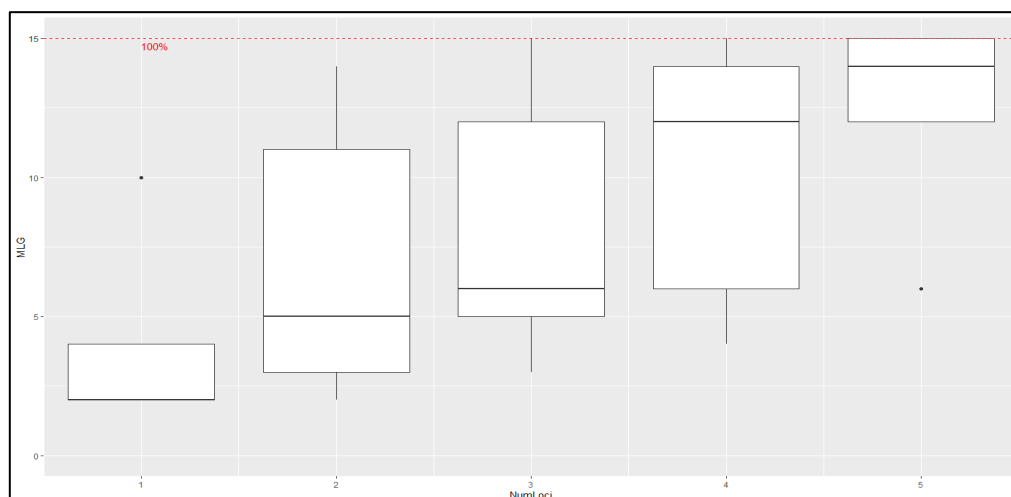
**Figura 15.** Frecuencia de MLGs identificados en la población española de *F. circinatum*. A. Por muestreo. B. Por origen geográfico. Se ha adoptado el número de identificación de cada MLG de Berbegal et al., 2013. MLG 101 y MLG 102 son los nuevos haplotipos detectados en el muestreo 2. Los aislados del muestreo 1 se recolectaron entre los años 2004-2011 y los del muestreo 2 entre los años 2018-2021, obteniéndose de viveros (Nurs), País Vasco (PV), Galicia (Gal) y Asturias (Ast).

**Tabla 7.** Diversidad genética de los siete loci microsatélites (SRR) en la población española de *F. circinatum*

<i>Locus</i>	Número de alelos ( $N_a$ )	Diversidad de Simpson de ( $1-D$ ) <sup>a</sup>	Evenness $E_5^b$
FCM-2	4	0,521	0,807
FCM-4	2	0,030	0,378
FCM-6	1	.	.
FCM-7	2	0,480	0,961
FCM-19	2	0,473	0,949
FCM-25	10	0,581	0,523
FCM-26	2	0,473	0,949
media	3,3	0,371	0,761

<sup>a</sup> Índice de diversidad de Simpson ( $1-D$ )

<sup>b</sup> Índice de Evenness (Grünwald et al., 2003; Ludwig & Reynolds, 1988; Pielou, 1975)



**Figura 16.** Curva de acumulación genotípica. Número de MLGs identificados en función del número de loci muestreados. La distribución para cada boxplot se basa en 1000 permutaciones

Se observó también que la población española de *F. circinatum* presentó una diversidad genotípica baja ( $H=1,16$ ,  $G=2,03$ ) (Tabla 8), así como una baja riqueza ( $eMLG=3,45$ ) y uniformidad ( $E_5=0,47$ ). La diversidad y la uniformidad disminuyeron con el tiempo (los índices  $H$ ,  $G$  y  $E_5$  fueron más bajos en el muestreo 2 en comparación con el muestreo 1), así como la riqueza ( $eMLG=7$  y  $eMLG=5$  en los muestreos 1 y 2 respectivamente). Al incluir el origen geográfico dentro de los muestreos, el  $eMLG$  en Galicia baja de 6 a 3, mientras que en Asturias se mantiene en 3. Los índices  $H$ ,  $G$  y  $E_5$  (Tabla 8) disminuyeron con el tiempo entre regiones. Por el contrario, en el País Vasco sólo se detectó un haplotipo en ambos muestreos (Tabla 8).

**Tabla 8.** Diversidad Genotípica para la población española de *F. circinatum* incluyendo subpoblaciones definidas por escala temporal y geográfica.

Subpop <sup>a</sup>	Tamaño de muestra(N)		MLG N <sup>o</sup> . (MLG)		eMLG N <sup>o</sup> . (eMLG)		Diversidad				Evenness ( $E_5$ ) <sup>e</sup>	
	All <sup>b</sup>	C <sup>b</sup>	All	C	All	C	$H^c$		$G^d$		All	C
1_Gal	8	6	6	6	6	6	1,73	1,79	5,33	6,00	0,93	1,00
1_Ast	5	3	3	3	3	3	0,95	1,10	2,27	3,00	0,80	1,00
1_PV	15	1	1	1	1	1	0	0	1,0	1,0	Nc <sup>f</sup>	nc
1_Survey	28	10	7	7	7	7	1,28	1,83	2,43	5,56	0,57	0,87
2_Gal	5	3	3	3	3	3	0,95	1,10	2,27	3,0	0,80	1,00
2_Ast	9	3	3	3	3	3	0,85	1,10	1,98	3,0	0,73	1,00
2_PV	15	1	1	1	1	1	0	0	1,0	1,0	nc	nc
2_Survey	29	7	5	5	5	5	0,86	1,48	1,69	3,77	0,50	0,82
Total	57	17	9	9	3,45	6,32	1,16	1,93	2,03	5,25	0,47	0,73

<sup>a</sup> Los muestreos 1 y 2 se realizaron entre los años 2004-2011 y 2018-2021 respectivamente. Gal: Galicia, Ast: Asturias, PV: País Vasco

<sup>b</sup> Parámetros calculados para el total de la población (All) y para la población una vez realizada la corrección clonal (C)

<sup>c</sup> H: Índice de diversidad de Shannon-Wiener (Shannon, 2001)

<sup>d</sup> G: Índice de Stoddart y Taylor de diversidad genotípica (Stoddart & Taylor, 1988)

<sup>e</sup> E<sub>s</sub>: índice de uniformidad (Grünwald et al., 2003; Ludwig & Reynolds, 1988; Pielou, 1975)

<sup>f</sup> Nc=No calculado.

### 4.1.2. Reproducción sexual y clonalidad

En las regiones de Asturias y Galicia estuvieron presentes los grupos de apareamiento MAT-1 y MAT-2, mientras que en País Vasco solo se encontró el grupo de apareamiento MAT-2.

Se estimó el modo de reproducción en cada origen geográfico mediante el valor del índice estandarizado de asociación ( $\bar{r}_d$ ), el cual se calculó para el conjunto de datos una vez se hubo realizado la corrección clonal (**Tabla 9**). El valor de este índice bajo la hipótesis nula del desequilibrio de ligamiento (LD) fue significativamente diferente de 0 en Galicia en los muestreos 1 y 2, y en Asturias en el muestreo 2, rechazando así la reproducción sexual en estas regiones. Sin embargo, esto no se puede confirmar analizando las proporciones observadas de MAT-1 y MAT-2. Para Asturias y Galicia, las proporciones en el muestreo 1 fueron 5:1 y 2:1, respectivamente y de 2:1 para ambas regiones en el muestreo 2 (**Tabla 9**). Las proporciones observadas una vez realizada la corrección clonal no resultaron significativamente diferentes de 1:1 (**Tabla 9**), siendo lo esperado cuando ocurre reproducción sexual.

Los resultados de los cálculos de  $P_{sex}$  (**Tabla 10**) tampoco son del todo concluyentes respecto a la ausencia de reproducción sexual. De acuerdo con este valor, la probabilidad de que dos individuos compartan el haplotipo MLG62 (para aislados de ambos muestreos) o el haplotipo MLG59 (para aislados del muestreo 2), suponiendo un apareamiento aleatorio, no es significativamente baja ( $P < 0,05$ ) y no puede rechazarse. En cambio, esto no se puede concluir para el MLG32, el haplotipo mayoritario y único en País Vasco, donde la población claramente es exclusivamente clonal.

**Tabla 9.** Índice estandarizado de asociación ( $\bar{r}_d$ ) y proporción de los grupos de apareamiento en las subpoblaciones españolas de *F.* estratificada temporalmente y por origen geográfico, calculados para los datos una vez realizada la corrección clonal.

Subpop.	Proporción de los grupos de apareamiento <sup>a</sup>		$\bar{r}_d$	
	C	P <sup>b</sup>	C	P-value <sup>c</sup>
Muestreo 1				
-Galicia	5:1	0,094	0,439	<b>0,002</b>
-Asturias	2:1	0,375	0,4	0,145
-País Vasco	0:1	0,5	-	-
Muestreo 2				
-Galicia	2:1	0,375	1	<b>0,032</b>
-Asturias	2:1	0,375	1	<b>0,035</b>
-País Vasco	0:1	0,5	-	-

<sup>a</sup> Proporción de los grupos de apareamiento MAT-1:MAT-2.

<sup>b</sup> Probabilidad esperada del resultado observado basada en la distribución binomial con  $p=q=0,5$  (hipótesis nula de igual proporción).

<sup>c</sup> Test de significación basado en 1000 permutaciones para la hipótesis nula de no ligamiento entre loci ( $\bar{r}_d=0$ ).

**Tabla 10.** Probabilidad de que un determinado MLG se encuentre en una población con reproducción sexual cuando este se observa más de una vez, para el conjunto de datos con corrección clonal de la población española de *F. circinatum* estratificada temporalmente y por origen geográfico.

Subpop	MLG ID	N <sup>a</sup>	Psex	P-value <sup>b</sup>
1_Gal	59	2	0,09310	0,70819
	62	2	0,02659	0,37201
1_Ast	59	3	0,05078	<b>0,00957</b>
1_PV	32	15	1	
Muestreo 1	32	17	<,000	<b>&lt;,000</b>
	59	7	0,00284	<b>0,02615</b>
	62	3	0,56857	0,79044
2_Gal	62	3	0,00258	<b>0,04528</b>
2_Ast	32	6	4,03E-13	<b>&lt;0,000</b>

	59	2	0,11463	0,67722
2_PV	32	15	1	
Muestreo 2	32	22	<,000	<,000
	59	2	0,69915	0,78199
	62	3	0,42808	0,60250

<sup>a</sup> Numero de MLGs en la población

<sup>b</sup> p-value para la probabilidad de que un MLG determinado se encuentre en una población con reproducción sexual.

### 4.1.3. Estructura genética.

El AMOVA no mostró diferencias entre muestreos ni entre regiones dentro de un muestreo una vez realizada la corrección clonal. Toda la variación procede de dentro de las regiones, lo que sugiere que la población española de *F. circinatum* no está diferenciada (Tabla 11). Todos los valores de *phi* fueron significativamente iguales a 0 (los valores negativos se consideraron como 0), por lo que se concluye que la variación genética no está dividida en función del tiempo o de las regiones. Este patrón de variación cambia cuando se realiza el AMOVA sin realizar la corrección clonal, debido al peso que tiene en el análisis el haplotipo MLG32, ya que es el más abundante y está asociado mayoritariamente a una sola región en ambos muestreos (País Vasco). En este caso, la variación se explica significativamente por las regiones en cada muestreo (78%) y entre las regiones (51%) (Tabla 11), pero no por los distintos muestreos.

**Tabla 11.** Análisis de la variación molecular (AMOVA) para la población española de *F. circinatum* estratificada por muestreos y origen geográfico de los aislados dentro de cada muestreo.

Fuente	df		Suma de cuadrados		Variación (%)		<i>Phi</i>		p-value <sup>b</sup>	
	All <sup>a</sup>	C <sup>a</sup>	All	C	All	C	All	C	All	C
Entre muestreos	1	1	2,26	0,544	-29,39	-4,59	0,49	-0,24	0,79	0,61
-Entre regiones dentro de los muestreos	4	4	65,19	8,79	78,43	-19,15	0,61	-0,18	<b>0,001</b>	0,90
-Dentro de regiones	51	11	58,44	38,67	50,97	123,74	-0,29	-0,05	<b>0,001</b>	0,84

---

Total      56    16    125,9    48      100      100

---

<sup>a</sup> Parámetros calculados para el total de la población (All) y para la población una vez realizada la corrección clonal (C).

<sup>b</sup> p-value es la significación para el estadístico *phi* y está basado en 999 permutaciones

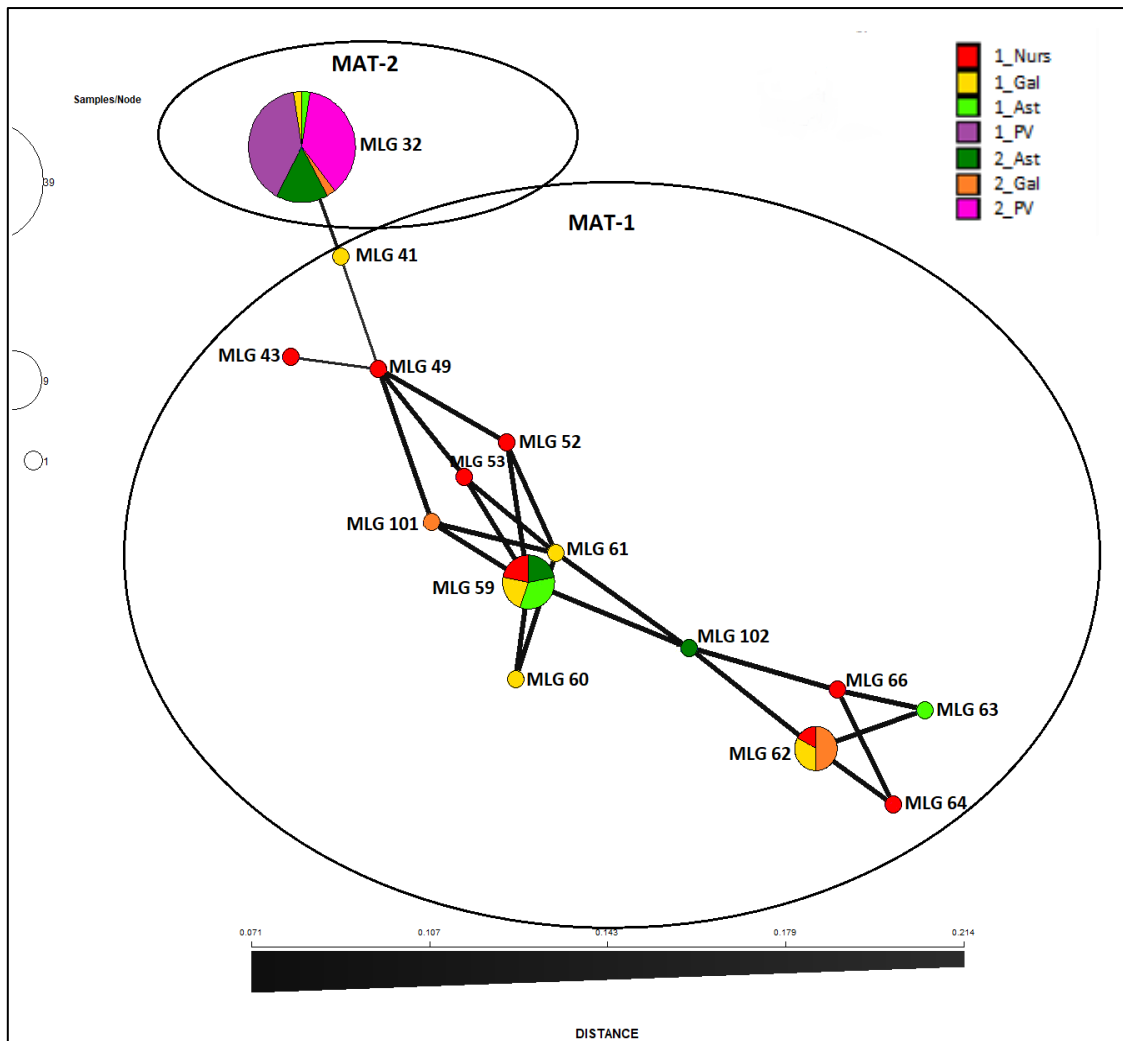
El gráfico minimum spanning network (**Figura 17**), construido también mediante la distancia genética de Bruvo, corroboró que el MLG32 no está relacionado con los otros haplotipos, siendo el MLG41 el más cercano a él. En cambio, el MLG59 está estrechamente relacionado con los haplotipos restantes, incluidos los haplotipos detectados por primera vez (MLG101 y MLG102). Esta estructura poblacional se visualizó mediante un dendrograma NJ utilizando la distancia genética de Bruvo. Este mostró los aislados de *F. circinatum* agrupados sin ambigüedad (valor del Bootstrap del 100%) en dos grupos principales. En uno de ellos se agrupan todos los aislados del MLG32 de ambos muestreos y de todas las regiones geográficas (**Figura 18**).

La comparación de los valores de diversidad genética para pares de poblaciones (índice G'st) (**Tabla 12**) indicó que la población del País Vasco se diferencia de la de Galicia y Asturias (G'st=0,653 y 0,592 para las comparaciones PV-Gal y PV-Ast respectivamente en el muestreo 1 y G'st= 0,610 para ambas comparaciones en el muestreo 2) (**Tabla 12**). La comparación entre las regiones del noroeste, Galicia y Asturias, indica que la diversidad genética es baja y disminuyó en el muestreo 2 (valor de G'st baja de 0,138 a 0), probablemente debido a que en el muestreo 2 los aislados de Asturias están más cerca genéticamente del País Vasco que en el primer muestreo, tal y como se muestra en el dendrograma NJ agrupado por regiones (**Figura 19**).

**Tabla 12.** Índice de Hendrick estandarizado de diversidad genética (G'st) para una comparación por pares de la población española de *F. circinatum* estratificada por muestreos y origen geográfico.

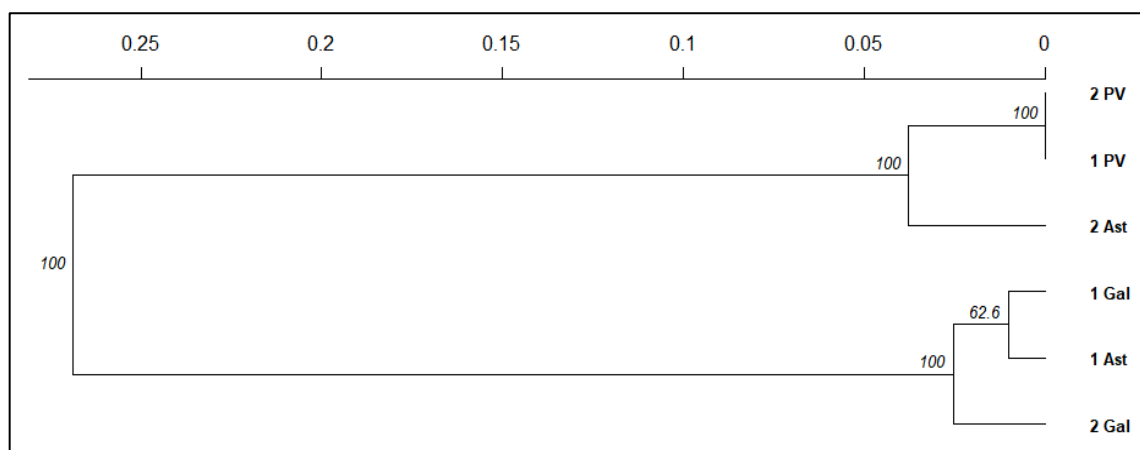
Subpop	1_Gal	1_Ast	1_PV	2_Gal	2_Ast
1_Gal					
1_Ast	0,138				
1_PV	0,653	0,592			
2_Gal	-0,121 <sup>a</sup>	0,198	0,610		
2_Ast	-0,159	-0,198	0,610	-0,172	
2_PV	0,653	0,592	-	0,610	0,610

<sup>a</sup>Los valores negativos se han considerado como 0



**Figura 17.** Minimum spanning network basado en la distancia genética de Bruvo para los haplotipos observados en la población española de *F. circinatum* estratificada por muestreos y origen geográfico





**Figura 19.** Dendrograma NJ basado en la distancia genética de Bruvo de la población española de *F. circinatum* estratificada por muestreo y origen geográfico

El test de Mantel mostró una correlación positiva entre la distancia geográfica y genética entre los aislados ( $p=1,00E-04$ ). La correlación fue significativa entre los aislados de País Vasco y Galicia y País Vasco y Asturias ( $p=2,0E-04$  y  $9,0E-04$  respectivamente), pero no entre las poblaciones de Asturias y Galicia en cualquiera de los dos muestreos ( $p=0,2956$  y  $0,0877$  para el muestreo 1 y 2 respectivamente), corroborando que la población de País Vasco está genéticamente diferenciada de las poblaciones de Galicia y Asturias. No se detectó flujo de genes entre ninguna de las subpoblaciones definidas por el muestreo ni por la región de origen. Según Bayesass (**Tabla 13**), los migrantes solo fueron significativamente distintos de 0 dentro de las subpoblaciones.

**Tabla 13.** Medias de la tasa de migración (e intervalo de confianza del 95%) dentro y entre subpoblaciones de *F. circinatum* en España, estratificadas por escala temporal y geográfica.

	1_Ast	1_Gal	1_PV	2_Ast	2_Gal	2_PV
1_Ast	0,7311 <b>(0,61,0,85)</b>	0,1037 (-0,03,0,24)	0,0334 (-0,03,0,09)	0,0446 (-0,04,0,13)	0,0538 (-0,05,0,15)	0,0334 (-0,03,0,09)
1_Gal	0,0435 (-0,05,0,14)	0,7697 <b>(0,65,0,89)</b>	0,0541 (-0,02,0,13)	0,0351 (-0,04,0,11)	0,0442 (-0,05,0,14)	0,0533 (-0,02,0,13)
1_PV	0,016 (-0,01,0,05)	0,016 (-0,01,0,05)	0,8366 <b>(0,68,0,99)</b>	0,0162 (-0,01,0,05)	0,0158 (-0,01,0,05)	0,0993 (-0,06,0,25)
2_Ast	0,0335 (-0,03,0,10)	0,0582 (-0,02,0,14)	0,0904 (-0,02,0,20)	0,6996 <b>(0,64,0,76)</b>	0,0321 (-0,03,0,09)	0,0862 (-0,03,0,20)
2_Gal	0,0461 (-0,05,0,14)	0,0841 (-0,05,0,21)	0,0454 (-0,03,0,12)	0,0391 (-0,04,0,12)	0,7403 <b>(0,62,0,86)</b>	0,045 (-0,03,0,12)
2_PV	0,016 (-0,01,0,05)	0,0159 (-0,01,0,05)	0,1072 (-0,05,0,27)	0,016 (-0,02,0,05)	0,016 (-0,01,0,05)	0,8288 <b>(0,67,0,99)</b>

#### 4.1.4. VCGs

Se identificaron un total de 11 VCGs (identificados numéricamente del 1 al 11) en los 106 aislados de la población española de *F. circinatum* (Tabla 14). Tres VCGs (VCG 1, 2 y 3) fueron los más abundantes. Los VCGs 1 y 3 incluyeron aislados de ambos muestreos distribuidos en todos los orígenes geográficos, por lo que fueron los grupos mayores. El VCG 2 fue el grupo más abundante para los aislados del muestreo 1 y se distribuyó solamente en las regiones del noroeste. En cambio, cinco VCGs (4, 5, 9, 10 y 11) están constituidos por un solo aislado (Tabla 14). Todos los aislados de los VCG 1 y 3 pertenecen al haplotipo MLG32 y son MAT-2, estando todos incluidos en uno de los dos grupos en los que se estructura la población (Figura 18). No se detectaron heterocariones autocompatibles (Heterokaryon self-compatibility, HIS), ya que los emparejamientos entre mutantes *nit* de un mismo aislado se complementaron siempre.

**Tabla 14.** Grupos de compatibilidad vegetativa y de apareamiento en la población española de *F. circinatum* estratificada en escala temporal y geográfica.

	VCG <sup>a</sup>	Nº de aislados						% isol <sup>b</sup>	Nº reg <sup>c</sup>	Mt typ <sup>d</sup>	Grupo <sup>e</sup>
		Gal	Ast	PV	Cant	CyL	Nurs				
Muestreo 1	1	1	0	9	18	2	0	49,2	4	2	1
	2	4	2	0	0	3	1	16,4	4	1	2
	3	0	0	6	2	0	0	13,1	2	2	1
	4	0	1	0	0	0	0	1,6	1	1	2
	5	0	0	0	0	0	2	3,3	1	1	2
	6	0	0	0	0	0	1	1,6	1	1	2
	7	2	0	0	0	0	4	9,8	2	1	2
	8	1	0	0	0	0	0	1,6	1	1	2
	9	0	0	0	0	0	0	0,0	0		
	10	0	0	0	0	0	1	1,6	1	1	2
	11	0	1	0	0	0	0	1,6	1	1	2
Total	8	4	15	20	5	9	100				
Nº VCG	4	3	2	2	2	5					
Muestreo 2	1	0	2	30	0	0	0	71,1	2	1	2
	2	1	0	0	0	0	0	2,2	1	1	2
	3	1	4	1	0	0	0	13,3	3	1	2
	4	0	0	0	0	0	0	0,0	0		
	5	0	1	0	0	0	0	2,2	1	1	2
	6	0	1	0	0	0	0	2,2	1	1	2
	7	0	1	0	0	0	0	2,2	1	1	2
	8	2	0	0	0	0	0	4,4	1	1	2

9	1	0	0	0	0	0	2,2	1	1	2
Total	5	9	31	0	0	0	100			
Nº VCG	4	5	2	0	0	0				

<sup>a</sup> Los VCGs se han identificado mediante un número del 1 al 11

<sup>b</sup> Porcentaje de aislados de cada VCG en cada muestreo

<sup>c</sup> Numero de regiones en las que se ha encontrado el VCG

<sup>d</sup> Grupo de apareamiento

<sup>e</sup> Grupo en el que un VCG se agrupa según el dendrograma NJ con un valor de Bootstrap del 100% (tal y como se muestra en la **Figura 18**)

#### 4.2. Efecto de la resina de *Pinus pinaster* y *Pinus radiata* en el crecimiento de *Fusarium circinatum*

Tanto la resina constitutiva como la inducida de *P. pinaster* y *P. radiata* estimula el crecimiento del patógeno *F. circinatum* (**Figura 20**). Cuando el hongo crece en presencia del extracto de resina hallamos una absorbancia significativamente mayor respecto al hongo creciendo en el medio con el solvente solo ( $F=146,31$ ;  $p < 0,0001$  y  $F=53,23$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente para los extractos de hexano y metanol). Respecto al extracto de resina de *P. pinaster* en hexano (**Figura 20**), la absorbancia aumenta en comparación a la obtenida en presencia de solo el solvente en un 202 y 168% para la resina constitutiva e inducida, respectivamente, y en un 116 y 202% en *P. radiata* (**Tabla 15**). En el caso del extracto en metanol (**Figura 20**), los incrementos son del 310 y 320 % para la resina constitutiva e inducida de *P. pinaster* y de 258 y 267 % en el caso de *P. radiata* (**Tabla 15**). El efecto de la concentración del extracto sobre el crecimiento de *F. circinatum* también fue significativo ( $F=18,56$ ; valor de  $p < 0,0001$ ), con un mayor efecto en la concentración del 3% que en las concentraciones del 1,5% y 0,8%, las cuales tuvieron efectos similares. sobre el crecimiento. En el extracto en metanol, las comparaciones del tipo de resina de cada especie y la concentración mostraron que solo la absorbancia de la resina inducida de *P. pinaster* al 1,5% fue mayor que la del 0,8% (la interacción entre el tipo de resina y la concentración fue significativa  $p=0,0152$ ).

Comparando el crecimiento del patógeno en la resina constitutiva e inducida por especies se observa que en el extracto en hexano de la resina inducida de *P. radiata* aumenta el crecimiento del hongo en comparación con la resina constitutiva, con un incremento en la absorbancia de  $0,169 \pm 0,0305$  unidades ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 20**), lo que supone un aumento de la biomasa fúngica de un 40%. En cambio, en *P.*

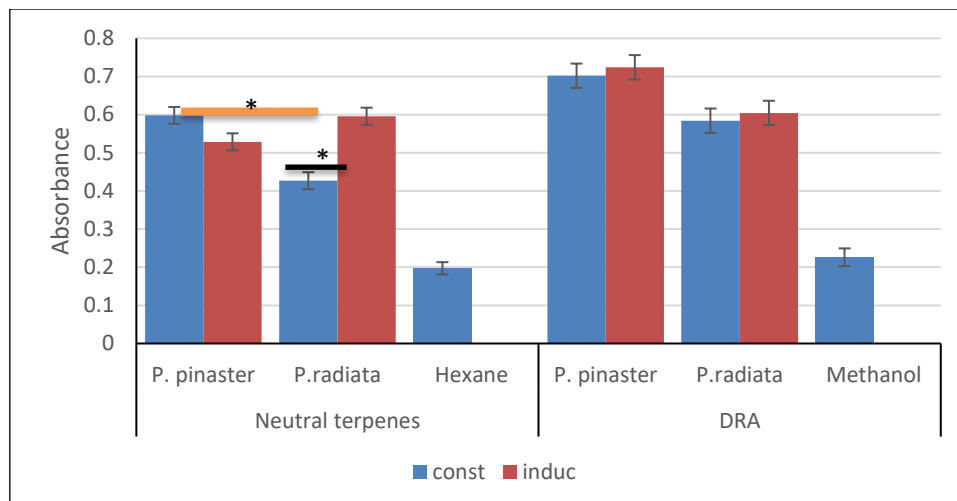
*pinaster* no hubo diferencias significativas en el crecimiento del patógeno entre la resina constitutiva y la inducida, aunque el patógeno creció significativamente menos en el extracto en hexano de la resina constitutiva de *P. radiata* respecto a la constitutiva de *P. pinaster*. El extracto en hexano de *P. radiata* de la resina inducida, el cual contiene MTs, STs y DTs, resulta más adecuado para el crecimiento de *F. circinatum* que el de *P. pinaster*.

**Tabla 15.** Media de mínimos cuadrados de la absorbancia a 597 nm estimadas mediante un modelo mixto para analizar el efecto de la resina constitutiva e inducida de *P. pinaster* y *P. radiata*, a las concentraciones de 0,8, 1,5 y 3% en el crecimiento *in vitro* de *F. circinatum*.

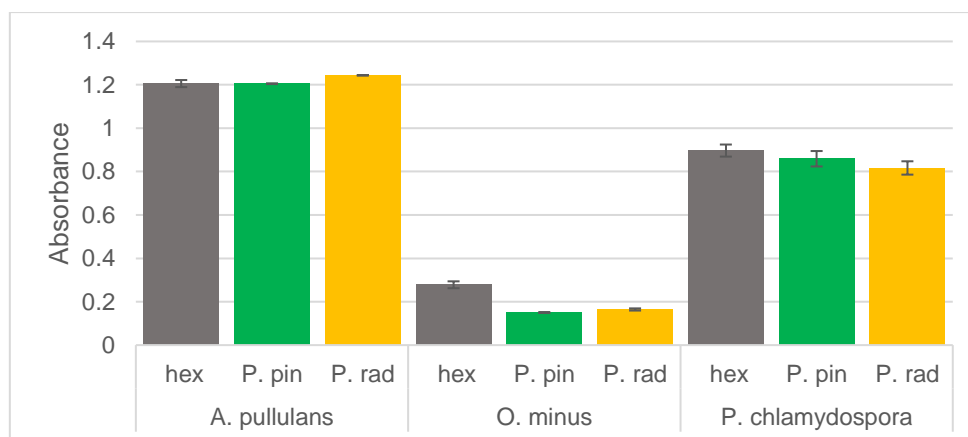
Tipo de resina	Concentración	Hexano		Metanol	
		Media	Error estándar	Media	Error estándar
<i>P. pinaster</i> constitutiva		0,5980	0,02205	0,7020	0,03192
<i>P. pinaster</i> inducida		0,5287	0,02238	0,7242	0,03192
<i>P. radiata</i> constitutiva		0,4267	0,02238	0,5842	0,03192
<i>P. radiata</i> inducida		0,5959	0,02238	0,6044	0,03192
Solvente		0,1973	0,01594	0,2262	0,02314
	3	0,5238	0,01470	n.a. <sup>a</sup>	
	1,5	0,4500	0,01488	0,6085	0,01912
	0,8	0,4342	0,01506	0,5278	0,01912

<sup>a</sup> n.a. no analizado

También se analizó el efecto que tienen los terpenos neutros (MTs, STs y DTs) en otros hongos que tienen otra forma de vida distinta de la de patógeno de pino. Para estos se ensayó el efecto de la resina constitutiva a una concentración del 3% solamente con el extracto de hexano, ya que no se observaron diferencias significativas en el crecimiento del hongo en el extracto en metanol entre la resina constitutiva y la inducida en ninguna especie (**Figura 20**). No se observa ningún efecto sobre la biomasa fúngica en los hongos ensayados, tanto en los que interactúan a lo largo de su ciclo de vida con los pinos, es decir en *Aureobasidium pullulans* y *Ophiostoma minus*, como en el patógeno de vid, *Phaeomonniella chlamidospora*. El análisis estadístico de los valores de absorbancia muestra que la biomasa es similar cuando el hongo crece en presencia de resina respecto a cuando crece en presencia del solvente (**Figura 21**).



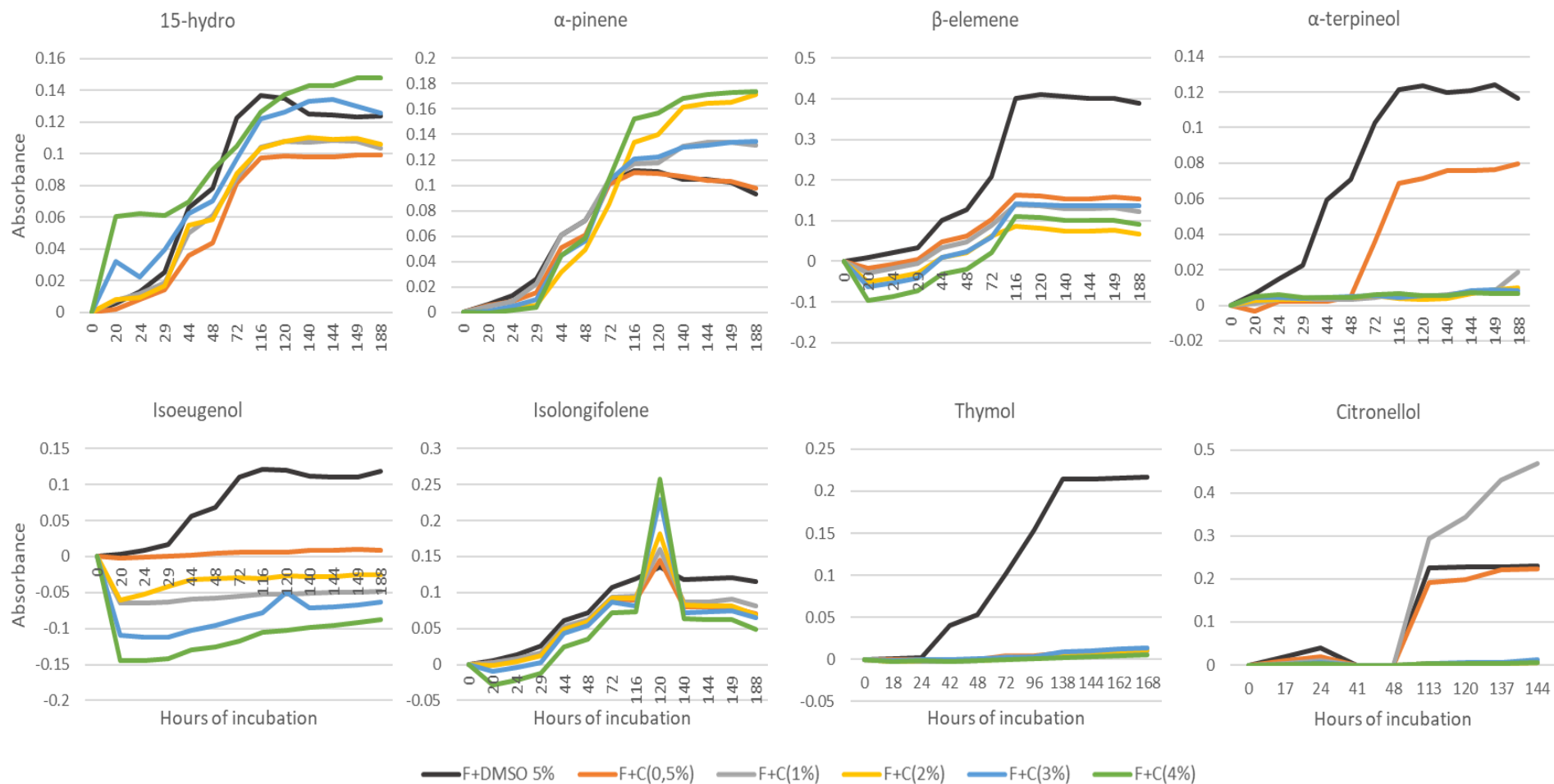
**Figura 20.** Efecto de la resina constitutiva e inducida de *P. pinaster* y *P. radiata* en el crecimiento de *F. circinatum* medido por la absorbancia a 597 nm a los 6 días. Las líneas entre columnas con \* indican diferencias significativas según el test de Tukey ( $p > 0,05$ ).



**Figura 21.** Efecto del extracto de resina constitutiva de *P. pinaster* y *P. radiata* al 3% en hexano sobre la biomasa fúngica medida por absorbancia a 597 nm después de 168 h (7 días) de crecimiento. Los valores son las medias de los mínimos cuadrados y el error estándar de 5 réplicas.

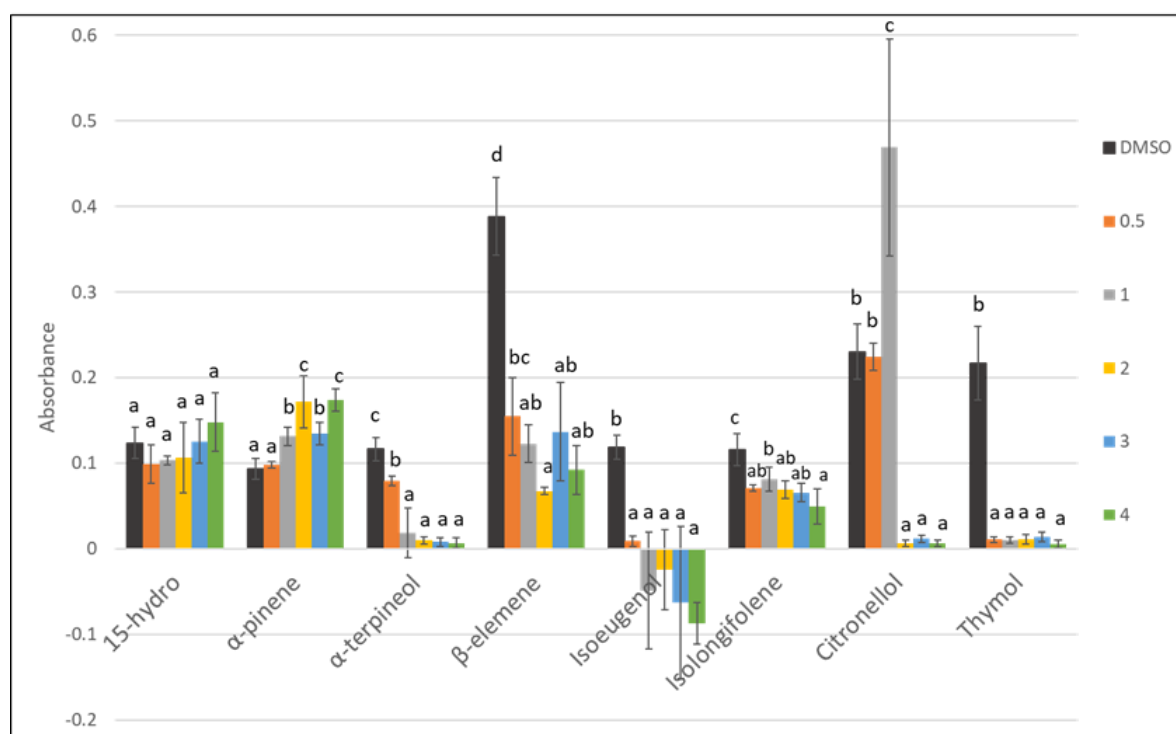
Por último, se estudió el efecto de alguno de los terpenos constituyentes de la resina más abundantes (Arrabal et al., 2002; Slinski et al., 2015) en un gradiente de concentración de hasta el 4%. Los terpenos elegidos fueron  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol, citronelol y timol (todos en el grupo MTs), beta-elemeno, isolongifoleno (grupo STs) y ácido 15-hidroxidehidroabiético (DRA), también se estudió el efecto del isoeugenol, un fenilpropanoide derivado del eugenol. Se obtuvieron las curvas de

crecimiento a lo largo de los 7 días para *F. circinatum* en un medio basado en peptona y suplementado con diferentes concentraciones (0, 0,5, 1, 2, 3, 4%) de cada terpeno disuelto en DMSO (**Figura 22**).



**Figura 22.** Curvas de crecimiento de *F. circinatum* obtenidas mediante mediciones de absorbancia a 597 nm durante 7 días, con el fin de evaluar el efecto de terpenos individuales. Se probaron cinco réplicas para cada concentración (0, 0,5, 1, 2, 3 y 4% disueltos en DMSO)

$\alpha$ -pineno y citronelol son los únicos MTs ensayados con un efecto inductor del crecimiento fúngico, siendo el primero significativo a partir de la concentración del 1% y alcanzándose la máxima absorbancia a la concentración del 4%. Citronelol sólo promueve el crecimiento fúngico a la concentración del 1%. La absorbancia máxima para ambos terpenos es de aproximadamente dos veces mayor respecto al control (constituido por el medio suplementado con DMSO a la misma concentración) (Figura 23). Todos los demás terpenos volátiles causan una reducción en el crecimiento de *F. circinatum*. Timol fue el compuesto que presentó mayor actividad inhibitoria desde la primera concentración probada (0,5%). Solo se midió el efecto de un DRA sobre el crecimiento del patógeno, el ácido 15-hidroxideshidroabiético, y este no causó ningún efecto sobre la biomasa fúngica (Figura 23).

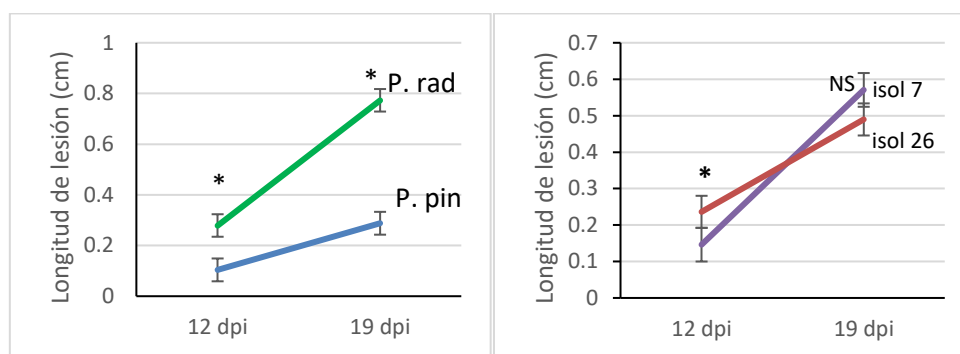


**Figura 23.** Efecto de terpenos específicos sobre el crecimiento de *F. circinatum* medido mediante absorbancia a 597 nm después de 168 h de incubación. Los valores son las medias de cinco réplicas  $\pm$  el error estándar para cada concentración (0, 0,5, 1, 2, 3 y 4%) analizada. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). El análisis estadístico se realizó de forma independiente para cada terpeno.

### 4.3. Respuesta defensiva de *Pinus pinaster* y *Pinus radiata* frente a *Fusarium circinatum*

#### 4.3.1. Longitud de la lesión

La longitud de la lesión se midió en *P. pinaster* y *P. radiata* a los 12 y 19 dpi. Ambas medidas se compararon mediante un test ANOVA, el cual confirma que *P. pinaster* es más resistente que *P. radiata* (diferencias en la longitud de la lesión de 0,33cm;  $p < 0,0001$ ) (Figura 24). Respecto a los distintos aislados, el aislado 26 causó significativamente una mayor lesión a los 12 dpi (diferencia de 0,09cm,  $p = 0,0227$ ). El aislado 7 mostró mayor longitud de lesión a los 19 dpi, aunque esta diferencia no fue significativa. (Figura 24).



**Figura 24.** Longitud de lesión en *P. pinaster* y *P. radiata* inoculados con dos aislados de *F. circinatum* (7 y 26), medida a los 12 y 19 dpi. La longitud de la lesión entre especies mostró diferencias significativas en un ANOVA ( $p = 0,0001$ ), así como la interacción entre dpi y aislado a los 12 dpi ( $p = 0,022$ )

#### 4.3.2. Respuesta anatómica

No se observan diferencias entre los canales resiníferos constitutivos del córtex en *P. pinaster* ni en *P. radiata*, aunque sí en el xilema (Figura 25 y Tabla 17). Los valores medios de todas las características medidas en el xilema de *P. radiata* son significativamente mayores que en *P. pinaster*. Los canales resiníferos del xilema en *P. radiata* son más anchos, unas 1,5 veces más, presentaban una mayor densidad, unas 2,6 veces, y resultaba en una mayor área conductiva, unas 5,6 veces, que en *P. pinaster* (Figura 25).

**Tabla 16.** Diferencias en las características de los canales resiníferos constitutivos en *P. pinaster* y *P. radiata*

	Córtex			Xilema		
	Densidad (N/mm <sup>2</sup> )	Diametro medio (mm)	Área conductiva total (mm <sup>2</sup> )	Densidad (N/mm <sup>2</sup> )	Diametro medio (mm)	Área conductiva total (mm <sup>2</sup> )
<i>P. pinaster</i>	2,918 <sup>a</sup> (0,2155)	0,0725 (0,00434)	0,02351 (0,003659)	1,108 (0,4207)	0,0192 (0,00164)	0,0008 (0,001139)
<i>P. radiata</i>	2,657 (0,2155)	0,0803 (0,00434)	0,02684 (0,003659)	2,879 (0,4207)	0,0285 (0,00164)	0,0045 (0,001139)
Diferencia <sup>b</sup>	0,261 (0,3047)	-0,0078 (0,00613)	-0,0033 (0,00518)	<b>-1,770</b> (0,5949)	<b>-0,0093</b> (0,00232)	<b>-0,0037</b> (0,00161)

<sup>a</sup> Media de mínimos cuadrados en un modelo mixto con “Especies”, “dpi” y “tratamiento” (Inoculación con *F. circinatum*, inoculación con agua destilada estéril y plántulas sin herida) como factores fijos. El error estándar se muestra entre paréntesis

<sup>b</sup> Diferencia de medias de mínimos cuadrados de *P. pinaster* menos *P. radiata*. Las comparaciones significativas se muestran en negrita.

**Tabla 17.** Test de tipo III en un modelo mixto para estudiar el efecto fijo de especies, días post-inoculación (dpi), y tratamiento (Inoculación con *F. circinatum*, inoculación con agua destilada estéril y plántulas sin herida), sobre los canales resiníferos de *P. pinaster* y *P. radiata*. Los efectos significativos se muestran en negrita.

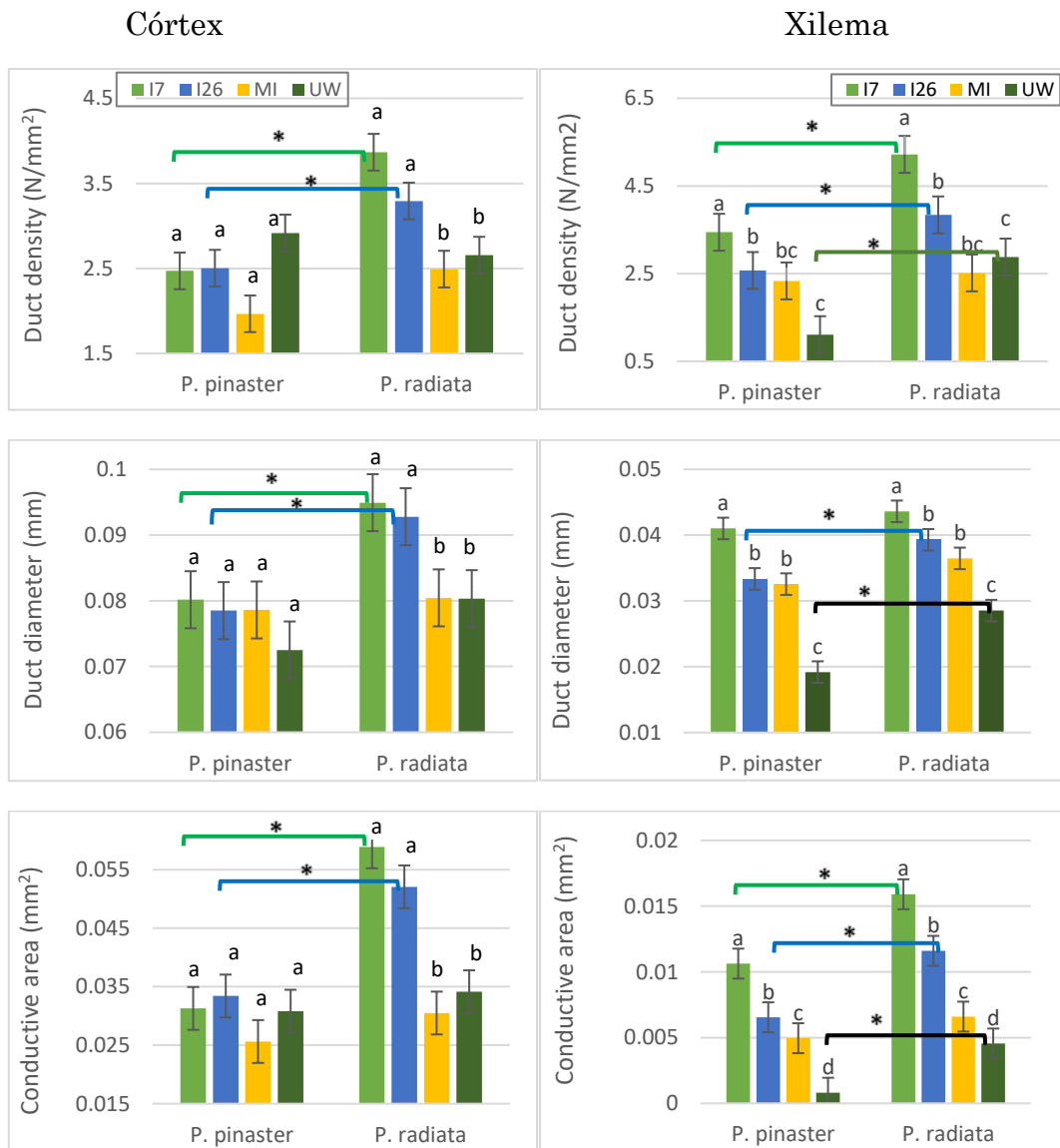
Efecto	Córtex			Xilema		
	Densidad	Diametro medio	Área conductiva total	Densidad	Diametro medio	Área conductiva total
Especies (Sp)	<b>16,17</b>	<b>9,96</b>	<b>27,69</b>	<b>17,65</b>	<b>22,13</b>	<b>23,77</b>
dpi	0,01	0,92	0,02	0,00	<b>12,72</b>	3,42
Tratamiento (T)	<b>6,71</b>	<b>2,87</b>	<b>9,89</b>	<b>11,91</b>	<b>44,11</b>	<b>31,72</b>
Sp*dpi	<b>4,68</b>	0,58	2,84	0,68	1,26	1,12
Sp*T	<b>5,08</b>	0,99	<b>5,03</b>	1,59	1,61	1,07
Dpi*T	2,22	1,44	1,09	0,50	1,56	0,64
Sp*dpi*T	<b>4,17</b>	0,73	0,94	0,95	1,42	1,01

La infección de *F. circinatum* ocasiona una inducción de la formación de canales resiníferos tanto en el córtex como en el xilema de *P. radiata*, ocasionando que

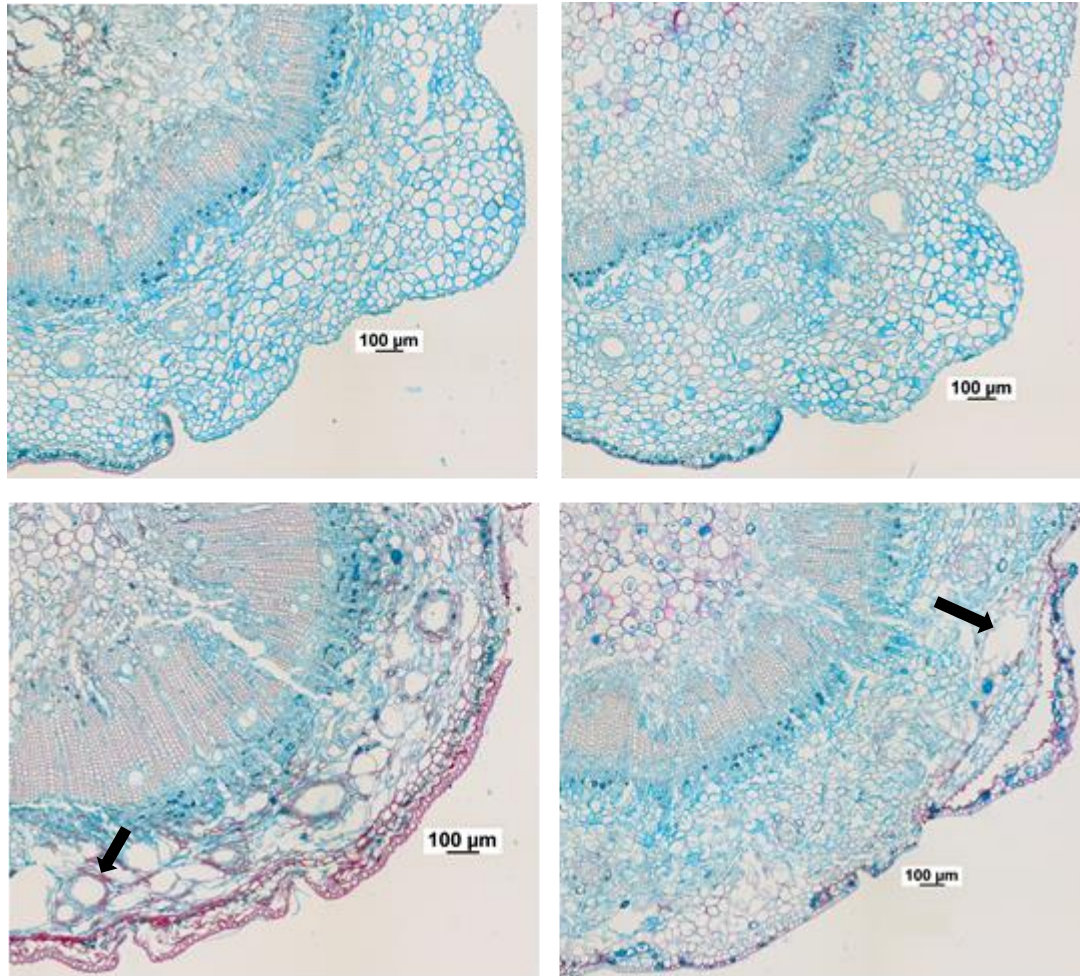
todas las características estudiadas fueran mayores respecto a *P. pinaster* (**Figura 25**) (a excepción del diámetro en el xilema). La inducción de los canales resiníferos en el córtex de *P. radiata* se debe exclusivamente al hongo (diferencias significativas de I respecto a MI y no significativas al comparar MI respecto de UW). Concretamente, el diámetro medio, densidad y área conductiva total aumentan un 17%, 39% y 72%, respectivamente, respecto a las plántulas sanas (**Figura 25**). En cambio, en *P. pinaster* la infección no causa ningún efecto en los canales resiníferos del córtex.

El efecto más notable de la infección en el xilema de ambas especies es el aumento del área conductiva total, donde los dos aislados del patógeno provocan un incremento respecto a la herida (el incremento para el aislado 7 fue de 2,1 y de 2,4 veces en *P. pinaster* y *P. radiata*, respectivamente). El diámetro y la densidad de los canales resiníferos inducidos en el xilema se vieron afectados sólo por el aislado 7 pero no por el 26 (**Figura 25**). El incremento en el diámetro fue de 107% y 48% respecto a las plántulas con herida de *P. radiata* y *P. pinaster* respectivamente. La densidad se incrementó un 20% en *P. radiata* y un 26% en *P. pinaster*.

El examen de las secciones transversales al microscopio muestra como característica más notable, una alteración tisular en el córtex de las plántulas de *P. radiata* infectadas por *F. circinatum*. En esta zona se observa una clara degradación del parénquima, que resulta en amplias cavidades. En cambio, las plántulas infectadas de *P. pinaster* conservaron en gran medida su integridad tisular (**Figura 26**).



**Figura 25.** Características de los canales resiníferos medidas en el córtex (izquierda) y xilema (derecha) de plántulas de *P. pinaster* y *P. radiata* medidas a los 12 y 19 días después del tratamiento (inoculación con dos aislados de *F. circinatum* (aislados 7 (I7) y 26 (I26)), inoculación con agua destilada estéril (MI) y sin herida (UW)). Para cada especie, las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha=0,05$ ) según un test de Tukey. Las barras unidas con \* muestran diferencias significativas por pares entre especies.



**Figura 26.** Ejemplo de secciones transversales del ápice de tallos de *P. pinaster* (arriba) y *P. radiata* (abajo), en los cuales se pueden observar canales resiníferos en el córtex y en el xilema en plántulas infectadas con *F. circinatum* a los 19. Las fotografías de la derecha se corresponden con plántulas inoculadas con el aislado 7 y las de la izquierda con el aislado 26. Nótese la alteración tisular del parénquima cortical en *P. radiata* (flechas).

#### 4.3.3. Respuesta del perfil terpénico frente a *Fusarium circinatum*

Se detectaron un total de 182 terpenos en la resina extraída del ápice del tallo de las plántulas, aunque cuatro de ellos no se pudieron identificar. De estos metabolitos se descartaron ocho debido a que no se hallaron diferencias significativas entre ningún factor en un test ANOVA, realizado para cada compuesto individual. Así pues, el perfil terpénico está compuesto por un total de 175 metabolitos: 55 MTs, 39 STs, 34 DTs y 47 DRAs.

#### 4.3.3.1. Composición de la resina constitutiva

La cantidad total de los terpenos que forman parte de la resina constitutiva es de  $39.017 \pm 4.739,9 \mu\text{g/g}$  de planta en *P. pinaster* y de  $26.453 \pm 2.347,7 \mu\text{g/g}$  de planta en *P. radiata*, aunque estos valores no son significativamente distintos ( $p < 0.05$ ). La resina de ambas especies está compuesta principalmente por DRAs, los cuales representan alrededor de un 90% del contenido total de terpenos. Dentro de los terpenos neutros, el grupo con mayor representación fue el de los MTs (**Figura 27**). En *P. pinaster* los STs fueron significativamente más abundantes respecto a *P. radiata* ( $p = 0,0025$ ), mientras que el contenido en MTs, DTs y DRAs fue similar en ambas especies (**Figura 27**).

Hay diferencias significativas en el contenido de 113 de los 174 terpenos entre ambas especies (**Tabla 18**) y solamente encontramos 11 y 5 terpenos que son únicos en *P. pinaster* y *P. radiata*, respectivamente, la mayoría de ellos STs y MTs. El terpeno más abundante es el ácido 7-oxodehidroabiético (DRA) con un contenido de  $20.746 \pm 3.311,8 \mu\text{g/g}$  de planta (media  $\pm$  error estándar) en *P. pinaster* y  $14.364,12 \pm 1.552,1 \mu\text{g/g}$  de planta en *P. radiata*, seguido del ácido isopimarico (DRA), con un contenido 10 veces menor ( $1.790,9 \pm 249,1$  y  $1.818,1 \pm 216,8 \mu\text{g/g}$  planta en *P. pinaster* y *P. radiata*, respectivamente). Solamente hay presentes dos MTs entre los 8 terpenos más abundantes de ambas especies, los cuales son  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno. Por último, el ST abieta-8(14), 13(15)-diene no está presente en la resina constitutiva de ninguna de las dos especies, pero sí en la inducida.

**Tabla 18.** Tasa de cambio (FC) de los terpenos de la resina constitutiva que resultan significativos al comparar *P. pinaster* frente a *P. radiata* mediante un t-test de diferencia de medias

	FC	1/FC	log <sub>2</sub> (FC)
phenylethyl butyrate	0,00	773,6	-9,595
citronellal	0,00	635,5	-9,312
citronellol	0,00	309,6	-8,274
(E,E)-farnesol	0,01	133,2	-7,058
piperitone	0,01	109,3	-6,773
trans-piperitol	0,01	74,0	-6,210
bicyclogermacrene	0,02	60,3	-5,914
phenylethyl propionate	0,02	57,5	-5,846
thymol	0,03	35,9	-5,164
cis-isopinocampone	0,03	33,7	-5,076
trans-sabinene hydrate	0,04	27,6	-4,788
farnesyl isovalerate	0	und	

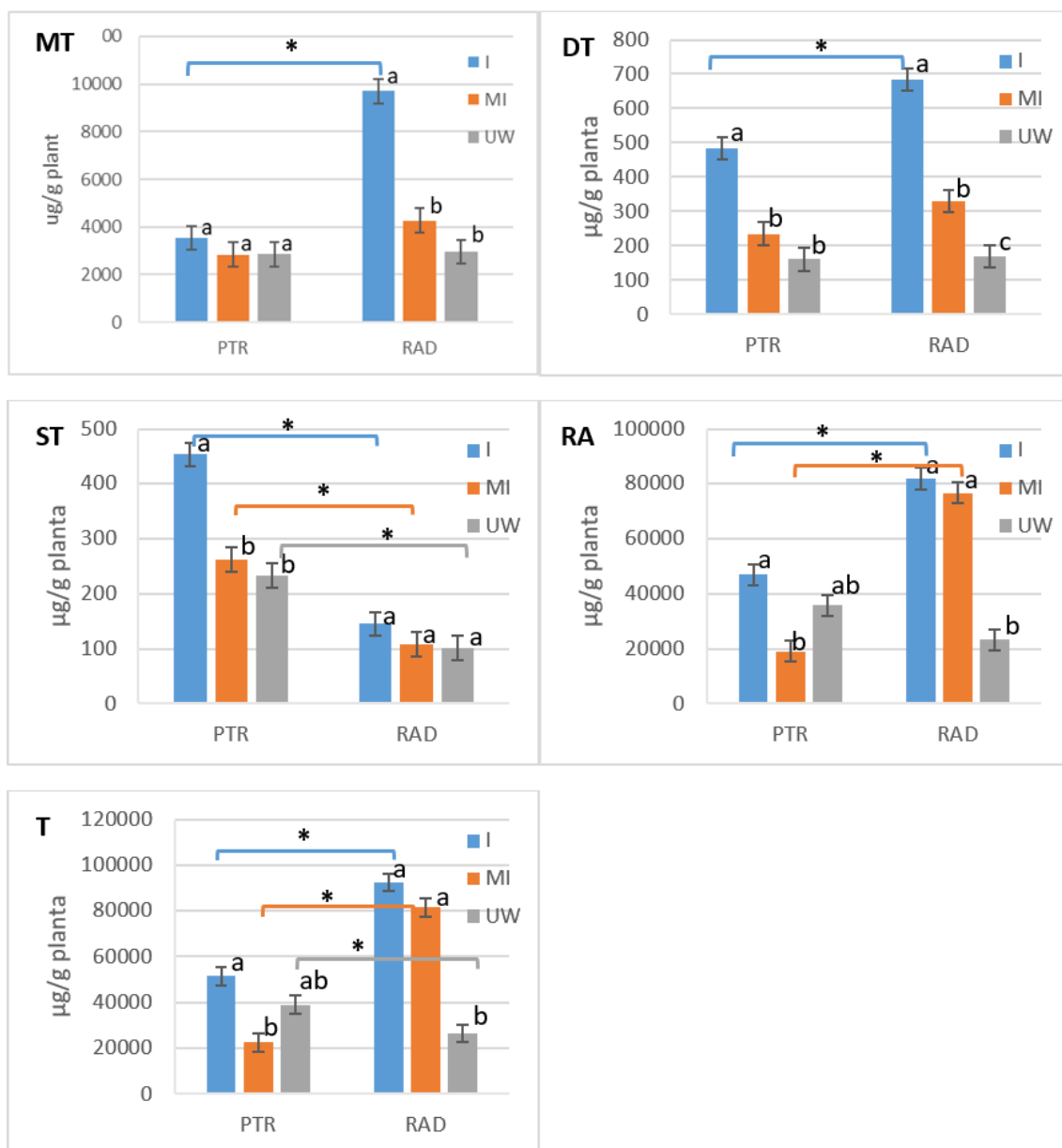
sabinene	0,04	22,7	-4,504
(E)-citral	0	und	
unknown10	0,06	15,8	-3,978
germacrene-D-4-ol	0,07	13,6	-3,766
4-terpineol	0,08	13,3	-3,729
citronellic acid	0	und	
13-epimanool	0,12	8,5	-3,089
manoyl oxide	0,12	8,4	-3,066
2-phenylethyl benzoate	0,14	7,1	-2,835
beta-pinone	0,15	6,8	-2,768
p-cymen-8-ol	0,15	6,8	-2,766
borneol	0,16	6,4	-2,668
cuminic acid	0,17	6,0	-2,590
labda-8(17),13-dien-15-al	0,19	5,1	-2,364
verbenone	0,20	5,0	-2,314
unknown15	0,20	4,9	-2,306
beta-phellandrene	0,21	4,7	-2,226
p-cymene	0,22	4,5	-2,165
dehydroabietal	0,24	4,1	-2,037
alpha-terpinolene	0,27	3,8	-1,914
alpha-terpinene	0,28	3,6	-1,856
cis-verbenol	0,28	3,5	-1,814
trans ocimene	0,29	3,4	-1,786
Alpha-terpinene	0,31	3,3	-1,702
alpha-terpineol	0,31	3,2	-1,680
limonene	0,31	3,2	-1,669
abienol	0,35	2,9	-1,529
myrtenol	0,36	2,8	-1,492
linalool	0,37	2,7	-1,445
(Z,E)-farnesyl propionate	0,48	2,1	-1,055
(E,E)-farnesyl acetate	0,48	2,1	-1,054
pinocarvone	0,52	1,9	-0,930
isopimaral	0,57	1,8	-0,820
cis-pinocarveol	0,69	1,5	-0,540
beta-pinene	0,74	1,4	-0,438
sandaracopimaric acid	1,61	0,6	0,687
alpha-pinene	1,71	0,6	0,774
hydroxyabietic acid 51,5	1,74	0,6	0,797
13-methoxypodocarpa-8(14),9(11),12-trien-15-oic acid	1,80	0,6	0,848
methyl 6-dehydrodehydroabietic acid	1,85	0,5	0,889

phenylethyl isovalerate	1,90	0,5	0,927
12-methoxyabieta-8,11,13,15-tetraen-20-oic acid	1,95	0,5	0,962
9-methoxyabietic acid	1,96	0,5	0,969
methoxyresinic acid 53,0	2,09	0,5	1,063
hydroxyabietic acid 51,8	2,14	0,5	1,096
methoxyabietatetraenoic acid isomer	2,16	0,5	1,109
cadina-14-diene	2,29	0,4	1,194
deisopropyldehydroabietic acid	2,36	0,4	1,238
resinic acid 55,0	2,38	0,4	1,248
beta-cubebene	2,52	0,4	1,333
imbricataloic acid	2,54	0,4	1,347
cubebol	2,55	0,4	1,353
abietol	2,60	0,4	1,380
dihydroagathic acid	2,67	0,4	1,418
abietic acid	2,68	0,4	1,421
abietal	2,75	0,4	1,460
geraniol	3,20	0,3	1,678
resinic acid 54,8	3,41	0,3	1,769
phenylethyl isovalerate2	3,49	0,3	1,805
resinic acid derivative 52,8	3,80	0,3	1,924
methyl-camphenilol	4,26	0,2	2,092
13(16),14-labdien-8-ol	4,72	0,2	2,239
beta-gurjunene	4,73	0,2	2,243
neoabietic acid	5,01	0,2	2,323
delta-cadinene	5,10	0,2	2,350
hydrocinnamyl isovalerate	und		
hydroxyresinic acid 51,6	5,57	0,2	2,478
hydrocinnamyl isobutyrate	und		
hydroxydehydroabietic acid 52,0	6,74	0,1	2,754
alpha-humulene	6,84	0,1	2,775
cinnamyl isovalerate	und		2,853
trans caryophyllene	8,02	0,1	3,004
isolongifolene	8,44	0,1	3,078
cis-beta-farnesene	8,45	0,1	3,078
copaborneol	und		
longifolene	und		
camphene	9,09	0,1	3,185
alpha-ylangene	und		
gamma-cadinene	9,31	0,1	3,219
neophytadiene	und		
cadina-1(6),4-diene	und		

sandaracopimaral	10,64	0,1	3,412
germacrene D	10,94	0,1	3,451
pimaric acid	12,15	0,1	3,602
alpha-amorphene	13,64	0,1	3,770
alpha-cadinol	13,65	0,1	3,771
alpha-longipinene	und		
sandaracopimarinol	14,55	0,1	3,863
15-isopimaradiene	14,60	0,1	3,868
labda-8(17),13E-dien-15-al	16,72	0,1	4,064
guaiol	und		
unknown30,7	35,83	0,0	5,163
geranyl acetate	51,22	0,0	5,679
alpha-copaene	54,38	0,0	5,765
alpha-cubebene	59,96	0,0	5,906
cinnamyl valerate	60,69	0,0	5,923
alpha-muurolene	82,50	0,0	6,366
linalyl acetate	88,12	0,0	6,461
bornyl acetate	113,35	0,0	6,825
epibicyclesesquiphellandrene	114,85	0,0	6,844
valencene	1071,30	0,0	10,065

---

Und= indefinido



**Figura 27.** Contenido total ( $\mu\text{g/g}$  de planta) y error estándar de los distintos grupos de terpenos en plantas inoculadas con *F. circinatum* (I), plantas con inoculación con agua destilada estéril (MI), y plantas sin herida (UW). Monoterpenos (MT), Sesquiterpenos (ST), Diterpenos (DT), Ácidos resínicos (DRAs) y contenido total (T). Los valores se han obtenido a partir de la media de tres replicas y se han considerado como un solo tratamiento la inoculación con los dos aislados de *F. circinatum* al no existir diferencias significativas entre ellos. Para cada grupo de terpenos y especie, las medias con la misma letra no son significativamente distintas según un test de Tukey. Las barras unidas con \* muestran diferencias significativas entre especies.

Por último, los terpenos discriminantes de la resina constitutiva entre ambas especies se seleccionaron a partir del S-plot derivado de un modelo OPLS-DA

(parámetros de validación:  $R^2Y=0.999$  y  $Q^2=0.989$  con  $p = 0.002$ ). Solo se seleccionaron aquellos terpenos con un valor de  $\log_2FC > |2|$  y significativos ( $p < 0.05$ ) en la separación de clases. Estos terpenos están altamente correlacionados ( $> |0.8|$ ) con la separación de clases. El grupo de terpenos significativamente más abundante en *P. radiata* está constituido principalmente por MTs, mientras que en *P. pinaster* hay mayor presencia de ST (Tabla 19).

**Tabla 19.** Tasa de cambio (FC) de los terpenos de la resina constitutiva discriminantes entre *P. pinaster* y *P. radiata*

<i>P. pinaster</i> (P) vs. <i>P. radiata</i> (R)	Grupo	FC (P/R)	1/FC	Log <sup>2</sup> FC
phenylethyl butyrate	MT	0,001	773,6	-9,5954
citronellal	MT	0,002	635,5	-9,3118
citronellol	MT	0,003	309,6	-8,2743
(E,E)-farnesol	ST	0,008	133,2	-7,0578
piperitone	MT	0,009	109,3	-6,7725
trans-piperitol	MT	0,014	74,0	-6,21
bicyclogermacrene	ST	0,017	60,3	-5,9139
phenylethyl propionate	MT	0,017	57,5	-5,8455
thymol	MT	0,028	35,9	-5,1641
cis-isopinocampone	MT	0,030	33,7	-5,076
trans-sabinene hydrate	MT	0,036	27,6	-4,7875
farnesyl isovalerate	ST	0,039	25,7	-4,6824
sabinene	MT	0,044	22,7	-4,5038
(E)-citral	MT	0,0	unda	-4,1695
Unknown 10	MT	0,063	15,8	-3,9778
germacrene-D-4-ol	ST	0,074	13,6	-3,766
4-terpineol	MT	0,075	13,3	-3,7285
trans caryophyllene	ST	8,02		3,0042
isolongifolene	ST	8,44		3,0778
cis-beta-farnesene	ST	8,45		3,0781
copaborneol	ST	und		3,1351
camphene	MT	9,09		3,1848
alpha-ylangene	ST	und		3,1901
neophytadiene	ST	und		3,2603
cadina-1(6),4-diene	ST	und		3,3642
sandaracopimaral	DT	10,64		3,4116
germacrene D	ST	10,94		3,4509
pimaric acid	DRA	12,15		3,6024

alpha-amorphene	ST	13,64	3,7696
alpha-cadinol	ST	13,65	3,7705
alpha-longipinene	ST	und	3,8435
sandaracopimarinol	DT	14,55	3,8633
15-isopimaradiene	DT	14,60	3,8676
labda-8(17),13E-dien-15-al	DT	16,72	4,0637
guaiol	ST	und	4,4637
Unknown 30.7	ST	35,83	5,1631
geranyl acetate	MT	51,22	5,6785
alpha-copaene	ST	54,38	5,765
alpha-cubebene	ST	59,96	5,906
cinnamyl valerate	MT	60,69	5,9233
alpha-muurolene	ST	82,50	6,3664
linalyl acetate	MT	88,12	6,4613
bornyl acetate	MT	113,35	6,8247
epibicyclesesquiphellandrene	ST	114,85	6,8436
valencene	ST	1071,3	10,065

<sup>a</sup> und: indefinido

#### 4.3.3.2. Cambios en el contenido de terpenos en respuesta a la herida y a la infección por *Fusarium circinatum*

*P. pinaster* y *P. radiata* responden de manera distinta frente a la herida (inoculación con agua destilada estéril) y a la infección por *F. circinatum*. Para cada especie, se observa un comportamiento diferente respecto a la infección del patógeno cuando se analizan los distintos grupos de terpenos (MTs, STs, DTs, DRAs), ya que la interacción entre tratamiento\*especie es significativa a un nivel de confianza de  $\alpha = 0,05$ , excepto para los DTs (**Tabla 20**). En las plántulas de *P. pinaster*, la infección con *F. circinatum* (diferencias significativas entre I y MI, pero no entre MI y UW) provoca un aumento en las cantidades de DTs y STs en un total de 2 y 1,7 veces respectivamente, en relación con MI (**Figura 27**). La cantidad de DRAs de las plántulas inoculadas aumentó 2,4 veces en comparación con las MI, aunque no en comparación con las UW (**Figura 27**). Por el contrario, las plántulas de *P. radiata* inoculadas aumentaron su contenido en MTs 2,3 veces y de DTs 2 veces, en comparación a las plantas MI. La herida causó un aumento en el contenido de DRAs de 1,4 veces en comparación con las plantas UW, mientras que el contenido en DTs aumentó tanto por el efecto del patógeno como por el efecto de la herida (**Figura 27**).

**Tabla 20.** Test de tipo III en un modelo mixto para estudiar el efecto fijo sobre la concentración total ( $\mu\text{g/g}$  planta) de cada grupo de terpenos de la especie, días post-inoculación (dpi) y tratamiento (inoculación con *F. circinatum*, inoculación con agua destilada estéril y plantas sin herida) en *P. pinaster* y *P. radiata*.

Efecto	MT	DT	ST	DRA	Total
Especies (Sp)	<b>24,58<sup>b</sup></b>	<b>8,12</b>	<b>79,52</b>	<b>37,52</b>	<b>44,96</b>
dpi	0,15	2,23	<b>8,01</b>	0,28	0,37
tratamiento (T)	<b>24,25</b>	<b>59,85</b>	<b>17,23</b>	<b>24,31</b>	<b>31,13</b>
Sp*dpi	0,37	0,33	<b>5,12</b>	1,72	1,50
Sp*T	<b>15,59</b>	2,78	<b>7,75</b>	<b>19,09</b>	<b>21,11</b>
Dpi*T	0,39	<b>9,95</b>	<b>3,32</b>	0,99	1,19

<sup>a</sup> MT=mono-, ST=sesqui, DT=Diterpenos y DRAs= ácidos resínicos

<sup>b</sup> Valores en negrita significativos ( $p=0,05$ )

Aunque *P. radiata* muestra inicialmente una cantidad de resina constitutiva significativamente inferior en comparación con *P. pinaster*, se produce una mayor inducción en la producción de resina en respuesta a la herida y a la infección por el patógeno (3,6 y 1,8 veces respectivamente). La respuesta a la infección ocasiona un aumento en la cantidad de MTs (2,7 veces), DTs (1,4 veces) y DRAs (1,7 veces) (**Figura 27**) respecto a *P. pinaster*. En cambio, en esta especie la cantidad de STs siempre es superior independientemente del tratamiento (**Figura 27**).

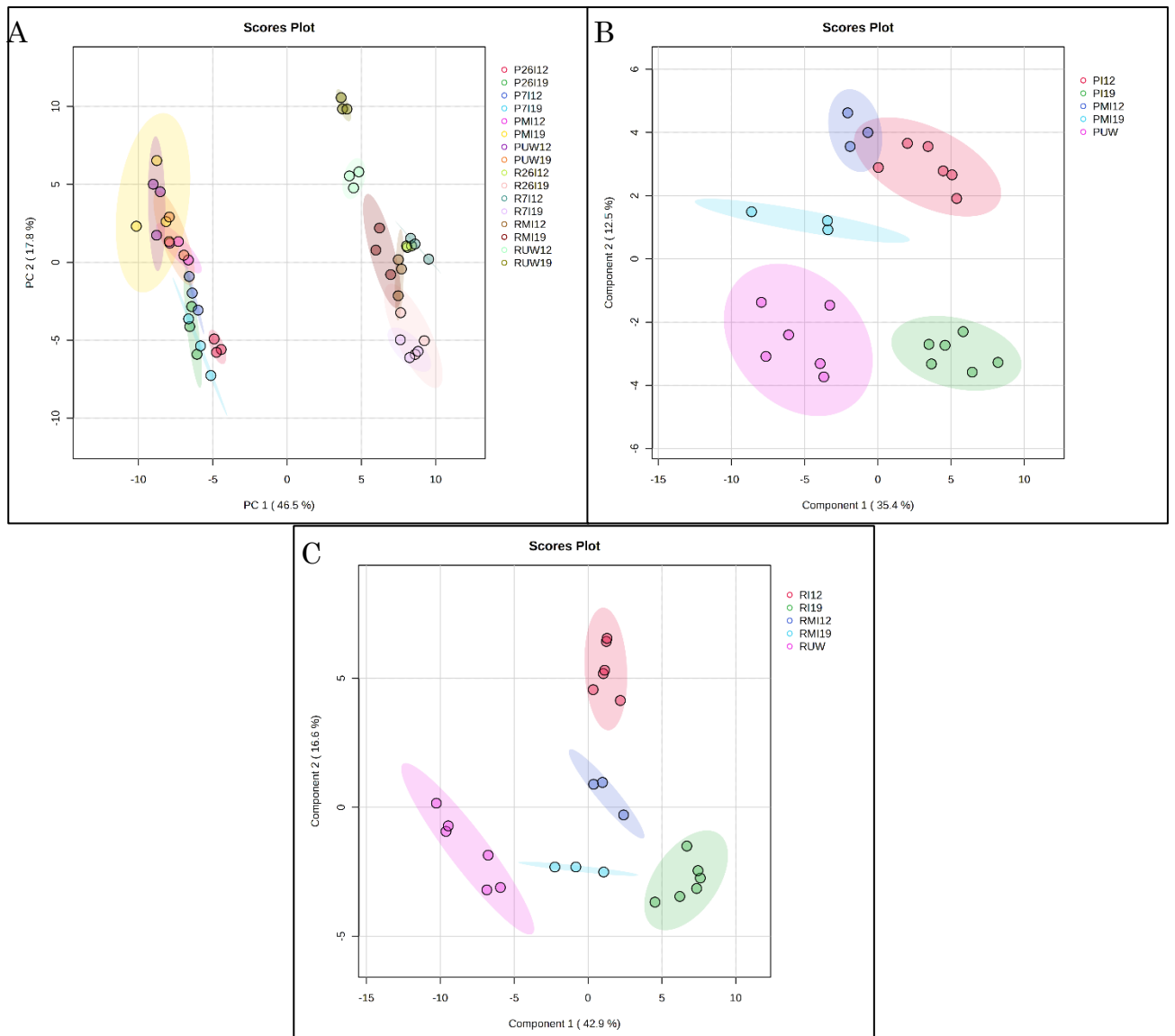
Por otro lado, tanto las plántulas infectadas de *P. pinaster* y de *P. radiata* aumentan su contenido en DT a medida que transcurre el tiempo, de los 12 dpi a los 19 dpi (interacción entre dpi\*tratamiento significativo) (**Tabla 20**), mientras que la cantidad de STs aumenta significativamente solo en *P. pinaster*. En esta especie, los otros grupos no sufren variación con el tiempo durante la infección con *F. circinatum*. Las plántulas MI no variaron su contenido en ningún grupo de terpenos entre los 12 y los 19 dpi.

Para el análisis de los perfiles terpénicos definidos para cada especie (*P. pinaster* o *P. radiata*), dpi (12 y 19) y tratamiento (UW, MI, I), exploramos inicialmente sus diferencias mediante un análisis de componentes principales (PCA). Este análisis muestra que los dos primeros componentes (PC1 y PC2) explican un 65% de la varianza. Si observamos el gráfico de los dos primeros componentes (**Figura 28**) vemos un efecto importante de la especie, asociada a PC1, que explica el 47% de la varianza. Posteriormente, se realizó el análisis mediante un modelo PLS-DA con

el fin de identificar los terpenos altamente correlacionados con la separación de cada clase. El mejor ajuste para este modelo predictivo se encuentra cuando se separan los datos en función de la especie, analizándolos por separado, y en estos se combinan las plántulas sanas (UW) a los 12 y 19 dpi y las plántulas inoculadas con el aislado 7 y 26 del mismo dpi (parámetros de validación:  $R^2 = 0.91$ ,  $Q^2 = 0.76$  con 4 componentes;  $p=0.001$  para *P. pinaster* and  $R^2 = 0.84$ ,  $Q^2 = 0.74$  con 2 componentes;  $p < 0.0001$ , para *P. radiata*). En resumen, este modelo arroja que los datos se separan en cinco clases, denominadas I12 e I19, MI12 y MI19 y UW (**Figura 28**).

Los terpenos más importantes para poder discriminar entre estas clases se eligieron en función del valor del parámetro VIP (*Variable Importance in Projection*) en el modelo PLS-DA. Los 30 metabolitos principales (aquellos con un VIP score > 1.30) (**Tabla 21**) se utilizaron para construir un heatmap del contenido normalizado de estos terpenos (**Figura 29**). En esta figura podemos observar que en *P. pinaster* se produce un aumento en el contenido en terpenos en respuesta a la herida y a la infección de manera más rápida que en *P. radiata*. Además, este aumento se mantuvo en el tiempo en las plantas infectadas.

En el heatmap de *P. pinaster* se observan los terpenos agrupados en 3 grupos principales, cuya principal diferencia es la respuesta frente a la herida (inoculación con agua destilada estéril). En esta especie, de los 30 terpenos seleccionados 15 son MTs (aunque su concentración es baja) y no hay presente ningún DRA (**Tabla 21**). Además, están presentes algunos terpenos (p-cymen-8-ol, alpha-bisabolene, 8,15-pimaradien-18-al, beta-pinone, cis-verbenol, oplopane, verbenone and cis-isopinocampone) cuyo nivel en las plántulas sanas (UW) es prácticamente de 0 y su contenido aumenta en respuesta a la herida o a la infección (**Tabla 21**). Por último, los terpenos cuyo contenido es más alto en las plántulas I19 son en primer lugar 19-Nor-4,8,11,13-abietatetraene (DT), seguido de borneol (MT).



**Figura 28.** Gráficos del modelo PCA (A) y PLS-DA (B y C) para los datos normalizados del perfil terpénico obtenido mediante GC-MS de plántulas de *P. pinaster* (B) y *P. radiata* (C). Dichas plántulas se inocularon con los aislados 7 y 26 de *F. circinatum* y se recolectaron a los 12 (I712 y I2612) y 19 (I719 y I2619) dpi. También se realizó una inoculación con agua destilada estéril (MI12 y MI19) y se incluyeron plántulas sin herida (UW12 y UW19) cuyos datos se trataron de manera conjunta (UW) en los modelos PLS-DA.

**Tabla 21.** Contenido ( $\mu\text{g/g}$  de planta) y grupo (G) de los 30 terpenos incluidos en los heatmaps contruidos en base a las abundancias después de los tratamientos (inoculación con *F. circinatum* (I), inoculación con agua destilada estéril (MI) y plantas sin herida (UW)) aplicados a plántulas de *P. pinaster* y *P. radiata* y medidos a los 12 y 19 dpi. Los terpenos fueron seleccionados por el VIP score  $>1,3$  del modelo PLS-DA (parámetros de validación:  $R^2= 0,9$ ,  $Q^2= 0,75$ ;  $p=0,001$  para *P. pinaster* y  $R^2= 0,85$ ,  $Q^2=0,74$ ;  $p<0,0001$  , para *P. radiata*)

<i>Pinus pinaster</i>											
	I12		I19		MI12		MI19		UW <sup>a</sup>		G
	Avg <sup>b</sup>	St d <sup>b</sup>	Avg	St d	Avg	St d	Avg	St d	Avg	St d	
(e,e)-farnesol	0,8	0,36	1,1	0,65	0,2	0,06	0,2	0,31	0,2	0,18	ST
diterpenic alcohol	4,3	1,82	6,0	2,36	3,5	2,46	0,3	0,32	1,3	1,51	DT
labda-8(17),13-dien-15-al	1,5	0,99	2,6	1,73	0,7	0,44	0,0	0,00	0,3	0,31	DT
M+272 43,5	0,5	0,33	0,6	0,35	0,6	0,34	0,0	0,00	0,1	0,24	DT
unknown15	0,3	0,44	0,7	1,22	0,1	0,03	0,0	0,00	0,0	0,02	MT
19-Nor-6,8,11,13-abietatetraene	2,5	1,27	2,8	1,21	2,1	0,79	0,2	0,27	0,6	0,37	DT
p-cymen-8-ol	0,5	0,19	0,5	0,32	0,2	0,04	0,0	0,00	0,0	0,03	MT
piperitone	0,4	0,19	0,4	0,18	0,2	0,11	0,1	0,10	0,1	0,01	MT
trans-piperitol	0,3	0,12	0,2	0,11	0,1	0,00	0,0	0,00	0,1	0,00	MT
4-epidehydroabietol	1,0	0,30	1,2	0,53	0,5	0,15	0,2	0,31	0,1	0,12	DT
alpha-bisabolene	0,2	0,20	0,1	0,06	0,0	0,01	0,0	0,00	0,0	0,01	ST
8,15-pimaradien-18-al	0,6	0,30	0,8	0,45	0,4	0,05	0,0	0,00	0,0	0,03	DT
19-Nor-4,8,11,13-abietatetraene	38,3	22,44	39,8	17,21	30,6	12,03	6,6	4,18	8,1	5,55	DT
pinocarvone	0,4	0,13	0,6	0,50	0,3	0,05	0,5	0,22	0,1	0,12	MT
caryophyllene oxide	5,1	1,21	6,9	2,86	3,5	0,09	4,8	2,41	0,6	1,64	ST
dehydroabietal	4,7	1,46	6,8	1,86	2,6	0,22	2,8	0,44	0,7	0,15	DT
pinocamphone	1,0	0,24	1,4	0,57	0,5	0,09	0,7	0,19	0,2	0,07	MT
myrtenol	5,0	1,75	6,3	4,84	1,9	0,46	3,4	1,07	0,4	0,44	MT
cis-pinocarveol	1,8	0,57	2,4	1,51	0,8	0,20	1,4	0,52	0,2	0,23	MT
8,11,13-abietatriene	1,1	0,34	1,6	0,57	0,7	0,21	0,7	0,19	0,1	0,02	DT
alpha-pinone	0,7	0,17	0,9	0,51	0,4	0,12	0,5	0,17	0,0	0,03	MT

borneol	10,6	3,86	12,4	6,12	3,4	0,52	5,4	1,75	0,5	0,87	MT
cis-verbenol	1,1	0,32	1,3	1,19	0,5	0,11	0,6	0,36	0,0	0,18	MT
oplopane	0,3	0,09	0,4	0,23	0,2	0,09	0,1	0,14	0,0	0,03	ST
verbenone	0,5	0,19	0,7	0,87	0,2	0,04	0,2	0,20	0,0	0,12	MT
methyl-camphenilol	4,5	1,31	6,7	2,41	2,9	0,50	1,7	0,26	0,8	0,17	MT
cis-isopinocampone	0,7	0,34	1,1	1,15	0,1	0,04	0,2	0,31	0,0	0,19	MT
manoyl oxide	6,1	4,51	9,2	5,31	0,6	0,31	0,7	0,95	0,4	0,45	DT
13-epimanool	2,7	1,59	3,6	2,05	0,6	0,46	0,3	0,28	0,2	0,12	DT
4-terpineol	0,5	0,14	0,6	0,21	0,3	0,08	0,2	0,08	0,2	0,00	MT

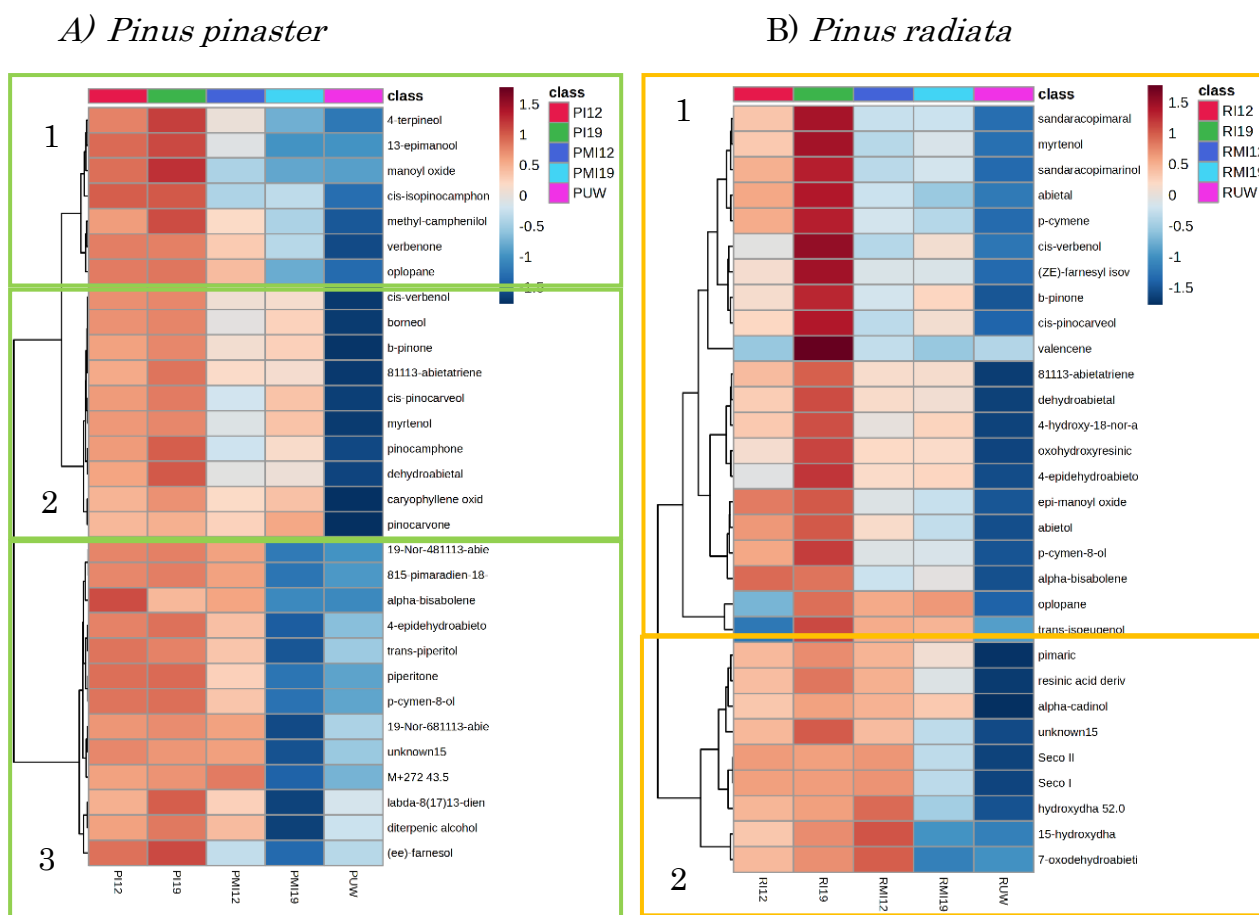
*Pinus radiata*

	I12		I19		MI12		MI19		UW <sup>a</sup>		G
	Avg <sup>b</sup>	St d <sup>b</sup>	Avg	St d	Avg	St d	Avg	St d	Avg	St d	
valencene	0,0	0,00	16,6	40,35	0,0	0,01	0,0	0,00	0,0	0,01	ST
cis-isopinocampone	3,3	2,38	15,7	10,32	1,1	0,26	1,9	0,29	1,0	0,24	MT
4-epidehydroabietol	1,7	0,97	6,7	1,17	2,0	0,62	2,1	0,50	0,4	0,34	DT
oxohydroxyresinic acid 51,9	47,3	22,23	140,8	64,81	48,2	11,46	51,6	30,23	15,3	21,61	DRA
4-hydroxy-18-nor-abietane	3,1	0,81	7,0	2,53	2,1	0,40	2,7	0,46	0,6	0,86	DT
dehydroabietal	16,4	3,72	36,4	8,79	14,4	3,99	13,5	3,22	2,8	0,60	DT
8,11,13-abietatriene	2,9	1,09	5,8	3,09	2,1	0,39	2,1	0,48	0,4	0,20	DT
alpha-bisabolene	2,5	1,83	1,4	0,86	0,3	0,07	0,3	0,06	0,1	0,09	ST
abietal	25,9	6,32	55,6	9,65	12,3	2,98	9,2	1,63	5,1	1,08	DT
epi-manoyl oxide	11,9	11,61	12,0	9,25	3,7	3,49	2,4	0,92	0,7	0,41	DT
cis-verbenol	0,8	0,47	4,5	2,59	0,5	0,14	0,8	0,17	0,2	0,01	MT
cis-pinocarveol	3,2	2,22	12,7	7,16	1,4	0,36	2,4	0,61	0,4	0,03	MT
Alpha-pinone	1,4	0,57	6,0	3,87	1,0	0,36	1,5	0,32	0,2	0,01	MT
p-cymene	8,2	1,04	18,5	2,69	4,0	0,94	3,2	0,43	1,3	0,19	MT
abietol	9,8	1,89	14,5	3,76	5,7	1,32	3,6	1,36	1,1	1,51	DT
p-cymen-8-ol	4,7	1,18	10,3	2,70	2,0	0,39	2,0	0,87	0,3	0,02	MT

sandaracopimarinol	5,2	1,86	10,2	1,30	2,5	0,88	2,9	1,14	1,0	0,05	DT
trans-4-thujanol	0,8	0,28	1,6	0,42	0,5	0,06	0,6	0,21	0,2	0,07	MT
(Z,E)-farnesyl isovalerate	5,3	2,85	24,1	13,62	3,6	0,68	3,6	0,95	1,3	0,16	ST
myrtenol	8,9	3,98	38,7	22,39	3,5	0,93	4,7	1,33	1,1	0,34	MT
sandaracopimaral	3,8	1,10	9,1	1,72	2,3	0,75	2,3	0,73	1,0	0,10	DT
oplopane	1,8	1,94	5,5	1,17	3,3	0,92	4,2	2,47	0,2	0,33	ST
7-oxodehydroabietic acid	1063	988,2	1403	802,8	2281	158,4	11,2	5,11	16	5,41	DRA
15-hydroxydehydroabietic acid	112	90,86	163,8	63,69	260	60,97	9,2	2,72	8,1	5,85	DRA
hydroxydehydroabietic acid 52,0	2270	1500,8	2841	1352	4290	227,9	303	122,4	42,3	16,05	DRA
Seco I acid	76,6	8,70	85,6	38,06	83,0	3,26	22,9	5,46	5,2	3,27	DRA
Seco II acid	69,5	6,24	75,1	35,78	71,5	7,08	21,7	4,81	4,4	0,53	DRA
unknown15	1,7	0,78	3,4	1,75	1,6	0,22	0,9	0,60	0,2	0,02	MT
alpha-cadinol	1,9	0,47	2,6	1,23	2,2	0,76	1,8	0,65	0,3	0,38	ST
resinic acid derivative 52,8	611,5	356,28	942,3	304,9	770,2	526,0	280,9	92,97	38,4	11,41	DRA
pimaric acid	825,6	120,50	1197	522,2	853,1	47,21	595	212,6	103,	3,17	DRA

<sup>a</sup> Datos de 12 y 19 dpi combinados.

<sup>b</sup> Media y desviación típica. Seco= 1,3-dimethyl-2-ethyl-(3-isopropylphenyl)-cyclohexencarboxilic



**Figura 29.** Heatmaps basados en el VIP score de los 30 terpenos principales en un modelo PLS-DA para *P. pinaster* (A) y *P. radiata* (B).

En el heatmap de *P. radiata* nos encontramos con dos grupos bien diferenciados que difieren respecto a su respuesta frente a la herida, especialmente a los 12 dpi. En esta especie sí encontramos DRAs formando parte de los terpenos seleccionados (Tabla 21) y alcanzan su mayor contenido en las plántulas inoculadas (en un rango de 47,3 a 2270,4  $\mu\text{g/g}$  de planta). Ninguna de las dos especies tiene un grupo formado exclusivamente por un solo grupo de terpenos.

Con el fin de estudiar los terpenos característicos de las plantas inoculadas respecto a las plantas inoculadas con agua destilada estéril, y su cambio en el tiempo, se construyeron y ajustaron cuatro modelos OPLS-DA (uno por especie y tiempo). Además, se construyeron dos modelos adicionales (uno por especie) para seleccionar los terpenos discriminantes para cada dpi. Los terpenos se seleccionaron mediante el S-plot en su respectivo modelo validado (Figura 30). Con el objetivo de evitar sesgos solo se seleccionaron aquellos terpenos significativos en la separación de clases y con una tasa de cambio (FC) superior a 2.



En *P. pinaster* se identificaron 9 y 8 terpenos a los 12 y 19 dpi respectivamente, los cuales son significativamente más abundantes en las plántulas infectadas por *F. circinatum* (entre 12 y 6 veces más a los 12 dpi y entre 5-2 veces más a los 19 dpi) (**Tabla 22**). Además, hay otros terpenos (thymol y citronellol (MTs), farnesyl isovalerate y alpha-cadinene (STs), y 19-Nor-6,8,11,13-abietatetraene y labda-8(17),13-dien-15-al (DTs)) los cuales tienen una alta correlación en el modelo OPLS-DA pero no muestran diferencias significativas entre las plántulas infectadas y las plántulas inoculadas con agua destilada estéril. En *P. radiata* hay algunos terpenos más abundantes en las plántulas infectadas (FC>10) a los 12 dpi, que son el 13-epimanol, el ácido resínico 49,4 y el ácido hidroxiabiético 51, 8 (estos dos últimos no identificados completamente), pero el contenido de todos los demás (todos ellos STs y DTs) disminuyen con la infección a los 12 dpi (FC<1) (**Tabla 22**). A los 19 dpi, el terpeno más abundante en las plántulas infectadas es el DRA ácido 7-oxodehidroabiético, con un FC=125. Algunos de los terpenos son comunes para ambas especies, pero son siempre más abundantes en *P. pinaster*. Estos son abieta-8(14),13(15)-diene, pimarol, 8,15-pimaradien-18-al, y labda-8(17),13E-dien-15-al (**Tabla 22**). Otros terpenos, como los ácidos 15-hidroxi y 7-oxo dehidroabiéticos (DRAs) y cis-isopinocampone (MT) están presentes de manera común en las plántulas de *P. pinaster* a los 12 dpi y *P. radiata* a los 19 dpi. Por último, al realizar un test ANOVA entre las medias de los terpenos discriminantes de los tratamientos (I, MI y UW) encontramos que el contenido de alguno de estos terpenos identificados también cambia en respuesta a la herida (**Figura 31**) y muestra además que no solo la infección, sino también la herida ocasiona la inhibición de algunos compuestos a los 12 dpi en *P. radiata*.

**Tabla 22.** Tasa de cambio (FC) de los terpenos discriminantes entre las plántulas infectadas por *F. circinatum* y las plántulas inoculadas con agua destilada estéril para *P. pinaster* y *P. radiata* a los 12 y 19 dpi. Se han seleccionado los distintos terpenos a partir de un S-plot derivado del modelo OPLS-DA. Los parámetros de validación para los modelos OPLS-DA fueron: R<sup>2</sup>Y=0,946 y Q<sup>2</sup>=0,901 con p=0,014 (*P. pinaster* a 12 dpi); R<sup>2</sup>Y=0,906 (p=0,028) y Q<sup>2</sup>=0,843 (p=0,015) (*P. pinaster* a 19 dpi); R<sup>2</sup>Y=0,932 (valor p=0,083) y Q<sup>2</sup>=0,870 (p=0,026) (*P. radiata* a 12 dpi); y R<sup>2</sup>Y=0,910 (p=0,007) y Q<sup>2</sup>=0,868 (p=0,007) (*P. radiata* a 19 dpi).

	infectadas (I) vs. herida (MI)	Grupo	FC (I/MI <sup>a</sup> )	log <sub>2</sub> FC	
<i>P. pinaster</i> 12 dpi	manoyl oxide	DT	12,3	3,616	
	cis-isopinocampone	MT	10,7	3,417	
	resinic acid 49.0	DRA	9,2	3,208	
	15-hydroxydehydroabietic	DRA	8,7	3,120	
	abietate-8(14),13(15)-diene	DT	7,7	2,945	
	bicyclogermacrene	ST	7,6	2,930	
	Seco I acid	DRA	7,5	2,911	
	7-oxodehydroabietic acid	DRA	6,6	2,715	
	13(16),14-labdien-8-ol	DT	6,4	2,688	
<i>P. pinaster</i> 19 dpi	p-cymen-8-ol	MT	5,2	2,388	
	manoyl oxide	DT	4,9	2,306	
	diterpenic alcohol	DT	4,7	2,220	
	pimarol	DT	4,5	2,185	
	abietol	DT	4,0	1,999	
	labda-8(17),13E-dien-15-al	DT	3,1	1,631	
	8,15-pimaradien-18-al	DT	2,3	1,193	
	isolongifolene	ST	2,1	1,087	
	<i>P. radiata</i> 12 dpi	resinic acid 49.4	DRA	59,0	5,884
13-epimanool		DT	11,8	3,560	
hydroxyabietic acid 51.8		DRA	9,7	3,284	
8,15-pimaradien-18-al		DT	0,16	-2,606	
beta-elemene		ST	0,16	-2,647	
labda-8(17),13E-dien-15-al		DT	0,14	-2,851	
15-isopimaradiene		DT	0,13	-2,963	
abietate-8(14),13(15)-diene		DT	0,12	-3,031	
beta-cubebene		ST	0,12	-3,052	
alpha-copaene		ST	0,11	-3,121	
pimarol		DT	0,11	-3,164	
alpha-amorphene		ST	0,09	-3,497	
alpha-cubebene		ST	0,02	-5,670	
<i>P. radiata</i> 19 dpi		7-oxodehydroabietic acid	DRA	125,1	6,967
		15-hydroxydehydroabietic	DRA	17,8	4,155
	hydroxydehydroabietic 52.0	DRA	9,3	3,225	
	myrtenol	MT	8,2	3,041	
	cis-isopinocampone	MT	8,0	3,008	
	alpha-terpinene	MT	7,2	2,854	
	alpha-cubebene	ST	6,8	2,773	
	abietal	DT	6,0	2,593	
	p-cymene	MT	5,7	2,511	

<sup>a</sup> Clases I: inoculada; MI: Inoculación con agua destilada estéril.

<sup>b</sup> NS= Valor no significativo a p=0.05

<i>Pinus pinaster</i> 12 dpi	I	MI	UW	<i>P. radiata</i> 12 dpi	I	MI	UW
manoyl oxide	a	b	b	resinic acid 49.4	a	b	c
cis-isopinocampone	a	b	b	13-epimanool	a	b	a
resinic acid 49.0	a	b	ab	hydroxyabietic acid 51.8	a	b	a
15-hydroxydehydroabietic	a	b	c	8,15-pimaradien-18-al	c	b	a
abieta-8(14),13(15)-diene	a	b	b	beta-elemene	c	b	a
bicyclogermacrene	a	b	b	labda-8(17),13E-dien-15-al	c	b	a
Seco I acid	a	b	b	15-isopimaradiene	b	a	a
7-oxodehydroabietic acid	a	b	c	abieta-8(14),13(15)-diene	b	a	b
13(16),14-labdien-8-ol	a	b	b	beta-cubebene	c	b	a
<i>P. pinaster</i> 19 dpi				alpha-copaene	b	a	a
p-cymen-8-ol	a	b	b	pimarol	c	b	a
manoyl oxide	a	b	b	alpha-amorphene	b	a	a
diterpenic alcohol	a	b	c	alpha-cubebene	b	a	a
pimarol	a	b	a	<i>P. radiata</i> 19 dpi			
abietol	a	b	a	7-oxodehydroabietic acid	a	b	b
labda-8(17),13E-dien-15-al	a	b	a	15-hydroxydehydroabietic acid	a	b	b
8,15-pimaradien-18-al	a	b	b	hydroxydehydroabietic ac 52.0	a	b	c
isolongifolene	a	b	a	myrtenol	a	b	c
				cis-isopinocampone	a	b	b
				alpha-terpinene	a	b	b
				alpha-cubebene	a	b	c
				abietal	a	b	c
				p-cymene	a	b	c

**Figura 31.** Significancia de los valores medios del contenido de los terpenos discriminantes entre plántulas infectadas y con inoculación con agua destilada estéril

Respecto al tiempo, en *P. pinaster* infectado por *F. circinatum* hay dos grupos de terpenos que discriminan entre los 12 y 19 dpi (**Tabla 23**). En un grupo, nos encontramos con el ácido citronélico, el ácido 7-oxodeshidroabietico y el abieta-8(14),13(15)-diene, los cuales se producen de manera más abundante a los 12 dpi ( $FC > 1$ ). En el segundo grupo, los terpenos son más abundantes a los 19 dpi ( $FC < 1$ ), en los cuales se incluyen algunos DRAs no identificados completamente. En *P. radiata*, todos los terpenos discriminantes se producen de manera más abundante a los 19 dpi (**Tabla 23**).

**Tabla 23.** Terpenos discriminantes entre los 12 y 19 dpi para las plántulas de *P. pinaster* y *P. radiata* infectadas por *F. circinatum*. Los distintos terpenos se han seleccionado a partir de un S-plot derivado de un modelo OPLS-DA, solo se eligieron aquellos con un  $\log_2(\text{FC}) > |2|$  y significativos en la separación de clases ( $p > 0,05$ ). Parámetros de validación para los modelos OPLS-DA:  $R^2Y=0,839$ ,  $p=0,016$  y  $Q^2=0,715$  con  $p=0,002$  para *P. pinaster*; y  $R^2Y=0,969$ ,  $p=0,002$  y  $Q^2=0,905$ ,  $p=0,002$  para *P. radiata*.

	12 dpi (I12) vs. 19 dpi (I19)	Grupo	FC (I12/I19)	Log <sub>2</sub> FC
<i>P. pinaster</i>	citronellic acid	MT	38,4	5,263
	7-oxodehydroabietic acid	DRA	10,7	3,426
	abieta-8(14),13(15)-diene	DT	8,7	3,124
	resinic acid 47.7	DRA	0,13	-2,923
	resinic acid 46.9	DRA	0,09	-3,552
	farnesyl isovalerate	ST	0,04	-4,707
	alpha-terpineol	MT	0,02	-5,981
	resinic acid 49.4	DRA	0,01	-6,557
<i>P. radiata</i>	trans-sabinene hydrate	MT	0,18	-2,506
	labda-8(17),13E-dien-15-al	DT	0,15	-2,727
	isolongifolene	ST	0,14	-2,855
	alpha-cubebene	ST	0,13	-2,969
	beta-cubebene	ST	0,12	-3,027
	15-isopimaradiene	DT	0,11	-3,132
	8,15-pimaradien-18-al	DT	0,11	-3,178
	alpha-amorphene	ST	0,10	-3,288
	verbenone	MT	0,10	-3,394
	alpha-cadinene	ST	0,09	-3,457
	pimarol	DT	0,08	-3,560
	delta-cadinene	ST	0,08	-3,613
	alpha-copaene	ST	0,08	-3,689
	beta-elemene	ST	0,05	-4,300
	beta-gurjunene	ST	0,03	-5,073

<sup>a</sup> clases I12 y I19, inoculadas a 12 y 19dpi, respectivamente

<sup>b</sup> NS= valor no significativo a  $p=0,05$

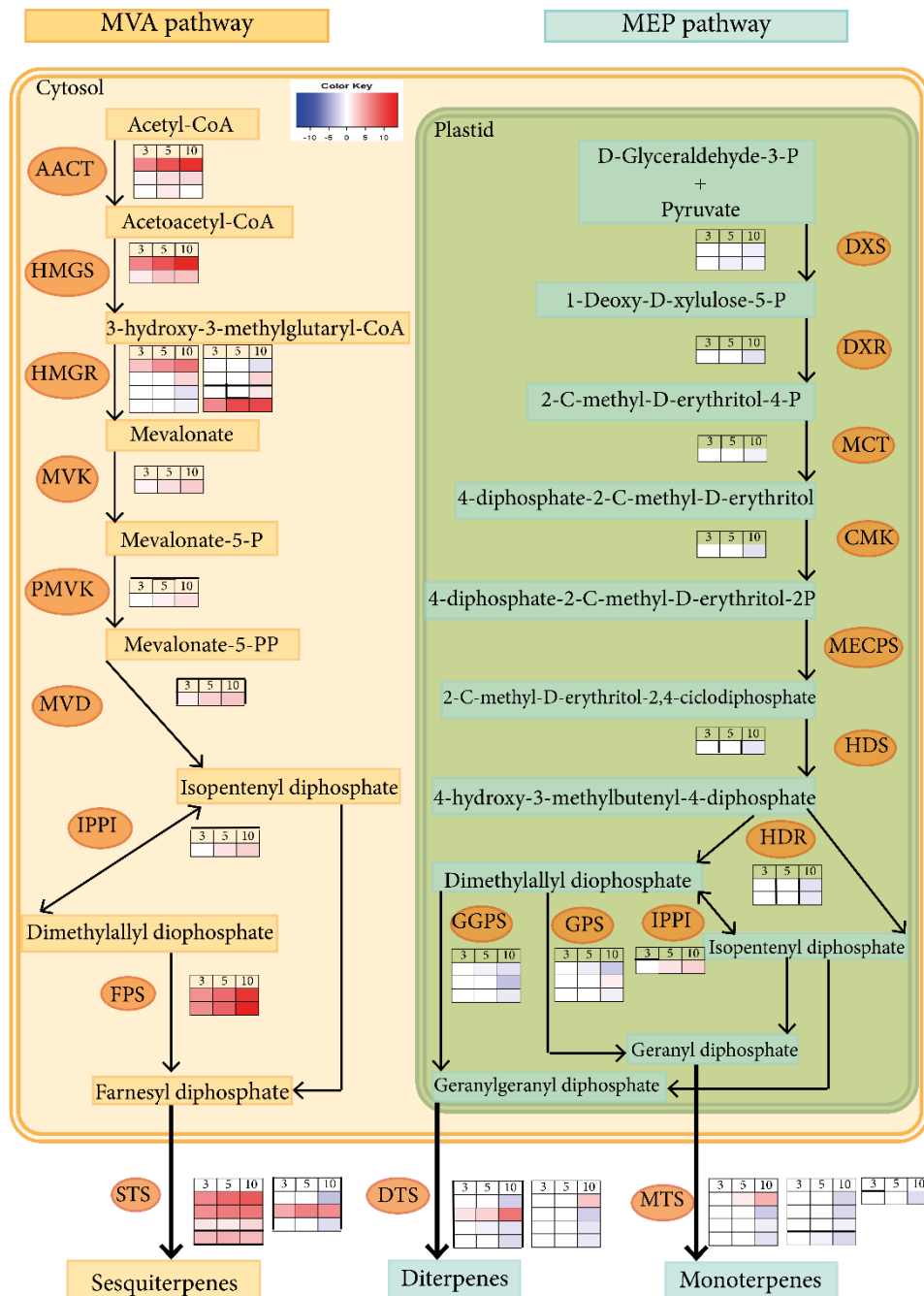
#### 4.3.4. Respuesta del perfil transcriptómico

##### 4.3.4.1. Identificación de genes relacionados con la síntesis de terpenos a partir de datos transcriptómicos de *Pinus pinaster* infectado por *Fusarium circinatum*

Se identificaron un total de 59 genes expresados diferencialmente (DEG) relacionados con la biosíntesis de terpenos a partir del transcriptoma de *P. pinaster* durante la infección por *F. circinatum* (BioProject PRJNA543723) a los 3, 5, y 10 dpi, obtenido anteriormente mediante un ensayo de RNA-seq dual (Hernandez-Escribano et al., 2020) (**Tabla 24**).

Se observa una inducción de la ruta MVA en la biosíntesis de precursores de terpenoides, así como de los genes relacionados con la síntesis de terpenoides y una inhibición de la ruta MEP y de genes relacionados con la síntesis de MTs y DTs (**Tabla 24**). Dentro de la ruta MVA se han encontrado 15 DEG, de los cuales 13 mostraron a los 10 dpi un incremento en su expresión y 2 una inhibición. Respecto a la ruta MEP, 4 genes estaban regulados negativamente a los 10 dpi. Respecto a los diferentes grupos de terpenos, nos encontramos a los 10 dpi con 5 genes regulados negativamente para MTs y la inhibición de la mayoría de los genes de los DTs. En cambio, la mayoría de los DEG para los STs están inducidos positivamente a los 10 dpi (**Figura 32**).

Por último, se ha encontrado un gen expresado diferencialmente en el transcriptoma de *F. circinatum* obtenido durante la infección de *P. pinaster*. Este gen fue anotado como *pentaneleno sintasa*, que cataliza la conversión de 2-trans,6-trans-farnesil difosfato al sesquiterpeno pentaleno.



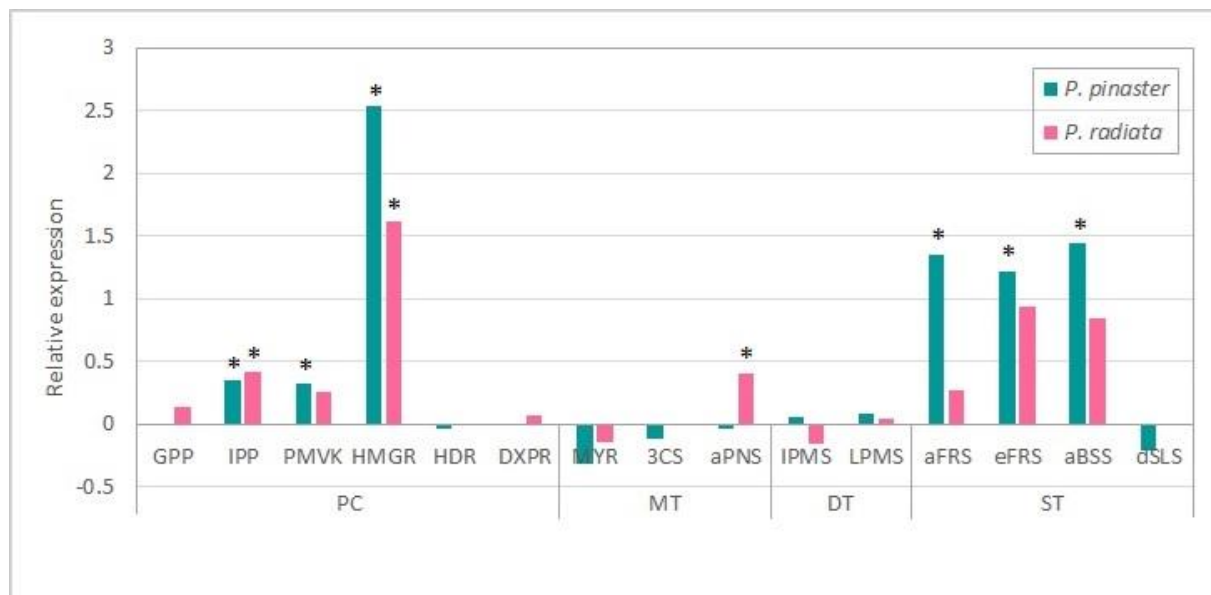
**Figura 32.** DEGs de las enzimas correspondientes en las vías MVA y MEP para la síntesis de terpenos identificadas en el transcriptoma de *P. pinaster* infectado por *F. circinatum*. Los heatmaps muestran los niveles relativos de expresión genética a los 3, 5 y 10 dpi.

**Tabla 24.** Genes expresados diferencialmente relacionados con la biosíntesis de terpenos identificados en el transcriptoma de *P. pinaster* durante la infección por *F. circinatum* a los 3, 5 y 10 días después de la inoculación.

GenBank ID	Enzima	Log2 FC		
		3 dpi	5 dpi	10 dpi
Ruta MVA				
GIBR01011662.1	acetyl-CoA acetyltransferase	0,55	1,79	2,14
GIBR01019493.1	acetyl-CoA acetyltransferase	0,00	1,03	0,00
GIBR01023709.1	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	6,41	9,25	12,91
GIBR01020327.1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthase	1,04	3,06	3,20
GIBR01003908.1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	3,03	5,75	7,34
GIBR01003731.1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	0,00	0,00	2,19
GIBR01003526.1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	0,00	0,00	-1,47
GIBR01000845.1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	0,00	0,00	-1,41
GIBR01012984.1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	0,00	0,00	2,20
GIBR01024060.1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	0,00	0,00	1,19
GIBR01014570.1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	6,12	9,77	9,98
GIBR01020600.1	Phosphomevalonate kinase	0,00	0,73	1,55
GIBR01007153.1	Diphosphomevalonate kinase	0,90	2,35	2,95
GIBR01010326.1	diphosphomevalonate decarboxylase	0,00	1,33	2,42
GIBR01011283.1	Mevalonate kinase	0,57	1,73	2,65
Ruta MEP				
GIBR01006179.1	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	0,00	0,00	-1,49
GIBR01019111.1	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	0,00	0,00	-1,13
GIBR01015821.1	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	0,00	0,00	-1,46
GIBR01008025.1	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	0,00	0,00	-1,27
Monoterpenos				

GIBR01002598.1	alpha-pinene synthase	0,00	1,06	3,99
GIBR01014919.1	alpha-pinene synthase	0,00	0,00	-2,62
GIBR01013221.1	alpha-pinene synthase	0,00	0,00	-1,58
GIBR01006549.1	alpha-pinene synthase	0,00	0,00	-2,24
GIBR01019315.1	2-methyl-3-buten-2-ol synthase	0,00	-0,67	-1,95
GIBR01013541.1	(+)-3-carene synthase	0,00	0,00	-1,80
Diterpenos				
GIBR01004577.1	Copalyl diphosphate synthase 1	0,00	0,00	-2,54
GIBR01014597.1	Monofunctional isopimaradiene synthase	1,33	2,25	7,31
GIBR01016591.1	ent-kaurene synthase	0,00	-0,57	-1,53
GIBR01010635.1	Monofunctional isopimaradiene synthase	0,00	0,00	-1,84
GIBR01013923.1	Monofunctional isopimaradiene synthase	0,00	0,00	2,92
GIBR01007972.1	Bifunctional levopimaradiene synthase	0,00	0,00	-2,53
GIBR01020605.1	Bifunctional levopimaradiene synthase	0,00	0,00	-1,29
GIBR01002780.1	Monofunctional isopimaradiene synthase	0,00	0,00	-1,14
GIBR01010761.1	abietadienol abietadienal	0,00	-0,90	-3,02
Sesquiterpenos				
GIBR01003798.1	Alpha-farnesene synthase	6,26	8,02	8,99
GIBR01014133.1	Alpha-farnesene synthase	5,91	7,02	7,22
GIBR01018017.1	Alpha-bisabolene synthase	1,29	1,26	2,13
GIBR01015392.1	Alpha-bisabolene synthase	3,64	4,22	3,68
GIBR01018349.1	longifolene synthase	0,00	0,00	-3,28
GIBR01012270.1	e-beta farnesene synthase	4,46	6,62	6,02
GIBR01002641.1	Delta-selinene synthase	0,00	0,00	-1,67
GIBR01003339.1	1(10),5-germacradien-4-ol synthase	0,00	0,00	-2,00

#### 4.3.4.2. Validación de los DEG identificados a partir de los datos del transcriptoma de *Pinus pinaster* infectado por *Fusarium circinatum* y expresión en *Pinus radiata*



**Figura 33.** Validación de los niveles de expresión relativos mediante RT-qPCR de los genes expresados diferencialmente identificados en el transcriptoma de *P. pinaster* infectado por *F. circinatum* y comparación con la expresión relativa en *P. radiata*.

Los genes se han seleccionado entre los identificados en la biosíntesis de precursores (PC), monoterpenos (MT), diterpenos (DT) y sesquiterpenos (ST). GPP: geranyl difosfato sintasa; IPP: isopentenil-difosfato Delta-isomerasa; PMVK: Fosfomevalonato; HMGR: hidroximetilglutaril-CoA reductasa; HDR: 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato reductasa; DXPR: 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa; MYR: mirceno sintasa; 3CS: 3-careno sintasa; aPNS:  $\alpha$ -pineno sintasa; IPMS: isopiramadieno sintasa; LPMS: levopimaradieno sintasa; aFRS:  $\alpha$ -farneseno sintasa, eFRS:  $\beta$ -farneseno sintasa; aBSS:  $\alpha$ -bisaboleno sintasa; dSLS:  $\delta$ -selineno sintasa. Para cada especie de pino, los niveles de expresión relativos se normalizan mediante su respectivo gen de referencia y se representan por log de los datos transformados de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $\log(FC)$ ). \* significa diferencias significativas entre los valores de las muestras inoculadas respecto a las muestras a las que se les ha realizado una inoculación con agua destilada estéril (t-student  $p \leq 0.05$ )

Para validar los niveles de expresión relativos en *P. pinaster*, se seleccionaron quince genes relacionados con la síntesis de terpenos y se determinó su expresión mediante RT-qPCR (**Figura 33**). Los niveles de expresión mostraron una tendencia similar a la observada a los 5 dpi en el transcriptoma. La inoculación con el patógeno provoca un aumento en la expresión de los genes relacionados con la

síntesis de precursores de terpenos en la ruta MVA (genes *HMGR* y *PVMK*) y de *IPPI* en *P. pinaster*. Además, también encontramos que tres de los genes relacionados con la síntesis de STs incrementaron su expresión (*aFRs*, *eFRS* y *aBSS*), mientras que no se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa de los genes relacionados con la síntesis de MTs y DTs a los 5 dpi (**Figura 33**). En *P. radiata*, la infección por el patógeno provocó la inducción de *IPPI* así como de un gen dentro de la ruta del MVA (*HMGR*). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes relacionados con la síntesis de ST y DTs pero sí se produjo la inducción del  $\alpha$ -pineno (*aPNS*) dentro de los MTs (**Figura 33**). Por último, los cebadores diseñados para los genes *3CS*, *dSLS* y *HDR* no superaron el umbral necesario de eficacia adecuada en la qPCR en *P. radiata* y *DXPR* falló en *P. pinaster*, por lo que se descartaron.



## 5. Discusión

### 5.1. Variación temporal y espacial de la estructura genética de la población española de *Fusarium circinatum*

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la variabilidad genética de *F. circinatum* se ha mantenido baja desde su establecimiento en la península e, incluso, ha disminuido en el tiempo (**Tabla 8**). Esta baja diversidad también se ha constatado en trabajos recientes (Ahmad & Diez, 2023), los cuales analizan las poblaciones del patógeno en las regiones españolas que no se han incluido en este estudio, concretamente en Cantabria y Castilla y León (Ahmad & Diez, 2023). Si bien este estudio no analiza los grupos de compatibilidad vegetativa existentes para el patógeno en el país, sí confirma la presencia de ambos grupos de apareamiento (MAT-1 y MAT-2), estando en Cantabria presente solamente MAT-2, al igual que en el País Vasco. La situación del patógeno en España, con una población mayoritariamente clonal y dominada por unos pocos haplotipos coincide con la descrita en numerosos estudios donde se analiza la situación en zonas donde el patógeno ha sido introducido (Ahmad & Diez, 2023; Ceriani et al., 2024; J. C. Correll, 1992; T. R. Gordon et al., 1996; Iturrutxa et al., 2012). Sin embargo, esta baja diversidad contrasta con la encontrada en otros países como Sudáfrica (Fru et al., 2023) donde, utilizando marcadores SRR, detectaron una población muy diversa en viveros y plantaciones de algunas zonas del país. En este estudio concluyeron que la reproducción del patógeno es fundamentalmente asexual, existiendo esta amplia diversidad debido a múltiples introducciones. Los marcadores SRR se han usado en numerosos estudios de genética de poblaciones ya que presenta ventajas técnicas respecto a otros (Oliveira & Azevedo, 2022). El ser regiones del genoma que tienen una rápida tasa de evolución los hace muy sensibles y posibilitan la identificación de sucesos demográficos y filogenéticos recientes, aunque debido a su hipervariabilidad hay que analizar con precaución los resultados obtenidos (Linde, 2010; Milgroom & Peever, 2003; Oliveira & Azevedo, 2022). Existen estudios de *F. circinatum* que han utilizado otras clases de marcadores moleculares como ITS (Ahmad & Diez, 2023), RFLPs (Wikler & Gordon, 2000) y AFLP (Iturrutxa, Ganley, et al., 2011) y todos concluyen que el mecanismo principal de reproducción del patógeno es asexual.

Los resultados que hemos obtenido evidencian que la población del patógeno está estructurada en dos grandes grupos, tal y como se observa claramente en la minimum spanning network (**Figura 17**) y en el dendrograma NJ (**Figura 18**). Esta estructura coincide con la descrita en Berbegal et al., (2013) y se confirma en las regiones no analizadas en este trabajo en Ahmad & Diez, (2023). Se demuestra que, actualmente, la población de la zona noreste del país está constituida por un solo haplotipo (MLG32) y un solo grupo de apareamiento (MAT-2), mientras que en la zona noroeste existe una mayor diversidad genética (aunque ésta ha disminuido con el tiempo), estando presentes ambos grupos de apareamiento y diferentes haplotipos, algunos de ellos identificados por primera vez (MLG101 y MLG102).

La distribución de la frecuencia de los MLGs (**Figura 15**), así como la minimum spanning network (**Figura 17**), muestran que la presencia del MLG32 ha aumentado y se ha extendido hacia el noroeste. Consecuentemente, en el dendrograma NJ elaborado con las regiones estratificadas en el tiempo (**Figura 19**) la población de Asturias del segundo muestreo se sitúa en el mismo grupo que la del País Vasco. Esto indica que el MLG32 es el haplotipo mejor adaptado a las condiciones existentes en la región, lo que es compatible con que continúe siendo el MLG único en el País Vasco después de diez años y que sea el único en Cantabria. Por otra parte, estudios previos que comparan algunas características patogénicas de aislados españoles (Elvira-Recuenco et al., 2021) demuestran que el aislado con haplotipo MLG32 es más virulento en *P. radiata* en un rango de temperatura de 25-30°C que otros, incluyendo el MLG59, el segundo más abundante del país. Además, también presenta una mayor producción y germinación de esporas.

La presencia de manera exclusiva del MLG32 en País Vasco, mantenida durante los 10 años entre un muestreo y otro, indica que la reproducción en esta región es asexual. Por otro lado, la existencia de tan solo dos VCGs en el País Vasco contribuye al intercambio de información genética, aunque de manera limitada, y facilita el mantenimiento de la identidad individual de los aislados (Rayner, 1991). Si analizamos la proporción de los VCGs en el tiempo en esta región, destaca el aumento de la presencia del VCG1 (de un 60% a un 97%), respecto del VCG 3 (**Tabla 14**), por lo que parece que el MLG32 con VCG1 tiene mayor capacidad de dispersión y es el que mejor adaptado está a las condiciones climáticas y al huésped respecto a otros haplotipos, reproduciéndose asexualmente. Asimismo, parece que la población del patógeno en País Vasco está aislada genéticamente y no existe flujo genético desde las regiones de Asturias y Galicia hacia ésta. Esto se ve confirmado

por el test de Mantel, el cual muestra que no existe migración entre las poblaciones (**Tabla 13**) y la comparación de la diversidad genética por pares entre poblaciones de distintas regiones.

La existencia de un único haplotipo en el País Vasco apoya la hipótesis ya sugerida por Berbegal et al., (2013) de que este aislado fue de los primeros introducidos y establecidos en el país y está bien adaptado a las condiciones ambientales. Independientemente de la primera notificación de la existencia del patógeno en Asturias (Landeras et al., 2005), los síntomas de PPC se observaron por primera vez en la década de 1990 en un vivero de País Vasco (Dwinell et al., 1998) y alguno de los aislados recolectados en ese momento se incluyeron en el análisis poblacional de Berbegal et al., (2013), confirmando que la población de País Vasco ya estaba únicamente compuesta por ese haplotipo en esa época. Además, en un estudio donde se analizaron aislados recolectados en 2004, utilizando AFLP como marcadores moleculares, se demostraba que la población del patógeno en la región era homogénea (Iturritxa, Ganley, et al., 2011), por lo que parece que aislados del patógeno con el haplotipo MLG32 se establecieron originariamente en esta región y, posteriormente, se extendió a otras regiones en el país o hubo nuevas introducciones.

La perdurabilidad de dos grupos bien diferenciados definiendo la estructura genética de la población durante el tiempo transcurrido entre ambos muestreos respalda que el método de reproducción de *F. circinatum* en España sea asexual. Los resultados observados en el AMOVA (**Tabla 11**) muestran que la variación genética se explica principalmente por las regiones, no por el tiempo, lo que respalda la idea de organismos clonales. No obstante, esta estructura no se mantiene cuando se realiza el AMOVA con el conjunto de datos después de hacer la corrección clonal. Posiblemente, esto se deba al pequeño tamaño de la población que obtenemos después de realizar la corrección clonal y destaca la importancia que tienen los clones en el análisis AMOVA.

La estructura de la población de *F. circinatum* presente en las regiones de Asturias y Galicia es más diversa en haplotipos y VCGs e incluye todos los aislados MAT-1 existentes (**Figura 17**, **Figura 18**). En estas regiones, la diversidad genética ha disminuido entre muestreos (**Tabla 8**), lo que sumado a los resultados del índice estandarizado de asociación (**Tabla 9**), los valores de  $P_{sex}$  asociados con los tres haplotipos más comunes dentro de las regiones y entre muestreos (**Tabla 10**), y la falta de significancia entre las proporciones de inmigrantes entre Asturias y

Galicia, sugieren la falta de apareamiento aleatorio y que la población se reproduce asexualmente.

El mayor número de MLGs y de VCGs en estas dos regiones hacen más probable la aparición e identificación de heterocariones, tal y como ha sucedido. Dos de los aislados del primer muestreo, uno para Asturias (de vivero) y otro para Galicia, poseen dos alelos microsatélites por *locus*. Estos heterocariones pueden haberse originado por anastomosis de las hifas o por autocruzamiento diploide, procesos no excluyentes entre sí (Moore-Landecker, 1972), lo cual es característico de algunos ascomicetos, helechos, algas y briófitos. Este último mecanismo es una vía de reproducción sexual, pero hay que distinguirlo claramente del outcrossing, el cual implica singamia de gametos meióticos procedentes de dos individuos distintos.

La detección de dos nuevos haplotipos en el muestreo 2, uno en Galicia y otro en Asturias, sugiere que se están produciendo procesos de fusión y/o recombinación hifal como los descritos anteriormente. No es probable que estos haplotipos hayan surgido a partir de nuevas introducciones, debido fundamentalmente a las fuertes restricciones y controles establecidos en la Unión Europea en 2007 con el fin de evitar el movimiento del patógeno y de material vegetal infectado, así como su entrada a territorio comunitario desde el exterior. Además, la falta de otros haplotipos en el País Vasco constituye una evidencia indirecta de la eficacia de estas regulaciones. Sin embargo, en un muestreo intensivo hecho en una plantación de *P. radiata* en el País Vasco (Hernandez-Escribano, Iturritxa, Elvira-Recuenco, et al., 2018) sí se ha encontrado la presencia de otro haplotipo, donde un aislado procedente de un chancro de árbol infectado presentó polimorfismo en el *locus* FCM-25, mostrando una longitud de 199 pb en lugar de 204 pb. Esto podría ser debido a la ocurrencia de una mutación natural o por autocruzamiento.

## 5.2. Respuesta defensiva de la planta y especialización del patógeno

En cuanto a los mecanismos de defensa de la planta en respuesta a estreses bióticos y abióticos, se considera que un mecanismo protector en las coníferas y en los pinos es la formación de los canales resiníferos y la producción de resina (Celedon & Bohlmann, 2019; Chen et al., 2019; Kim et al., 2010; Krokene et al., 2003; Krokene & Nagy, 2012). Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis demuestran que hubo mayor inducción de los canales resiníferos y de producción de resina en *P. radiata* que en *P. pinaster* en respuesta a la infección por *F. circinatum*. Al ser *P. radiata* una especie muy susceptible y *P. pinaster* moderadamente resistente,

los resultados obtenidos parecen contradecir la relación positiva generalmente aceptada de resistencia de la planta y respuesta relacionada con la resina.

La infección por *F. circinatum* indujo la formación de canales resiníferos tanto en el xilema como en el córtex de *P. radiata* mientras que en *P. pinaster* solo se indujo la formación en el xilema (**Figura 25**). Además, el efecto en el córtex en *P. radiata* solo fue inducido por el patógeno y no por la herida. Numerosos estudios indican que los canales resiníferos inducidos en respuesta a un estrés (Celedon & Bohlmann, 2019; Franceschi et al., 2005) o por la aplicación de metiljasmónico (López-Villamor et al., 2021) solo se forman en el xilema. Sin embargo, Barrows-Broadus y Dwinell., (1983) encontraron que los conductos inducidos frente a *F. circinatum* en el córtex de *P. virginiana* y *P. elliotii*, especies susceptibles al patógeno, eran más anchos que los de *P. taeda* y *P. serotina*, especies resistentes. Los resultados que hemos obtenido apuntan en esa dirección, demostrando que los conductos inducidos en el córtex de *P. radiata*, especie susceptible, no solo tienen mayor diámetro, sino también mayor densidad y el área conductiva total es mayor. A pesar de que se espera que los canales resiníferos estén directamente relacionados con la resistencia frente a los patógenos (Ferrenberg et al., 2014; Nagy et al., 2006; Vázquez-González et al., 2020), los resultados indican que el aumento de las características observadas de los canales resiníferos no están relacionadas con un aumento en la resistencia frente a *F. circinatum*, el cual utiliza estos canales para colonizar al huésped (Martín-Rodríguez et al., 2013). Además, esto es consistente con la dinámica de colonización de otros patógenos, como *Bursaphelenchus xylophilus*, el cual es capaz de utilizar los canales resiníferos de igual manera (Kawaguchi, 2006; Nunes da Silva et al., 2015; Rodríguez-García et al., 2023). La dinámica espacial por la que *F. circinatum* coloniza al huésped explica en gran medida el por qué la progresión de la enfermedad se ve favorecida por la existencia de un sistema de canales resiníferos que está íntimamente relacionado con la susceptibilidad o resistencia entre las distintas especies

Por otro lado, este es el primer estudio comparando la respuesta anatómica frente a dos aislados de *F. circinatum* con distinta virulencia, como son el aislado 7 (mas virulento) y el aislado 26. El aislado con mayor virulencia indujo mayor tamaño de los canales resiníferos del xilema en ambas especies, en comparación con los canales resiníferos inducidos por el aislado 26, demostrando así la estrecha relación del sistema resinífero en el huésped con su colonización y el progreso de la enfermedad. Aquí, el aislado 7 causó una mayor lesión a los 19 dpi que el aislado 26, aunque esta diferencia no fue significativa. Sin embargo, la virulencia de ambos

aislados ya ha sido comparada y confirmada previamente (Elvira-Recuenco et al., 2021; Iturritxa et al., 2012, 2013), demostrando que la longitud de la lesión en un periodo de tiempo más largo, la producción de esporas y la tasa de germinación de estas es mayor en el aislado 7. Además, la formación de los canales resiníferos traumáticos es una respuesta inducida que implica cambios en la división y diferenciación celular (Franceschi et al., 2005; Krokene & Nagy, 2012). En este proceso está implicada la señalización hormonal mediada por el ácido jasmónico y el etileno (Schmidt et al., 2011; Wang et al., 2002; Wasternack, 2007). El análisis previo del transcriptoma de *P. pinaster* obtenido durante la infección por *F. circinatum* (Hernandez-Escribano et al., 2020) revela la activación de genes relacionados con las vías de señalización de fitohormonas, las cuales incluyen el ácido jasmónico, el etileno y el ácido salicílico. En este trabajo se propone la hipótesis de que el patógeno manipula el equilibrio de las hormonas en el huésped mediante la expresión de genes fúngicos relacionados con estas (Hernandez-Escribano et al., 2020). Los resultados anatómicos que se han obtenido son compatibles con esta hipótesis, ya que genotipos distintos del patógeno pueden diferir en la expresión de genes fúngicos que modifican las vías de señalización fitohormonales en la planta, derivando finalmente en una variación en la formación de canales resiníferos.

El mayor aumento en la formación de canales resiníferos en *P. radiata* se vio acompañado de una mayor producción de resina, que fue 1,8 veces superior en *P. radiata* que en *P. pinaster* (Figura 27). Se ha observado previamente que el flujo de resina en la lesión después de la inoculación con *F. circinatum* es mayor en especies susceptibles (Enebak & Stanosz, 2003; Kim et al., 2010), que sugiere una falta del efecto protector de la resina inducida frente a este patógeno. En este trabajo hemos cuantificado el aumento total de la resina, separándolo de la respuesta a la herida. La infección aumentó significativamente los terpenos neutros (MTs, STs, DTs), cuyo contenido total fue mayor en *P. radiata* que en *P. pinaster*, por lo que se confirma que la abundancia de terpenos en especies del género *Pinus* no está relacionada con una mayor resistencia frente a *F. circinatum*.

Además, hemos determinado que los respectivos extractos de cada una de las resinas, inducida y constitutiva, no solo inhiben menos, sino que estimulan el crecimiento de *F. circinatum*. Existen numerosos estudios donde el efecto descrito de los terpenos de la resina es la inhibición del crecimiento micelial y la germinación de esporas de hongos fitopatógenos (Fraser et al., 2016; Guimarães et al., 2019; Marei et al., 2012; Savluchinske-Feio et al., 2006), aunque hay otros

estudios que han descrito que algunos hongos especializados, que crecen en ambientes ricos en terpenos, usan estos para promover su crecimiento. Este es el caso de *Heterobasidion parviporum* (Kusumoto et al., 2014) y de algunos de los hongos asociados con *Dendroctonus rufipennis* Kirby, 1837, el escarabajo del abeto, patógeno para algunas especies de *Picea* (Mason et al., 2015). Estudios previos sobre el efecto de algunos de los MTs más comunes de la resina de *P. radiata* sobre *F. circinatum* y *F. temperatum* (hongo no patógeno en coníferas muy cercano filogenéticamente a *F. circinatum*) han demostrado una mayor inhibición del crecimiento en *F. temperatum*, así como una menor tasa de germinación de las esporas (Slinski et al., 2015).

Nuestros resultados muestran que el extracto en hexano de la resina inducida de *P. radiata*, el cual contiene los terpenos neutros (MTs, STs y DTs), causa mayor inducción del crecimiento de *F. circinatum* que el de la resina constitutiva. Este hecho puede estar relacionado con la mayor susceptibilidad de *P. radiata* al patógeno. Los terpenos volátiles tienen actividad insecticida y fungicida (Hammerbacher et al., 2019; Phillips & Croteau, 1999), además, la resina inducida es más fungistática que la resina constitutiva debido a la modificación en su contenido de terpenos (Krokene et al., 2003; Paine & Stephen, 1987; Schuck, 1982). Sin embargo, los hongos también pueden utilizar los terpenos en su beneficio (Evidente & Mottats, 2002; Kusumoto et al., 2014). Hammerbacher et al., (2019) han estudiado los mecanismos por los cuales los patógenos superan la toxicidad de los terpenos volátiles, utilizándolos como fuente de nutrientes o destoxificándolos. *Grosmannia clavigera*, hongo asociado al escarabajo *Dendroctonus ponderosae* (Hammerbacher et al., 2019; Y. Wang et al., 2013, 2014) es capaz de utilizar el limoneno (MT) como fuente de carbono mediante su modificación enzimática (Y. Wang et al., 2014). Además, es capaz de superar la toxicidad de esta clase de compuestos al poseer un sistema de eflujo de MTs, manteniendo una baja concentración intracelular de estos (Y. Wang et al., 2013). El aumento del crecimiento de *F. circinatum* en presencia de algunos MTs sugiere que el patógeno es capaz de utilizarlos como fuente de carbono, ya que el medio de crecimiento empleado es pobre en nutrientes, aunque no se pueden descartar que estén implicados otros mecanismos para evitar la toxicidad de los MTs.

Al estudiar el efecto de la resina en otros hongos con diferentes estilos de vida, demostramos que la resina volátil de la constitutiva no tiene ningún efecto sobre los hongos ensayados (*Aureobasidium pullulans*, *Ophiostoma minus*) y *Phaeomoniella chlamydospora*). La resina constitutiva inhibe el ataque inicial de

organismos invasores (Phillips & Croteau, 1999), lo que puede explicar por qué los organismos que interactúan con las coníferas no se ven afectados por esta resina constitutiva ya que *A. pullulans* es un hongo saprofito y *O minus* es un hongo del azulado. Ambos organismos habitan en los pinos y probablemente estén adaptados para vivir en presencia de la resina constitutiva del pino. No se puede descartar un efecto inhibitorio de la resina inducida frente al hongo específico ya que esto no lo hemos estudiado. Por el contrario, el crecimiento de *F. circinatum* se ve favorecido por la resina (constitutiva e inducida), lo que sugiere que se trata de un patógeno especializado.

Los cambios en la composición de la resina inducida por la infección por *F. circinatum* difirió entre *P. pinaster* y *P. radiata*. En *P. pinaster* el mayor contenido en STs a los 12 dpi concuerda con los DEG identificados en los datos transcriptómicos. La expresión de dos genes *FPS* (**Figura 32**) está altamente inducida entre los 3 dpi y los 10 dpi. Por otro lado, la expresión de los genes *GPS* y *GGPS* está inhibida entre los 5 y 10 dpi. Las enzimas FPS catalizan la producción de farnesil difosfato, el cual es el sustrato para la biosíntesis de STs (**Figura 32**) y las enzimas GPS y GGPS catalizan la producción de geranil difosfato y geranilgeranil difosfato, precursores de los MTs y DTs respectivamente (Bohlmann et al., 1998). Consecuentemente con esto, se ha encontrado en este trabajo que los genes de todas las enzimas involucradas en la vía MVA se encuentran inducidas, mientras que aquellos involucrados en la vía MEP están regulados negativamente (**Figura 32**). La expresión de los genes codificantes para las enzimas sesquiterpenos sintasas también está inducida, con la excepción de los genes *alpha-longifoleno sintasa*, *delta-selineno sintasa*, y *1(10),5-germacradien-4-ol sintasa*, los cuales se inhibieron, pero solo a los 10 dpi. El difosfato de isopentenilo puede ser catalizado por la IPPI dando lugar a farnesil difosfato, geranil difosfato o geranilgeranil difosfato, los cuales están implicados en la biosíntesis de MTs, STs y DTs (Bai et al., 2020; Schmidt et al., 2011). En *P. pinaster* el *IPPI* se induce a los 5 y 10 dpi. Además, se determinó la expresión relativa de algunos genes en *P. radiata* a los 5 dpi encontrándose que los genes *IPPI* y *HMGR* de la vía MVA, así como una *alfa-pineno sintasa* estaban sobreexpresados. Aunque hay un desfase temporal entre la medición de la expresión génica y el contenido de terpenos, los resultados obtenidos parecen indicar una sobreexpresión de la ruta MVA, lo que aparentemente constituiría una contradicción para esta especie, con mayores contenidos en MTs y DTs que en *P. pinaster*. Sin embargo, el reducido número de genes para los que se ha determinado la expresión relativa en *P. radiata* por qPCR, limita el análisis

sobre la regulación de las rutas de síntesis en esta especie. Trabajos previos como el de Lombardero et al., (2019) determinaron que la infección de *F. circinatum* indujo cambios en el contenido de DT y MT en *P. radiata* pero no en *P. pinaster* respecto a las plantas sanas. Este estudio se realizó con el objetivo de estudiar las defensas de las plantas en respuesta a la interacción de *F. circinatum* y *Tomicus piniperda*, por lo que las diferencias metodológicas respecto a la inoculación y análisis de resultados podrían explicar las divergencias existentes entre nuestros resultados y los suyos. Además de los cambios en DTs y MTs en *P. radiata*, también encontramos variaciones en los niveles de DTs y STs en *P. pinaster*.

Por otro lado, *Tomicus piniperda* y otros insectos de la familia Scolytidae pueden actuar como vectores de dispersión de *F. circinatum*. El comportamiento de estos insectos se ve influenciado por la emisión de compuestos volátiles por parte de la planta. Por ejemplo, se ha estudiado en profundidad la síntesis *de novo* de feromonas de agregación o antiagregación por parte de algunos insectos de la familia Scolytidae, utilizando como precursores compuestos orgánicos volátiles (VOCs, *Volatile Organic Compounds*) emitidos por la planta (Blomquist et al., 2010) o incluso por microorganismos simbióticos de esta (Kandasamy et al., 2016; Zhao et al., 2015). Entre estos VOCs destacan especialmente los MTs como  $\alpha$ -pineno y mirceno, compuestos que forman parte de la oleorresina de las coníferas y que son transformados *in vivo* en diversas feromonas como ipsenol, ipsdienol y verbenol (Hendry et al., 1980). Cabe destacar, que los hongos asociados con estos insectos también son capaces de emitir VOCs, no solo por la síntesis *de novo* de estos, sino también mediante la transformación *in vivo* de metabolitos de la planta. Por ejemplo, se sabe que diversos hongos del orden Ophiostomatales asociados con *Dendroctonus ponderosae* Hopkins tienen la capacidad de utilizar limoneno como fuente de carbono para crecer, emitiendo VOCs en el proceso (Y. Wang et al., 2014). Por otro lado, el  $\alpha$ -pineno participa en la biosíntesis del verbenol, una feromona de agregación de insectos de la familia Scolytidae (Romón et al., 2008). Esta hormona se sintetiza *de novo* por los escarabajos utilizando los terpenos del huésped (Hendry et al., 1980) y, en algunos casos, por los hongos asociados a estos (Zhao et al., 2015). El incremento en el contenido de terpenos que hallamos en *P. radiata* (especie susceptible) y no en *P. pinaster* (especie moderadamente resistente), en respuesta a la infección por *F. circinatum* puede reflejar una mayor capacidad de dispersión del patógeno en esta especie asociada a los insectos vectores.

Las resinas constitutivas de *P. pinaster* y *P. radiata* difieren en los perfiles terpénicos. En respuesta a la herida y a la infección por el patógeno, ambas especies

sufrieron cambios cuantitativos y cualitativos que afectaron a la composición relativa de los terpenos individuales que forman parte de la resina. Hemos identificado un conjunto de terpenos comunes para *P. radiata* y *P. pinaster* correlacionados con la diferenciación de las plantas inoculadas respecto a las plantas a las inoculadas con agua destilada estéril (**Figura 30**). Sin embargo, estos terpenos disminuyeron en las plantas de *P. radiata* infectadas mientras que aumentaron en *P. pinaster*. Además, la mayor longitud de lesión detectada en *P. radiata* a los 12 dpi sugiere que estos terpenos (abieta-8(14),13(15)-dieno, pimarol, 8,15-pimaradien-18-al y labda-8(17),13E-dien-15-al, todos DTs) están implicados en la defensa del huésped y su mayor abundancia en *P. pinaster* podría explicar, en parte, su mayor resistencia. Los DTs juegan un papel importante en la defensa vegetal frente a microorganismos y artrópodos, puesto que son tóxicos para estos (López-Goldar et al., 2020) y están involucrados en la síntesis de DRAs. Por otro lado, se ha descrito el modo de acción de algunos DTs. Por ejemplo, el labdano (11E,13E)-labda-11,13-dieno-8 $\alpha$ ,15-diol contribuye a la activación de las reacciones inducidas por patógenos o heridas en las hojas de tabaco (Gnanasekaran et al., 2015). No se detectó el DT abieta-8(14),13(15)-dieno en la resina constitutiva de ninguna de las dos especies, pero se encontró en la resina inducida por la infección en *P. pinaster* y por la herida en *P. radiata*. No se conocen estudios previos que identifiquen terpenos en la resina inducida ausentes en la resina constitutiva ya que la mayoría de los trabajos estudian la variación de terpenos específicos en respuesta a un estrés específico (Kopaczyk et al., 2020; Lombardero et al., 2019; Trujillo-Moya et al., 2022) en lugar del estudio de perfiles de terpenos. Respecto a los DTs relacionados con pimarico, que es uno de los terpenos comunes a ambas especies y que discriminan plantas inoculadas de las de herida, encontramos a partir del análisis de RNA-seq, que la interacción entre *P. pinaster*-*F. circinatum* provocó una inducción en la expresión de los genes que codifican para la enzima pimaradiene sintasa a los 3 dpi y isopimara-1,15-diene sintasa a los 10 dpi. Estas enzimas participan en la síntesis de pimaradieno y ácido isopimárico, respectivamente. Se ha estudiado previamente el efecto del ácido isopimárico inhibiendo la germinación de esporas de *Ophiostoma ips* y afecta a los hábitos de alimentación de las larvas de *Lymantria dispar* (Gnanasekaran et al., 2015).

Por último, la mayor resistencia de *P. pinaster* puede en parte explicarse también por una respuesta más rápida en la abundancia de terpenos frente a *F. circinatum*. Esto se puede observar en los heatmaps (**Figura 29**), los cuales muestran una imagen general de los terpenos más importantes en la diferenciación entre las

plantas infectadas, las plantas con herida y las plantas sanas. También se deduce una respuesta más temprana de *P. pinaster* al comparar los terpenos discriminantes entre las plantas infectadas y las plantas inoculadas con agua destilada estéril que son comunes a ambas especies (Tabla 22). Entre estos compuestos encontramos el ácido 15-hidroxideshidroabiético, el ácido 7-oxodeshidroabiético y el cis-isopinocanfeno, los cuales aumentaron en *P. pinaster* a los 12 dpi y a los 19 dpi en *P. radiata*. Finalmente, encontramos la evidencia más notable de la rápida respuesta de *P. pinaster* en la comparación de la significancia de los terpenos en las plantas infectadas a los 12 y 19 dpi. Tres terpenos fueron más abundantes en *P. pinaster* a los 12 dpi los cuales son el ácido citronélico, ácido 7-oxodeshidroabiético y abieta-8(14),13(15)-dieno, estos dos últimos se identificaron también en otros análisis, por lo que parece confirmarse su participación en la resistencia a la enfermedad. En *P. radiata*, todos los terpenos identificados fueron más abundantes a los 19 dpi, lo que indica una respuesta más lenta en presencia del patógeno. En trabajos previos se ha relacionado una respuesta temprana ante la infección por *F. circinatum* con especies resistentes como *P. tecunumanii* (Visser et al., 2019), *P. pinea* (Zamora-Ballesteros et al., 2021) y *P. pinaster* (Hernandez-Escribano et al., 2020). Estos estudios transcriptómicos muestran que la regulación fitohormonal ocurre antes en huéspedes resistentes que en huéspedes susceptibles, lo cual indica que la respuesta de la defensa mediada por auxinas, etileno y ácidos jasmónico y salicílico es probablemente fundamental frente al patógeno (Hernandez-Escribano et al., 2020; Visser et al., 2019). Los resultados aquí mostrados sugieren que la biosíntesis temprana de terpenos específicos en la resina inducida es igual de importante en la resistencia del huésped.

Por lo tanto, *F. circinatum* es un patógeno especializado, con un mayor crecimiento en las plantas susceptibles asociado con una mayor formación de canales resiníferos y una mayor producción de resina, es decir, se ha demostrado que *F. circinatum* utiliza las defensas vegetales basadas en la resina en su propio beneficio. Además, los resultados presentados muestran que la resina estimula el crecimiento de *F. circinatum* en lugar de inhibirlo tal como se postulaba en trabajos anteriores (Barrows-Broadus & Dwinell, 1983; Slinski et al., 2015). La resina (constitutiva e inducida), acumulada y almacenada en los canales resiníferos, constituye un importante mecanismo de defensa en las coníferas al poseer un efecto inhibitor o tóxico frente a organismos invasores (Celedon & Bohlmann, 2019; Keeling & Bohlmann, 2006; Phillips & Croteau, 1999). Sin

embargo, aquí demostramos que *F. circinatum* aprovecha la resina inducida y constitutiva para su crecimiento, lo que puede afectar positivamente a su capacidad para utilizar los canales resiníferos del huésped como vía para invadir y colonizar los tejidos de este.

## 6. Conclusiones

En conclusión, los resultados presentados sobre la estructura genética de *F. circinatum* en España, así como su variación espacial y temporal, pueden explicarse mayoritariamente por la reproducción asexual del patógeno, aunque también abren la posibilidad de que el autocruzamiento sea posible y responsable del surgimiento de los nuevos haplotipos identificados. El haplotipo MLG32 se ha mantenido en el tiempo y está distribuido ampliamente en el norte del país, aumentando su frecuencia entre los muestreos. Esto sugiere su buena adaptación a las condiciones climáticas existentes y al huésped. El País Vasco continúa siendo una región diferenciada respecto al resto de zonas estudiadas en este trabajo, donde el patógeno tiene presencia. La nula evidencia de migración con las otras regiones, la baja diversidad genética en el área y la falta de nuevos haplotipos confirman este hecho y son una evidencia indirecta del correcto funcionamiento de las medidas de erradicación y control del patógeno en la región y dentro del territorio comunitario de la Unión Europea, establecidas con el fin de evitar la dispersión de *F. circinatum*.

Respecto al efecto de la resina en *F. circinatum*, demostramos que tanto la fracción volátil como la fracción no volátil de la resina inducida y constitutiva de *P. pinaster* y *P. radiata* estimulan el crecimiento del patógeno, lo que puede explicar la capacidad de este para crecer en los conductos de resina, constitutivos y traumáticos. Los canales resiníferos inducidos en respuesta a la infección, tanto del córtex como del xilema de *P. radiata*, son mayores en diámetro, densidad y área conductiva total respecto a los de *P. pinaster*. En general, las características estudiadas de los canales resiníferos están directamente correlacionadas con la resistencia frente a los organismos invasores. Sin embargo, observamos que los canales resiníferos son mayores en *P. radiata*, especie más susceptible a *F. circinatum*.

*F. circinatum* creció más en presencia del extracto volátil (que contiene MTs, STs y DTs) de la resina inducida de *P. radiata*, que podría reflejar la mayor susceptibilidad de esta especie respecto a *P. pinaster*. Además, determinamos el efecto de algunos de los terpenos que forman parte de la resina, siendo el alfa-pineno y el citronelol capaces de promover el crecimiento del patógeno, mientras que el resto de los compuestos no tuvieron ningún efecto o inhibieron el crecimiento

fúngico. La comparación entre los perfiles terpénicos de *P. pinaster* y *P. radiata* revela diferencias en la composición de la resina constitutiva e inducida, tanto en respuesta a la herida como a la infección por el patógeno. Se identificaron cuatro DTs que son comunes pero que se producen frente al patógeno de manera más abundante en *P. pinaster* que en *P. radiata* (abieta-8(14),13(15)-dieno, pimarol, 8,15-pimaradien-18-al y labda-8(17),13E-dien-15-al), lo que sugiere que estos terpenos están involucrados en la defensa de la planta. Además, la diferencia en el perfil terpénico entre especies sugiere una respuesta más rápida en *P. pinaster*, lo que podría explicar al menos en parte, su mayor resistencia a la enfermedad. Finalmente, la interacción transcriptómica de *P. pinaster-F. circinatum* mostró una regulación positiva de los genes participantes en la vía del mevalonato y de las sesquiterpeno sintasas, que concuerda con la mayor producción de STs medida en *P. pinaster*.

## Bibliografía

- Aegerter, B. J., & Gordon, T. R. (2006). Rates of pitch canker induced seedling mortality among *Pinus radiata* families varying in levels of genetic resistance to *Gibberella circinata* (anamorph *Fusarium circinatum*). *Forest Ecology and Management*, *235*(1), 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.07.011>
- Agapow, P.-M., & Burt, A. (2001). Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, *1*(1–2), 101–102. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2000.00014.x>
- Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Armengol, J., García-Jiménez, J., & Berbegal, M. (2012). Efficacy of hot water treatment to reduce the incidence of *Fusarium circinatum* on *Pinus radiata* seeds. *Forestry*, *85*(5), 629–635.
- Ahmad, F., & Diez, J. J. (2023). Spanish ecological battleground: Population structure of two invasive fungi, *Cryphonectria parasitica* and *Fusarium circinatum*. *Frontiers in Plant Science*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1310254>
- Alabouvette, C., Olivain, C., & Steinberg, C. (2006). Biological Control of Plant Diseases: The European Situation. *European Journal of Plant Pathology*, *114*(3), 329–341. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-0233-0>
- Alicandri, E., Paolacci, A. R., Osadolor, S., Sorgonà, A., Badiani, M., & Ciaffi, M. (2020). On the Evolution and Functional Diversity of Terpene Synthases in the *Pinus* Species: A Review. *Journal of Molecular Evolution*, *88*(3), 253–283. <https://doi.org/10.1007/s00239-020-09930-8>
- Alonso, R., & Bettucci, L. (2009). First report of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum* affecting *Pinus taeda* seedlings in Uruguay. *Australasian Plant Disease Notes*, *4*(1), 91–92. <https://doi.org/10.1071/DN09039>
- Alvarez-Castellanos, P. P., Bishop, C. D., & Pascual-Villalobos, M. J. (2001). Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry*, *57*(1), 99–102. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00461-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00461-1)
- Andrews, R. E., Parks, L. W., & Spence, K. D. (1980). Some Effects of Douglas Fir Terpenes on Certain Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, *40*(2), 301–304. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC291570/>
- Anuario de Estadística Forestal 2020*. (n.d.). Retrieved 16 August 2023, from [https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/estadisticas/forestal\\_anuario\\_2020.html](https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/estadisticas/forestal_anuario_2020.html)

- Arnaud-Haond, S., Duarte, C. M., Alberto, F., & Serrão, E. A. (2007). Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, *16*(24), 5115–5139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03535.x>
- Arnold, A. E., Mejia, L. C., Kyllö, D. A., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, R. K., & Herre, E. A. (2003). *Fungal Endophytes Limit Pathogen Damage in a Tropical Tree*. <http://repository.si.edu/xmlui/handle/10088/2206>
- Arrabal, C., Cortijo, M., Simón, B. F. de, García-Vallejo, M. C., & Cadahía, E. (2002). *Pinus pinaster Oleoresin in Plus Trees*. *56*(3), 261–266. <https://doi.org/10.1515/HF.2002.043>
- Ayres, M. P., & Lombardero, M. J. (2000). Assessing the consequences of global change for forest disturbance from herbivores and pathogens. *Science of the Total Environment*, *262*(3), 263–286. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00528-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00528-3)
- Azcón-Aguilar, C., Jaizme-Vega, M. C., & Calvet, C. (2002). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In S. Gianinazzi, H. Schüepp, J. M. Barea, & K. Haselwandter (Eds.), *Mycorrhizal Technology in Agriculture: From Genes to Bioproducts* (pp. 187–197). Birkhäuser. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8117-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8117-3_15)
- Backman, P. A., & Sikora, R. A. (2008). Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, *46*(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.03.009>
- Bai, Q., He, B., Cai, Y., Lian, H., & Zhang, Q. (2020). Transcriptomic and metabolomic analyses reveal several critical metabolic pathways and candidate genes involved in resin biosynthesis in *Pinus massoniana*. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, *295*(2), 327–341. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01624-1>
- Bannan, M. W. (1936). Vertical Resin Ducts in the Secondary Wood of the Abietineae. *New Phytologist*, *35*(1), 11–46. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1936.tb06864.x>
- Barrows-Broadbent, J., & Dwinell, L. (1983). Histopathology of *Fusarium moniliforme* var. *Subglutinans* in four species of southern pines. *Phytopathology*, *73*(6), 882–889.
- Berbegal, M., Landeras, E., Sánchez, D., Abad-Campos, P., Pérez-Sierra, A., & Armengol, J. (2015). Evaluation of *Pinus radiata* seed treatments to control *Fusarium circinatum*: Effects on seed emergence and disease incidence. *Forest Pathology*, *45*(6), 525–533. <https://doi.org/10.1111/efp.12204>
- Berbegal, M., Pérez-Sierra, A., Armengol, J., & Grünwald, N. J. (2013). Evidence for multiple introductions and clonality in Spanish populations of *Fusarium circinatum*. *Phytopathology*, *103*(8), 851–861. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-12-0281-R>
- Bezós, D., Martínez-Alvarez, P., Fernández, M., & Diez, J. J. (2017). Epidemiology and management of Pine Pitch Canker disease in Europe—A review. *Baltic*

- Forestry*, 23(1), 279–293.  
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173295916>
- Bhar, A., Chakraborty, A., & Roy, A. (2022). Plant Responses to Biotic Stress: Old Memories Matter. *Plants*, 11(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.3390/plants11010084>
- Billiard, S., López-Villavicencio, M., Hood, M. E., & Giraud, T. (2012). Sex, outcrossing and mating types: Unsolved questions in fungi and beyond. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(6), 1020–1038.  
<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02495.x>
- Blakeslee, G. M., Jokela, E. J., Hollis, C. H., Wilson, D. S., Lante, W. D., & Allen, J. E. (1999). Pitch Canker in Young Loblolly Pines: Influence of Precommercial Thinning and Fertilization on Disease Incidence and Severity. *Southern Journal of Applied Forestry*, 23(3), 139–143.  
<https://doi.org/10.1093/sjaf/23.3.139>
- Blakeslee, G., Oak, S., Gregory, W., & Moses, C. (1978). Natural association of *Fusarium moniliforme* var. *Subglutinans* with *Pissodes nemorensis*. *Phytopathology News*, 12, 208.
- Blank, L., Martín-García, J., Bezos, D., Vettraino, A. M., Krasnov, H., Lomba, J. M., Fernández, M., & Diez, J. J. (2019). Factors Affecting the Distribution of Pine Pitch Canker in Northern Spain. *Forests*, 10(4), Article 4.  
<https://doi.org/10.3390/f10040305>
- Blomquist, G. J., Figueroa-Teran, R., Aw, M., Song, M., Gorzalski, A., Abbott, N. L., Chang, E., & Tittiger, C. (2010). Pheromone production in bark beetles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(10), 699–712.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.07.013>
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., & Croteau, R. (1998). Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4126–4133.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4126>
- Boutrot, F., & Zipfel, C. (2017). Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 55(Volume 55, 2017), 257–286.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106>
- Bragança, H., Diogo, E., Moniz, F., & Amaro, P. (2009). First Report of Pitch Canker on Pines Caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. *Plant Disease*, 93(10), 1079–1079. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1079A>
- Britz, H., Couhnhho, T. A., Gordon, T. R., & Wingfield, M. J. (2001). Characterisation of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, from Mexico. *South African Journal of Botany*, 67(4), 609–614.  
[https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)31190-X](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)31190-X)
- Britz, H., Coutinho, T. A., Wingfield, M. J., & Marasas, W. F. (2002). Validation of the description of *Gibberella circinata* and morphological differentiation of the anamorph *Fusarium circinatum*. *Literature Review: Taxonomy and*

- Population Genetics of Fusarium Subglutinans Sensu Lato on Pine and Mango*, 69.
- Britz, H., Coutinho, T., Wingfield, B., Marasas, W., & Wingfield, M. (2005). Diversity and differentiation in two populations of *Gibberella circinata* in South Africa. *Plant Pathology*, *54*(1), 46–52.
- Broadbudd, J. B.-. (1985). Branch Dieback and Cone and Seed Infection Caused by *Fusarium moniliforme* var. *Subglutinans* in a Loblolly Pine Seed Orchard in South Carolina. *Phytopathology*, *75*(10), 1104. <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-1104>
- Broadbudd, J. B.-. (1990). Colonization of Cones and Seed of Loblolly Pine Following Inoculation with *Fusarium subglutinans*. *Plant Disease*, *74*(12), 1002. <https://doi.org/10.1094/PD-74-1002>
- Brown, A. H. D., Feldman, M. W., & Nevo, E. (1980). Multilocus structure of natural populations of *hordeum spontaneum*. *Genetics*, *96*(2), 523–536. <https://doi.org/10.1093/genetics/96.2.523>
- Bruvo, R., Michiels, N. K., D'Souza, T. G., & Schulenburg, H. (2004). A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology*, *13*(7), 2101–2106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02209.x>
- C, K., & Jf, L. (1988). Nitrate reduction mutants of *fusarium moniliforme* (*gibberella fujikuroi*). *Genetics*, *118*(3). <https://doi.org/10.1093/genetics/118.3.417>
- Calama, R., Martínez, C., Gordo, J., Del Río, M., Menéndez-Miguélez, M., & Pardos, M. (2023). The impact of climate and management on recent mortality in *Pinus pinaster* resin-tapped forests of inland Spain. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, cpad023. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpad023>
- Carey, W. A., Oak, S. W., & Enebak, S. A. (2005). Pitch canker ratings of longleaf pine clones correlate with *Fusarium circinatum* infestation of seeds and seedling mortality in containers. *Forest Pathology*, *35*(3), 205–212. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2005.00404.x>
- Carlucci, A., Colatruglio, L., & Frisullo, S. (2007). First Report of Pitch Canker Caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Plant Disease*, *91*(12), 1683–1683. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-12-1683C>
- Celedon, J. M., & Bohlmann, J. (2019). Oleoresin defenses in conifers: Chemical diversity, terpene synthases and limitations of oleoresin defense under climate change. *New Phytologist*, *224*(4), 1444–1463. <https://doi.org/10.1111/nph.15984>
- Ceriani, C., Wingfield, M. J., Fru, F., van Wyk, S., Rodas, C., Wingfield, B. D., & Steenkamp, E. T. (2024). Clonality and limited population diversity of *Fusarium circinatum* in Colombia. *Forest Pathology*, *54*(3), e12864. <https://doi.org/10.1111/efp.12864>

- Chakravarty, P., & Unestam, T. (1987a). Differential Influence of Ectomycorrhizae on Plant Growth and Disease Resistance in *Pinus sylvestris* Seedlings. *Journal of Phytopathology*, *120*(2), 104–120. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1987.tb04423.x>
- Chakravarty, P., & Unestam, T. (1987b). Mycorrhizal Fungi Prevent Disease in Stressed Pine Seedlings. *Journal of Phytopathology*, *118*(4), 335–340. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1987.tb00464.x>
- Chen, R., He, X., Chen, J., Gu, T., Liu, P., Xu, T., Teale, S. A., & Hao, D. (2019). Traumatic Resin Duct Development, Terpenoid Formation, and Related Synthase Gene Expression in *Pinus massoniana* Under Feeding Pressure of *Monochamus alternatus*. *Journal of Plant Growth Regulation*, *38*(3), 897–908. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9900-1>
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, *124*(4), 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>
- Christidis, N., & Stott, P. A. (2022). Human influence on seasonal precipitation in Europe. *Journal of Climate*, *35*(15), 5215–5231.
- Correll, J. C. (1992). Genetic Diversity in California and Florida Populations of the Pitch Canker Fungus *Fusarium subglutinans* f. Sp. *Pini*. *Phytopathology*, *82*(4), 415. <https://doi.org/10.1094/Phyto-82-415>
- Correll, J. C., Gordon, T. R., McCain, A. H., Fox, J. W., Koehler, C. S., Wood, D. L., & Schultz, M. E. (1991). Pitch canker disease in California: Pathogenicity, distribution, and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Disease*, *75*(7), 676–682. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19912309990>
- Correll, J., Klittich, C., & Leslie, J. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology*, *77*(12), 1640–1646.
- Coutinho, T. A., Steenkamp, E. T., Mongwaketsi, K., Wilmot, M., & Wingfield, M. J. (2007). First outbreak of pitch canker in a South African pine plantation. *Australasian Plant Pathology*, *36*(3), 256–261. <https://doi.org/10.1071/AP07017>
- Dale, V. H., Joyce, L. A., McNulty, S., Neilson, R. P., Ayres, M. P., Flannigan, M. D., Hanson, P. J., Irland, L. C., Lugo, A. E., Peterson, C. J., Simberloff, D., Swanson, F. J., Stocks, B. J., & Wotton, B. M. (2001). Climate Change and Forest Disturbances: Climate change can affect forests by altering the frequency, intensity, duration, and timing of fire, drought, introduced species, insect and pathogen outbreaks, hurricanes, windstorms, ice storms, or landslides. *BioScience*, *51*(9), 723–734. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0723:CCAFD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0723:CCAFD]2.0.CO;2)
- de Wit, P. J. G. M. (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*(21), 2726–2732. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7284-7>

- Deller, S., Hammond-Kosack, K. E., & Rudd, J. J. (2011). The complex interactions between host immunity and non-biotrophic fungal pathogens of wheat leaves. *Journal of Plant Physiology*, *168*(1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.05.024>
- Dray, S., & Dufour, A.-B. (2007). The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software*, *22*, 1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v022.i04>
- Drenkhan, R., Ganley, B., Martín-García, J., Vahalík, P., Adamson, K., Adamčíková, K., Ahumada, R., Blank, L., Bragança, H., Capretti, P., Cleary, M., Cornejo, C., Davydenko, K., Diez, J. J., Lehtijärvi, H. T. D., Dvořák, M., Enderle, R., Fourie, G., Georgieva, M., ... Mullett, M. S. (2020). Global Geographic Distribution and Host Range of *Fusarium circinatum*, the Causal Agent of Pine Pitch Canker. *Forests*, *11*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/f11070724>
- Dvořák, M., Janoš, P., Botella, L., Rotková, G., & Zas, R. (2017). Spore Dispersal Patterns of *Fusarium circinatum* on an Infested Monterey Pine Forest in North-Western Spain. *Forests*, *8*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/f8110432>
- Dwinell, L. (1978). Susceptibility of Southern Pines to Infection by *Fusarium-Moniliforme-Var-Subglutinans*. *Plant Disease Reporter*, *62*(2), 108–111. <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:A1978ER96400004?SID=EUW1ED0A97bjNf6cJXR3hBhUIabG1>
- Dwinell, L., Adams, D., Guerra-Santos, J., & Aguirre, J. (1998). *Pitch canker disease of Pinus radiata*. 9–16.
- Dwinell, L. D. (1985). Pitch Canker: A Disease Complex of Southern Pines. *Plant Disease*, *69*(3), 270. <https://doi.org/10.1094/PD-69-270>
- Dwinell, L. D. (1998). Global distribution of the pitch canker fungus. *Current and Potential Impacts of Pitch Canker in Radiata Pine: Proceedings of the IMPACT Monterey Workshop, Monterey, California*. <https://www.fs.usda.gov/research/treesearch/2220>
- Dwinell, L. D., & Phelps, W. R. (1977). Pitch Canker of Slash Pine in Florida. *Journal of Forestry*, *75*(8), 488–489. <https://doi.org/10.1093/jof/75.8.488>
- Dyshko, V., Hilszczańska, D., Davydenko, K., Matić, S., Moser, W. K., Borowik, P., & Oszako, T. (2024). An Overview of Mycorrhiza in Pines: Research, Species, and Applications. *Plants*, *13*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/plants13040506>
- Elvira-Recuenco, M., Cacciola, S. O., Sanz-Ros, A. V., Garbelotto, M., Aguayo, J., Solla, A., Mullett, M., Drenkhan, T., Oskay, F., Aday Kaya, A. G., Iturritxa, E., Cleary, M., Witzell, J., Georgieva, M., Papazova-Anakieva, I., Chira, D., Paraschiv, M., Musolin, D. L., Selikhovkin, A. V., ... Díez, J. J. (2020). Potential Interactions between Invasive *Fusarium circinatum* and Other

- Pine Pathogens in Europe. *Forests*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/f11010007>
- Elvira-Recuenco, M., Iturritxa, E., Majada, J., Alia, R., & Raposo, R. (2014). Adaptive Potential of Maritime Pine (*Pinus pinaster*) Populations to the Emerging Pitch Canker Pathogen, *Fusarium circinatum*. *PLOS ONE*, *9*(12), e114971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114971>
- Elvira-Recuenco, M., Pando, V., Berbegal, M., Manzano Muñoz, A., Iturritxa, E., & Raposo, R. (2021). Influence of Temperature and Moisture Duration on Pathogenic Life History Traits of Predominant Haplotypes of *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. In Spain. *Phytopathology*®, *111*(11), 2002–2009. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-20-0445-R>
- Enebak, S. A., & Stanosz, G. R. (2003). Responses of conifer species of the Great Lakes region of North America to inoculation with the pitch canker pathogen *Fusarium circinatum*. *Forest Pathology*, *33*(5), 333–338. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2003.00334.x>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2006). *EPPO Reporting Service*, *24*(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1994.tb01369.x>
- Evidente, A., & Mottats, A. (2002). Bioactive metabolites from phytopathogenic bacteria and plants. *Studies in Natural Products Chemistry*, *26*, 581–628.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, *131*(2), 479–491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>
- Eyles, A., Bonello, P., Ganley, R., & Mohammed, C. (2010). Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytologist*, *185*(4), 893–908. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03127.x>
- Faccoli, M., & Schlyter, F. (2007). Conifer phenolic resistance markers are bark beetle antifeedant semiochemicals. *Agricultural and Forest Entomology*, *9*(3), 237–245. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2007.00339.x>
- Farjon, A. (2021). *Pines: Drawings and descriptions of the genus Pinus*. Brill.
- Fernández de Simón, B., Sanz, M., Cervera, M. T., Pinto, E., Aranda, I., & Cadahía, E. (2017). Leaf metabolic response to water deficit in *Pinus pinaster* Ait. Relies upon ontogeny and genotype. *Environmental and Experimental Botany*, *140*, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.05.017>
- Ferrenberg, S., Kane, J. M., & Mitton, J. B. (2014). Resin duct characteristics associated with tree resistance to bark beetles across lodgepole and limber pines. *Oecologia*, *174*(4), 1283–1292. <https://doi.org/10.1007/s00442-013-2841-2>
- Férriz, M., Martín-Benito, D., Fernández-de-Simón, M. B., Conde, M., García-Cervigón, A. I., Aranda, I., & Gea-Izquierdo, G. (2023). Functional phenotypic plasticity mediated by water stress and [CO<sub>2</sub>] explains

- differences in drought tolerance of two phylogenetically close conifers. *Tree Physiology*, *43*(6), 909–924. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpad021>
- Fox, J. W., Wood, D. L., Koehler, C. S., & O’Keefe, S. T. (1991). ENGRAVER BEETLES (SCOLYTIDAE: IPS SPECIES) AS VECTORS OF THE PITCH CANKER FUNGUS, FUSARIUM SUBGLUTINANS. *The Canadian Entomologist*, *123*(6), 1355–1367. <https://doi.org/10.4039/Ent1231355-6>
- Franceschi, V. R., Krokene, P., Christiansen, E., & Krekling, T. (2005). Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist*, *167*(2), 353–376. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01436.x>
- Fraser, S., Martín-García, J., Perry, A., Kabir, M. S., Owen, T., Solla, A., Brown, A. V., Bulman, L. S., Barnes, I., Hale, M. D., Vasconcelos, M. W., Lewis, K. J., Doğmuş-Lehtijarvi, H. T., Markovskaja, S., Woodward, S., & Bradshaw, R. E. (2016). A review of Pinaceae resistance mechanisms against needle and shoot pathogens with a focus on the Dothistroma–Pinus interaction. *Forest Pathology*, *46*(5), 453–471. <https://doi.org/10.1111/efp.12201>
- Fru, F. F., Wingfield, M. J., Roux, J., & Steenkamp, E. T. (2023). High diversity and clonality are hallmarks of *Fusarium circinatum* in South Africa. *Plant Pathology*, *72*(1), 39–52. <https://doi.org/10.1111/ppa.13644>
- Ganley, R. J., Watt, M. S., Manning, L., & Iturrityxa, E. (2009). A global climatic risk assessment of pitch canker disease. *Canadian Journal of Forest Research*, *39*(11), 2246–2256. <https://doi.org/10.1139/X09-131>
- Garbelotto, M., Smith, T., & Schweigkofler, W. (2008). Variation in Rates of Spore Deposition of *Fusarium circinatum*, the Causal Agent of Pine Pitch Canker, Over a 12-Month-Period at Two Locations in Northern California. *Phytopathology*, *98*(1), 137–143. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-1-0137>
- Gnanasekaran, T., Vavitsas, K., Andersen-Ranberg, J., Nielsen, A. Z., Olsen, C. E., Hamberger, B., & Jensen, P. E. (2015). Heterologous expression of the isopimaric acid pathway in *Nicotiana benthamiana* and the effect of N-terminal modifications of the involved cytochrome P450 enzyme. *Journal of Biological Engineering*, *9*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13036-015-0022-z>
- Gordon, T. R. (2006). Pitch Canker Disease of Pines. *Phytopathology*, *96*(6), 657–659. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0657>
- Gordon, T. R., Okamoto, D., Storer, A. J., & Wood, D. L. (1998). Susceptibility of Five Landscape Pines to Pitch Canker Disease, Caused by *Fusarium subglutinans* f. Sp. *Pini*. *HortScience*, *33*(5), 868–871. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.33.5.868>
- Gordon, T. R., Storer, A. J., & Okamoto, D. (1996). Population structure of the pitch canker pathogen, *Fusarium subglutinans* f. Sp. *Pini*, in California. *Mycological Research*, *100*(7), 850–854. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80033-5](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80033-5)

- Gordon, T. R., Storer, A. J., & Wood, D. L. (2001). The Pitch Canker Epidemic in California. *Plant Disease*, *85*(11), 1128–1139. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.11.1128>
- Gordon, T. R., Swett, C. L., & Wingfield, M. J. (2015). Management of Fusarium diseases affecting conifers. *Crop Protection*, *73*, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.018>
- Gordon, T., Wood, D., & Storer, A. (2000). Survival of *Fusarium circinatum* and its insect vectors in recently cut pitch canker infected trees. *California Department of Forestry and Fire Protection: Sacramento, CA, USA*.
- Greenberg, J. T., & Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, *6*(3), 201–211. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00361.x>
- Grünwald, N. J., Goodwin, S. B., Milgroom, M. G., & Fry, W. E. (2003). Analysis of Genotypic Diversity Data for Populations of Microorganisms. *Phytopathology*, *93*(6), 738–746. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2003.93.6.738>
- Guerra-Santos, J. (1999). *Pitch canker on Monterey pine in Mexico*. 58–61.
- Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(13), 2471. <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>
- Guo, R., Li, G., Zhang, Z., & Peng, X. (2022). Structures and Biological Activities of Secondary Metabolites from *Trichoderma harzianum*. *Marine Drugs*, *20*(11), 701. <https://doi.org/10.3390/md20110701>
- Halary, S., Malik, S.-B., Lildhar, L., Slamovits, C. H., Hijri, M., & Corradi, N. (2011). Conserved meiotic machinery in *Glomus* spp., a putatively ancient asexual fungal lineage. *Genome Biology and Evolution*, *3*, 950–958. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr089>
- Hammerbacher, A., Coutinho, T. A., & Gershenzon, J. (2019). Roles of plant volatiles in defence against microbial pathogens and microbial exploitation of volatiles. *Plant, Cell & Environment*, *42*(10), 2827–2843. <https://doi.org/10.1111/pce.13602>
- Hansen, E. M., Lewis, K. J., & Chastagner, G. A. (1997). *Compendium of conifer diseases*. APS Press St. Paul.
- Heath, M. C. (1997). Signalling between Pathogenic Rust Fungi and Resistant or Susceptible Host Plants. *Annals of Botany*, *80*(6), 713–720. <https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0507>
- Hedrick, P. W. (2005). A STANDARDIZED GENETIC DIFFERENTIATION MEASURE. *Evolution*, *59*(8), 1633–1638. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01814.x>
- Hendry, L. B., Piatek, B., Browne, L. E., Wood, D. L., Byers, J. A., Fish, R. H., & Hicks, R. A. (1980). In vivo conversion of a labelled host plant chemical to

- pheromones of the bark beetle *Ips paraconfusus*. *Nature*, *284*(5755), Article 5755. <https://doi.org/10.1038/284485a0>
- Hepting, G. H., & Roth, E. R. (1946). Pitch canker, a new disease of some Southern Pines. *Journal of Forestry*, *44*(10), 742–744. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19460602721>
- Hepting, G. H., & Roth, E. R. (1953). Host relations and spread of the pine pitch canker disease. *Phytopathology*, *43*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20057008251>
- Hernandez-Escribano, L., Iturritxa, E., Aragonés, A., Mesanza, N., Berbegal, M., Raposo, R., & Elvira-Recuenco, M. (2018). Root Infection of Canker Pathogens, *Fusarium circinatum* and *Diplodia sapinea*, in Asymptomatic Trees in *Pinus radiata* and *Pinus pinaster* Plantations. *Forests*, *9*(3), 128. <https://doi.org/10.3390/f9030128>
- Hernandez-Escribano, L., Iturritxa, E., Elvira-Recuenco, M., Berbegal, M., Campos, J. A., Renobales, G., García, I., & Raposo, R. (2018). Herbaceous plants in the understory of a pitch canker-affected *Pinus radiata* plantation are endophytically infected with *Fusarium circinatum*. *Fungal Ecology*, *32*, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.12.001>
- Hernandez-Escribano, L., Visser, E. A., Iturritxa, E., Raposo, R., & Naidoo, S. (2020). The transcriptome of *Pinus pinaster* under *Fusarium circinatum* challenge. *BMC Genomics*, *21*(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6444-0>
- Herron, D. A., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., Rodas, C. A., Marincowitz, S., & Steenkamp, E. T. (2015). Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. *Studies in Mycology*, *80*(1), 131–150. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.12.001>
- Hoover, K., Wood, D. L., Fox, J. W., & Bros, W. E. (1995). Quantitative and seasonal association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f. Sp. *Pini* with *Conophthorus radiatae* (Coleoptera: Scolytidae) and *Ernobius punctulatus* (Coleoptera: Anobiidae) which infest *Pinus radiata*. *The Canadian Entomologist*, *127*(1), 79–91. <https://doi.org/10.4039/Ent12779-1>
- Hudgins, J. W., Christiansen, E., & Franceschi, V. R. (2004). Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: A phylogenetic perspective. *Tree Physiology*, *24*(3), 251–264. <https://doi.org/10.1093/treephys/24.3.251>
- Inman, A. R., Kirkpatrick, S. C., Gordon, T. R., & Shaw, D. V. (2008). Limiting Effects of Low Temperature on Growth and Spore Germination in *Gibberella circinata*, the Cause of Pitch Canker in Pine Species. *Plant Disease*, *92*(4), 542–545. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-4-0542>
- Iturritxa, E., Desprez-Loustau, M. L., García-Serna, I., Quintana, E., Mesanza, N., & Aitken, J. (2011). Effect of alternative disinfection treatments against fungal canker in seeds of *Pinus radiata*. *Seed Technology*, 88–110.

- Iturritxa, E., Ganley, R. J., Raposo, R., García-Serna, I., Mesanza, N., Kirkpatrick, S. C., & Gordon, T. R. (2013). Resistance levels of Spanish conifers against *Fusarium circinatum* and *Diplodia pinea*. *Forest Pathology*, *43*(6), 488–495. <https://doi.org/10.1111/efp.12061>
- Iturritxa, E., Ganley, R. J., Wright, J., Heppe, E., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., & Wingfield, M. J. (2011). A genetically homogenous population of *Fusarium circinatum* causes pitch canker of *Pinus radiata* in the Basque Country, Spain. *Fungal Biology*, *115*(3), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.12.014>
- Iturritxa, E., Mesanza, N., Elvira-Recuenco, M., Serrano, Y., Quintana, E., & Raposo, R. (2012). Evaluation of genetic resistance in *Pinus* to pitch canker in Spain. *Australasian Plant Pathology*, *41*(6), 601–607. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0160-4>
- Iturritxa, E., Trask, T., Mesanza, N., Raposo, R., Elvira-Recuenco, M., & Patten, C. L. (2017). Biocontrol of *Fusarium circinatum* Infection of Young *Pinus radiata* Trees. *Forests*, *8*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/f8020032>
- Jombart, T. (2008). adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *24*(11), 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jones, J., Sun, X., Eckhardt, L., Weber, A., Hess, N., Barnett, J., & McGilvary, J. (2002). Longleaf seedling production: Some problems and their solutions. *Louisiana Agriculture*, *45*(3), 4–11.
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, *2*, e281. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
- Kandasamy, D., Gershenson, J., & Hammerbacher, A. (2016). Volatile Organic Compounds Emitted by Fungal Associates of Conifer Bark Beetles and their Potential in Bark Beetle Control. *Journal of Chemical Ecology*, *42*(9), 952–969. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0768-x>
- Kane, J. M., & Kolb, T. E. (2010). Importance of resin ducts in reducing ponderosa pine mortality from bark beetle attack. *Oecologia*, *164*(3), 601–609. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1683-4>
- Kanzler, A., Nel, A., & Ford, C. (2014). Development and commercialisation of the *Pinus patula* × *P. tecunumanii* hybrid in response to the threat of *Fusarium circinatum*. *New Forests*, *45*(3), 417–437. <https://doi.org/10.1007/s11056-014-9412-1>
- Kawaguchi, E. (2006). Relationship between the Anatomical Characteristics of Cortical Resin Canals and Migration of *Bursaphelenchus xylophilus* in Stem Cuttings of *Pinus thunbergii* Seedlings. *Journal of the Japanese Forest Society*, *88*(4), 240–244. <https://doi.org/10.4005/jjfs.88.240>

- Kayihan, G. C., Huber, D. A., Morse, A. M., White, T. L., & Davis, J. M. (2005). Genetic dissection of fusiform rust and pitch canker disease traits in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics*, *110*(5), 948–958. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1915-2>
- Keeling, C. I., & Bohlmann, J. (2006). Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *The New Phytologist*, *170*(4), 657–675. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01716.x>
- Kelley, W. D. (1982). Incidence of Pitch Canker Among Clones of Loblolly Pine in Seed Orchards. *Plant Disease*, *66*(1), 1171. <https://doi.org/10.1094/PD-66-1171>
- Kerényi, Z., Zeller, K., Hornok, L., & Leslie, J. F. (1999). Molecular Standardization of Mating Type Terminology in the *Gibberella fujikuroi* Species Complex. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(9), 4071–4076. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99743/>
- Kim, K.-W., Lee, I.-J., Kim, C.-S., Eom, I.-Y., Choi, J.-W., Lee, D.-K., & Park, E.-W. (2010). Resin Flow, Symptom Development, and Lignin Biosynthesis of Two Pine Species in Response to Wounding and Inoculation with *Fusarium circinatum*. *The Plant Pathology Journal*, *26*(4), 394–401. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2010.26.4.394>
- Kobayashi, T., & Muramoto, M. (1989). Pitch canker of *Pinus luchuensis*, a new disease in Japanese forest. *Forest Pests*, *38*(10), 169–173. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1572261549584299776>
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Kopaczyk, J. M., Warguła, J., & Jelonek, T. (2020). The variability of terpenes in conifers under developmental and environmental stimuli. *Environmental and Experimental Botany*, *180*, 104197. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104197>
- Krokene, P., & Nagy, N. E. (2012). Anatomical aspects of resin-based defences in pine. *Pine Resin: Biology, Chemistry and Applications*, 67–86. [https://www.researchgate.net/profile/Paal-Krokene/publication/273322679\\_Anatomical\\_aspects\\_of\\_resin-based\\_defences\\_in\\_pine/links/54febeb70cf2672e2240396a/Anatomical-aspects-of-resin-based-defences-in-pine.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Paal-Krokene/publication/273322679_Anatomical_aspects_of_resin-based_defences_in_pine/links/54febeb70cf2672e2240396a/Anatomical-aspects-of-resin-based-defences-in-pine.pdf)
- Krokene, P., Solheim, H., Krekling, T., & Christiansen, E. (2003). Inducible anatomical defense responses in Norway spruce stems and their possible role in induced resistance. *Tree Physiology*, *23*(3), 191–197. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.3.191>
- Kück, U., & Pöggeler, S. (2009). Cryptic sex in fungi. *Fungal Biology Reviews*, *23*(3), 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.10.004>

- Kuhlman, E. G., Dwinell, L. D., Nelson, P. E., & Booth, C. (1978). Characterization of the *Fusarium* Causing Pitch Canker of Southern Pines. *Mycologia*, *70*(6), 1131–1143. <https://doi.org/10.1080/00275514.1978.12020330>
- Kusumoto, N., Zhao, T., Swedjemark, G., Ashitani, T., Takahashi, K., & Borg-Karlson, A.-K. (2014). Antifungal properties of terpenoids in *Picea abies* against *Heterobasidion parviporum*. *Forest Pathology*, *44*(5), 353–361. <https://doi.org/10.1111/efp.12106>
- Kvas, M., Marasas, W. F. O. (Walter F. O., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., & Steenkamp, E. T. (2009). *Diversity and evolution of Fusarium species in the Gibberella fujikuroi complex*. <https://repository.up.ac.za/handle/2263/13444>
- Landeras, E., García, P., Fernández, Y., Braña, M., Fernández-Alonso, O., Méndez-Lodos, S., Pérez-Sierra, A., León, M., Abad-Campos, P., Berbegal, M., Beltrán, R., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2005). Outbreak of Pitch Canker Caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. In Northern Spain. *Plant Disease*, *89*(9), 1015–1015. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1015A>
- Lee, J. K., Lee, S.-H., Yang, S.-I., & Lee, Y.-W. (2000). First Report of Pitch Canker Disease on *Pinus rigida* in Korea. *The Plant Pathology Journal*, *16*.
- Lee, Y.-S., Kim, J., Lee, S.-G., Oh, E., Shin, S.-C., & Park, I.-K. (2009). Effects of plant essential oils and components from Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) on growth and morphogenesis of three phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *93*(3), 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.02.002>
- Leslie, J. F. (1993). Fungal Vegetative Compatibility. *Annual Review of Phytopathology*, *31*(1), 127–150. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.001015>
- Linde, C. C. (2010). Population genetic analyses of plant pathogens: New challenges and opportunities. *Australasian Plant Pathology*, *39*(1), 23–28. <https://doi.org/10.1071/AP09061>
- Liu, B., Liu, Q., Zhou, Z., Yin, H., Xie, Y., & Wei, Y. (2021). Two terpene synthases in resistant *Pinus massoniana* contribute to defence against *Bursaphelenchus xylophilus*. *Plant, Cell & Environment*, *44*(1), 257–274. <https://doi.org/10.1111/pce.13873>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lombardero, M. J., Solla, A., & Ayres, M. P. (2019). Pine defenses against the pitch canker disease are modulated by a native insect newly associated with the invasive fungus. *Forest Ecology and Management*, *437*, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.01.041>
- López-Goldar, X., Lundborg, L., Borg-Karlson, A. K., Zas, R., & Sampedro, L. (2020). Resin acids as inducible chemical defences of pine seedlings against

- chewing insects. *PLOS ONE*, *15*(5), e0232692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232692>
- López-Villamor, A., Zas, R., Pérez, A., Cáceres, Y., Nunes da Silva, M., Vasconcelos, M., Vázquez-González, C., Sampedro, L., & Solla, A. (2021). Traumatic resin ducts induced by methyl jasmonate in *Pinus* spp. *Trees*, *35*(2), 557–567. <https://doi.org/10.1007/s00468-020-02057-9>
- Luchi, N., Ma, R., Capretti, P., & Bonello, P. (2005). Systemic induction of traumatic resin ducts and resin flow in Austrian pine by wounding and inoculation with *Sphaeropsis sapinea* and *Diplodia scrobiculata*. *Planta*, *221*(1), 75–84. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1414-3>
- Ludwig, J. A., & Reynolds, J. F. (1988). *Statistical ecology: A primer in methods and computing* (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Lundborg, L., Sampedro, L., Borg-Karlson, A.-K., & Zas, R. (2019). Effects of methyl jasmonate on the concentration of volatile terpenes in tissues of Maritime pine and Monterey pine and its relation to pine weevil feeding. *Trees*, *33*(1), 53–62. <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1757-1>
- Manso, A. F., Castilla y León. Junta, & Maíllo, A. S. (2004). *El pino radiata (Pinus radiata): Manual de gestión forestal sostenible*. Junta de Castilla y León. <https://books.google.es/books?id=owfMPQAACAAJ>
- Marei, G. I. Kh., Abdel Rasoul, M. A., & Abdelgaleil, S. A. M. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *103*(1), 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.03.004>
- Martínez-Álvarez, P., Fernández-González, R. A., Sanz-Ros, A. V., Pando, V., & Diez, J. J. (2016). Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biological Control*, *94*, 1–10.
- Martínez-Álvarez, P., Pando, V., & Diez, J. J. (2014). Alternative species to replace Monterey pine plantations affected by pitch canker caused by *Fusarium circinatum* in northern Spain. *Plant Pathology*, *63*(5), 1086–1094. <https://doi.org/10.1111/ppa.12187>
- Martínez-Álvarez, P., Vainio, E. J., Botella, L., Hantula, J., & Diez, J. J. (2014). Three mitovirus strains infecting a single isolate of *Fusarium circinatum* are the first putative members of the family Narnaviridae detected in a fungus of the genus *Fusarium*. *Archives of Virology*, *159*, 2153–2155.
- Martínez-Hidalgo, P., García, J. M., & Pozo, M. J. (2015). Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Micromonospora* strains isolated from root nodules. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 922.
- Martín-García, J., Zas, R., Solla, A., Woodward, S., Hantula, J., Vainio, E. J., Mullett, M., Morales-Rodríguez, C., Vannini, A., Martínez-Álvarez, P., Pinto, G., Alves, A., Amaral, J., Wingfield, M. J., Fourie, G., Steenkamp, E. T., Ahumada, R., Šerá, B., Sanz-Ros, A. V., ... Diez, J. J. (2019). Environmentally friendly methods for controlling pine pitch canker. *Plant Pathology*, *68*(5), 843–860. <https://doi.org/10.1111/ppa.13009>

- Martín-Rodrigues, N., Espinel, S., Sanchez-Zabala, J., Ortíz, A., González-Murua, C., & Duñabeitia, M. K. (2013). Spatial and temporal dynamics of the colonization of *Pinus radiata* by *Fusarium circinatum*, of conidiophora development in the pith and of traumatic resin duct formation. *New Phytologist*, *198*(4), 1215–1227. <https://doi.org/10.1111/nph.12222>
- Martín-Rodrigues, N., Sanchez-Zabala, J., Salcedo, I., Majada, J., González-Murua, C., & Duñabeitia, M. K. (2015). New insights into radiata pine seedling root infection by *Fusarium circinatum*. *Plant Pathology*, *64*(6), 1336–1348. <https://doi.org/10.1111/ppa.12376>
- Mason, C. J., Klepzig, K. D., Kopper, B. J., Kersten, P. J., Illman, B. L., & Raffa, K. F. (2015). Contrasting Patterns of Diterpene Acid Induction by Red Pine and White Spruce to Simulated Bark Beetle Attack, and Interspecific Differences in Sensitivity Among Fungal Associates. *Journal of Chemical Ecology*, *41*(6), 524–532. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0588-4>
- Milgroom, M. G., & Peever, T. L. (2003). Population Biology of Plant Pathogens: The Synthesis of Plant Disease Epidemiology and Population Genetics. *Plant Disease*, *87*(6), 608–617. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.6.608>
- Moore-Landecker, E. (1972). Fundamentals of the fungi. *Fundamentals of the Fungi*.
- Moraga-Suazo, P., Opazo, A., Zaldúa, S., González, G., & Sanfuentes, E. (2011). Evaluation of *Trichoderma* spp. And *Clonostachys* spp. Strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *71*(3), 412.
- Moraga-Suazo, P., Orellana, L., Quiroga, P., Balocchi, C., Sanfuentes, E., Whetten, R., Hasbún, R., & Valenzuela, S. (2014). Development of a genetic linkage map for *Pinus radiata* and detection of pitch canker disease resistance associated QTLs. *Trees*, *28*, 1823–1835.
- Moreira, X., Lundborg, L., Zas, R., Carrillo-Gavilán, A., Borg-Karlson, A.-K., & Sampedro, L. (2013). Inducibility of chemical defences by two chewing insect herbivores in pine trees is specific to targeted plant tissue, particular herbivore and defensive trait. *Phytochemistry*, *94*, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.05.008>
- Mullett, M., Pérez-Sierra, A., Armengol, J., & Berbegal, M. (2017). Phenotypical and Molecular Characterisation of *Fusarium circinatum*: Correlation with Virulence and Fungicide Sensitivity. *Forests*, *8*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/f8110458>
- Nagy, N. E., Krokene, P., & Solheim, H. (2006). Anatomical-based defense responses of Scots pine (*Pinus sylvestris*) stems to two fungal pathogens. *Tree Physiology*, *26*(2), 159–167. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.2.159>
- Nel, A., Hodge, G. R., Mongwaketsi, K. E., & Kanzler, A. (2014). Genetic parameters for *Fusarium circinatum* tolerance within openpollinated families of *Pinus patula* tested at screening facilities in South Africa and the

- USA. *Southern Forests: A Journal of Forest Science*, 76(3), 145–150.  
<https://doi.org/10.2989/20702620.2014.916500>
- Nelson, P. E., Desjardins, A. E., & Plattner, R. D. (1993). Fumonisin, mycotoxins produced by fusarium species: Biology, chemistry, and significance. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 233–252.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.001313>
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. 53635. (1983). *Fusarium species: An illustrated manual for identification* /.  
<https://repositorio.fedepalma.org/handle/123456789/77880>
- New, M., Hulme, M., & Jones, P. (1999). Representing twentieth-century space–time climate variability. Part I: Development of a 1961–90 mean monthly terrestrial climatology. *Journal of Climate*, 12(3), 829–856.
- Newman, M.-A., Sundelin, T., Nielsen, J., & Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2013.00139>
- Nirenberg, H. I. (1981). A simplified method for identifying *Fusarium* spp. Occurring on wheat. *Canadian Journal of Botany*, 59(9), 1599–1609.  
<https://doi.org/10.1139/b81-217>
- Nirenberg, H. I., & O'Donnell, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 434–458.  
<https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026929>
- 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 Physiology*, 35(9), 987–999. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv046>
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., & Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 465–493. <https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026933>
- O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoki, T., & Cigelnik, E. (2000). A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41(1), 61–78.  
<https://doi.org/10.1007/BF02464387>
- Oliveira, M., & Azevedo, L. (2022). Molecular Markers: An Overview of Data Published for Fungi over the Last Ten Years. *Journal of Fungi*, 8(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/jof8080803>
- Ortiz, D., & Dodds, P. N. (2018). Plant NLR Origins Traced Back to Green Algae. *Trends in Plant Science*, 23(8), 651–654.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.05.009>
- Paine, T., & Stephen, F. (1987). Influence of tree stress and site quality on the induced defense system of loblolly pine. *Canadian Journal of Forest Research*, 17(6), 569–571.

- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). *Biological control of plant pathogens*.
- Pazouki, L., & Niinemets, Ü. (2016). Multi-Substrate Terpene Synthases: Their Occurrence and Physiological Significance. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01019>
- Pearson, M. N., Beever, R. E., Boine, B., & Arthur, K. (2009). Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 10(1), 115–128. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00503.x>
- Pérez-Sierra, A., Landeras, E., León, M., Berbegal, M., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2007). Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological Research*, 111(7), 832–839. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.05.009>
- Pfenning, L. H., Costa, S. da S., Melo, M. P. de, Costa, H., Ventura, J. A., Auer, C. G., & Santos, Á. F. dos. (2014). First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39, 210–216. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000300004>
- Phillips, M. A., & Croteau, R. B. (1999). Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science*, 4(5), 184–190. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(99\)01401-6](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(99)01401-6)
- Pielou, E. C. (1975). *Ecological diversity* (Vol. 165). Wiley New York.
- Pinilla, G., Coronado, Y. T., Chaves, G., Muñoz, L., Navarrete, J., Salazar, L. M., Taborda, C. P., & Muñoz, J. E. (2022). In Vitro Antifungal Activity of LL-37 Analogue Peptides against *Candida* spp. *Journal of Fungi*, 8(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/jof8111173>
- Poveda, J., Martín-García, J., Zamora-Brauweiler, P., Pastor, M., & Díez, J. J. (2024). Biological control of damping-off by *Fusarium oxysporum* and *F. verticillioides* on pine and oak seedlings using edible ectomycorrhizal fungi. *Pedobiologia*, 105, 150973. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2024.150973>
- Puhalla, J. E., & Spieth, P. T. (1983). Heterokaryosis in *Fusarium moniliforme*. *Experimental Mycology*, 7(4), 328–335. [https://doi.org/10.1016/0147-5975\(83\)90017-8](https://doi.org/10.1016/0147-5975(83)90017-8)
- Pylak, M., Oszust, K., & Frac, M. (2019). Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18(3), 597–616. <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09500-5>
- Quesada, T., Gopal, V., Cumbie, W. P., Eckert, A. J., Wegrzyn, J. L., Neale, D. B., Goldfarb, B., Huber, D. A., Casella, G., & Davis, J. M. (2010). Association Mapping of Quantitative Disease Resistance in a Natural Population of Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). *Genetics*, 186(2), 677–686. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.117549>
- Rayner, A. D. M. (1991). The Challenge of the Individualistic Mycelium. *Mycologia*, 83(1), 48–71. <https://doi.org/10.1080/00275514.1991.12025978>

- Rigling, D., & Prospero, S. (2018). Cryphonectria parasitica, the causal agent of chestnut blight: Invasion history, population biology and disease control. *Molecular Plant Pathology*, *19*(1), 7–20.
- Rodas Pelaez, C. A. (Carlos A. (2013). *Important pests and diseases of plantation grown Pinus and Eucalyptus in Colombia and their control* [Thesis, University of Pretoria]. <https://repository.up.ac.za/handle/2263/32968>
- Rodrigues, N. M. (2016). *Nuevas perspectivas sobre la histopatología de la infección de Pinus Radiata por Fusarium Circinatum*.
- Rodríguez-García, A., Martín, J. A., Gil, L., Menéndez-Gutiérrez, M., & Díaz, R. (2023). Resin Canal Traits Variation in Pinus spp. With Different Susceptibility to the Pine Wood Nematode. *Forests*, *14*(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/f14050925>
- Romón, P., Iturrondobeitia, J. C., Gibson, K., Lindgren, B. S., & Goldarazena, A. (2007). Quantitative association of bark beetles with pitch canker fungus and effects of verbenone on their semiochemical communication in Monterey pine forests in Northern Spain. *Environmental Entomology*, *36*(4), 743–750. [https://doi.org/10.1603/0046-225x\(2007\)36\[743:qaobbw\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0046-225x(2007)36[743:qaobbw]2.0.co;2)
- Romón, P., Troya, M., Fernández de Gamarra, M. E., Eguzkitza, A., Iturrondobeitia, J. C., & Goldarazena, A. (2008). Fungal communities associated with pitch canker disease of Pinus radiata caused by Fusarium circinatum in northern Spain: Association with insects and pathogen-saprophyte antagonistic interactions. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *30*(2), 241–253. <https://doi.org/10.1080/07060661.2008.10540539>
- Sakamoto, J. M., & Gordon, T. R. (2006). Factors influencing infection of mechanical wounds by Fusarium circinatum on Monterey pines (Pinus radiata). *Plant Pathology*, *55*(1), 130–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01310.x>
- Sakamoto, J. M., Gordon, T. R., Storer, A. J., & Wood, D. L. (2007). The role of Pityophthorus spp. As vectors of pitch canker affecting Pinus radiata. *The Canadian Entomologist*, *139*(6), 864–871. <https://doi.org/10.4039/n07-022>
- Sampedro, L., Moreira, X., Llusia, J., Peñuelas, J., & Zas, R. (2010). Genetics, phosphorus availability, and herbivore-derived induction as sources of phenotypic variation of leaf volatile terpenes in a pine species. *Journal of Experimental Botany*, *61*(15), 4437–4447. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq246>
- Santana, Q. C., Coetzee, M. P. A., Steenkamp, E. T., Mlonyeni, O. X., Hammond, G. N. A., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2009). Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. *BioTechniques*, *46*(3), 217–223. <https://doi.org/10.2144/000113085>
- Santos, J., & Tovar, D. (1991). *Algunos aspectos sobre el cancro resinoso de los pinos*. 31.
- Savluchinske-Feio, S., Curto, M. J. M., Gigante, B., & Roseiro, J. C. (2006). Antimicrobial activity of resin acid derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *72*(3), 430–436. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0517-0>

- Schmidt, A., Nagel, R., Krekling, T., Christiansen, E., Gershenzon, J., & Krokene, P. (2011). Induction of isoprenyl diphosphate synthases, plant hormones and defense signalling genes correlates with traumatic resin duct formation in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Molecular Biology*, 77(6), 577–590. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9832-7>
- Schuck, H. j. (1982). The chemical composition of the monoterpene fraction in wounded wood of *Picea abies* and its significance for the resistance against wound infecting fungi. *European Journal of Forest Pathology*, 12(3), 175–181. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1982.tb01391.x>
- Schurko, A. M., Neiman, M., & Logsdon, J. M. (2009). Signs of sex: What we know and how we know it. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(4), 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.11.010>
- Schweigkofler, W., O'Donnell, K., & Garbelotto, M. (2004). Detection and Quantification of Airborne Conidia of *Fusarium circinatum*, the Causal Agent of Pine Pitch Canker, from Two California Sites by Using a Real-Time PCR Approach Combined with a Simple Spore Trapping Method. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3512–3520. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3512-3520.2004>
- Serrada, R., Montero, G., & Reque, J. A. (2008). *Compendio de selvicultura aplicada en España*.
- Serrano, Y., Iturritxa, E., Elvira-Recuenco, M., & Raposo, R. (2017). Survival of *Fusarium circinatum* in soil and *Pinus radiata* needle and branch segments. *Plant Pathology*, 66(6), 934–940. <https://doi.org/10.1111/ppa.12648>
- Shannon, C. E. (2001). A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review*, 5(1), 3–55. <https://doi.org/10.1145/584091.584093>
- Slinski, S. L., Zakharov, F., & Gordon, T. R. (2015). The Effect of Resin and Monoterpenes on Spore Germination and Growth in *Fusarium circinatum*. *Phytopathology*, 105(1), 119–125. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-14-0027-R>
- Snyder, W., Toole, E., & Hepting, G. H. (1949). Fusaria associated with Mimosa wilt, Sumac wilt, and pine pitch canker. *Journal of Agricultural Research*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Fusaria-associated-with-Mimosa-wilt%2C-Sumac-wilt%2C-Snyder-Toole/556f1f7524259c39a7f570e0a19b0d4416e6db63>
- Soria, S., Alonso, R., & Bettucci, L. (2012). Endophytic bacteria from *Pinus taeda* L. as biocontrol agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(2), 281.
- Steenkamp, E. T., Rodas, C. A., Kvas, M., & Wingfield, M. J. (2012). *Fusarium circinatum* and pitch canker of *Pinus* in Colombia. *Australasian Plant Pathology*, 41(5), 483–491. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0120-z>

- Stoddart, J. A., & Taylor, J. F. (1988). Genotypic diversity: Estimation and prediction in samples. *Genetics*, *118*(4), 705–711. <https://doi.org/10.1093/genetics/118.4.705>
- Storer, A., Gordon, T., Dallara, P., & Wood, D. (1994). Pitch canker kills pines, spreads to new species and regions. *California Agriculture*, *48*(6), 9–13.
- Strobel, N. E., & Sinclair, W. A. (1992). Role of Mycorrhizal Fungi in Tree Defense Against Fungal Pathogens of Roots. In R. A. Blanchette & A. R. Biggs (Eds.), *Defense Mechanisms of Woody Plants Against Fungi* (pp. 321–353). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-01642-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-662-01642-8_15)
- Sutherst, R. W., & Maywald, G. F. (1985). A computerised system for matching climates in ecology. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *13*(3), 281–299. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(85\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0167-8809(85)90016-7)
- Swett, C. L., Kirkpatrick, S. C., & Gordon, T. R. (2016). Evidence for a Hemibiotrophic Association of the Pitch Canker Pathogen *Fusarium circinatum* with *Pinus radiata*. *Plant Disease*, *100*(1), 79–84. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0270-RE>
- Swett, C. L., Porter, B., Fourie, G., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., & Wingfield, M. J. (2014). Association of the pitch canker pathogen *Fusarium circinatum* with grass hosts in commercial pine production areas of South Africa. *Southern Forests: A Journal of Forest Science*, *76*(3), 161–166. <https://doi.org/10.2989/20702620.2014.916087>
- Tholl, D., & Lee, S. (2011). Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*, *9*, e0143. <https://doi.org/10.1199/tab.0143>
- Trujillo-Moya, C., Ganthaler, A., Stögl, W., Arc, E., Kranner, I., Schueler, S., Ertl, R., Espinosa-Ruiz, A., Martínez-Godoy, M. Á., George, J.-P., & Mayr, S. (2022). Advances in understanding Norway spruce natural resistance to needle bladder rust infection: Transcriptional and secondary metabolites profiling. *BMC Genomics*, *23*(1), 435. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08661-y>
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, *35*(suppl\_2), W71–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>
- Vacek, Z., Vacek, S., & Cukor, J. (2023). European forests under global climate change: Review of tree growth processes, crises and management strategies. *Journal of Environmental Management*, *332*, 117353. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117353>
- Vainio, E. J., Martínez-Álvarez, P., Bezos, D., Hantula, J., & Diez, J. J. (2015). *Fusarium circinatum* isolates from northern Spain are commonly infected by three distinct mitoviruses. *Archives of Virology*, *160*, 2093–2098.
- van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, *44*, 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>

- Van Tichelen, K. K., Colpaert, J. V., & Vangronsveld, J. (2001). Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytologist*, *150*(1), 203–213. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00081.x>
- Vanhanen, H., Veteli, T. O., Paivinen, S., Kellomaki, S., & Niemela, P. (2007). Climate change and range shifts in two insect defoliators: Gypsy moth and nun moth—a model study. *Silva Fennica*, *41*(4), 621.
- Varma, A., Prasad, R., & Tuteja, N. (2018). *Mycorrhiza-nutrient uptake, biocontrol, eco restoration*. Springer.
- Vázquez-González, C., Zas, R., Erbilgin, N., Ferrenberg, S., Rozas, V., & Sampedro, L. (2020). Resin ducts as resistance traits in conifers: Linking dendrochronology and resin-based defences. *Tree Physiology*, *40*(10), 1313–1326. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa064>
- Veluthakkal, R., & Dasgupta, M. G. (2010). Pathogenesis-related genes and proteins in forest tree species. *Trees*, *24*(6), 993–1006. <https://doi.org/10.1007/s00468-010-0489-7>
- Vieito, C., Pires, P., & Velho, M. (2019). *Pinus Pinaster Bark Composition and Applications: A Review* (pp. 174–189). <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-7894-9.ch008>
- Viljoen, A., & Wingfield, M. J. (1994). First Report of *Fusarium subglutinans* f. *Sp. Pini* on Pine Seedlings in South Africa. *Plant Disease*, *78*(3), 309. <https://doi.org/10.1094/PD-78-0309>
- Visser, E. A., Wegrzyn, J. L., Steenkamp, E. T., Myburg, A. A., & Naidoo, S. (2019). Dual RNA-Seq Analysis of the Pine-*Fusarium circinatum* Interaction in Resistant (*Pinus tecunumanii*) and Susceptible (*Pinus patula*) Hosts. *Microorganisms*, *7*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090315>
- Wallace, M. M., & Covert, S. F. (2000). Molecular Mating Type Assay for *Fusarium circinatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(12), 5506–5508. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92492/>
- Wang, K. L.-C., Li, H., & Ecker, J. R. (2002). Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell*, *14*(suppl\_1), S131–S151. <https://doi.org/10.1105/tpc.001768>
- Wang, Y., Chen, Q., Hu, H., & Zhang, W. (2024). Root Exudates Response of Mycorrhizal *Pinus massoniana* Seedlings Under Drought Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, *43*(2), 576–588. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11115-8>
- Wang, Y., Lim, L., DiGuistini, S., Robertson, G., Bohlmann, J., & Breuil, C. (2013). A specialized ABC efflux transporter GcABC-G1 confers monoterpene resistance to *Grosmannia clavigera*, a bark beetle-associated fungal pathogen of pine trees. *The New Phytologist*, *197*(3), 886–898. <https://doi.org/10.1111/nph.12063>

- Wang, Y., Lim, L., Madilao, L., Lah, L., Bohlmann, J., & Breuil, C. (2014). Gene discovery for enzymes involved in limonene modification or utilization by the mountain pine beetle-associated pathogen *Grosmannia clavigera*. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(15), 4566–4576. <https://doi.org/10.1128/AEM.00670-14>
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany*, *100*(4), 681–697. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm079>
- Watt, M. S., Ganley, R. J., Kriticos, D. J., & Manning, L. K. (2011). Dothistroma needle blight and pitch canker: The current and future potential distribution of two important diseases of *Pinus* species. *Canadian Journal of Forest Research*, *41*(2), 412–424. <https://doi.org/10.1139/X10-204>
- Weindling, R. (1933). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi.
- Wikler, K., & Gordon, T. R. (2000). An initial assessment of genetic relationships among populations of *Fusarium circinatum* in different parts of the world. *Canadian Journal of Botany*, *78*(6), 709–717. <https://doi.org/10.1139/b00-044>
- Wilson, G. A., & Rannala, B. (2003). Bayesian Inference of Recent Migration Rates Using Multilocus Genotypes. *Genetics*, *163*(3), 1177–1191. <https://doi.org/10.1093/genetics/163.3.1177>
- Wingfield, M. J., Hammerbacher, A., Ganley, R. J., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., Wingfield, B. D., & Coutinho, T. A. (2008). Pitch canker caused by *Fusarium circinatum*—A growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology*, *37*(4), 319–334. <https://doi.org/10.1071/AP08036>
- Wingfield, M. J., Jacobs, A., Coutinho, T. A., Ahumada, R., & Wingfield, B. D. (2002). First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. *Plant Pathology*, *51*(3), 397–397. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00710.x>
- Winter, D. J. (2012). mmod: An R library for the calculation of population differentiation statistics. *Molecular Ecology Resources*, *12*(6), 1158–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03174.x>
- Worley, B., & Powers, R. (2015). A Sequential Algorithm for Multiblock Orthogonal Projections to Latent Structures. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems: An International Journal Sponsored by the Chemometrics Society*, *149*(Pt B), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.10.018>
- Zamora-Ballesteros, C., Diez, J. J., Martín-García, J., Witzell, J., Solla, A., Ahumada, R., Capretti, P., Cleary, M., Drenkhan, R., Dvořák, M., Elvira-Recuenco, M., Fernández-Fernández, M., Ghelardini, L., Gonthier, P., Hernández-Escribano, L., Ioos, R., Markovskaja, S., Martínez-Álvarez, P., Muñoz-Adalia, E. J., ... Hantula, J. (2019). Pine Pitch Canker (PPC):

- 
- Pathways of Pathogen Spread and Preventive Measures. *Forests*, *10*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/f10121158>
- Zamora-Ballesteros, C., Pinto, G., Amaral, J., Valledor, L., Alves, A., Diez, J. J., & Martín-García, J. (2021). Dual RNA-Sequencing Analysis of Resistant (*Pinus pinea*) and Susceptible (*Pinus radiata*) Hosts during *Fusarium circinatum* Challenge. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/ijms22105231>
- Zamponi, L., Michelozzi, M., & Capretti, P. (2007). Terpene response of *Picea abies* and *Abies alba* to infection with *Heterobasidion* s.l. *Forest Pathology*, *37*(4), 243–250. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2007.00493.x>
- Zhao, T., Axelsson, K., Krokene, P., & Borg-Karlson, A.-K. (2015). Fungal Symbionts of the Spruce Bark Beetle Synthesize the Beetle Aggregation Pheromone 2-Methyl-3-buten-2-ol. *Journal of Chemical Ecology*, *41*(9), 848–852. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0617-3>
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, *20*(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.11.003>
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, *35*(7), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>



