



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-284

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Diagramas Eh-pH en extractos de xilema de especies de pino y susceptibilidad al nematodo del marchitamiento del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*)

ALONSO SANTOS, MARGARITA¹, MENENDEZ GUTIERREZ, MARIA¹, DIAZ VAZQUEZ, RAQUEL^{1,2}, IGNACIO QUINTEIRO, M^a FRANCISCA¹, JIMENEZ CARMONA¹, ENRIQUE, PEREZ-GOROSTIAGA, PEDRO¹, ABELLEIRA ARGIBAY, ADELA³, MANSILLA VAZQUEZ, J. PEDRO³, MOSQUERA VEIGA, PILAR³, TOVAL HERNANDEZ, GABRIEL¹.

¹ Centro de Investigación Forestal de Lourizán. Ctra. De Marín, km 4. 36153 Pontevedra

² Universidad de Vigo, Departamento de Ingeniería de los Recursos Naturales y Medioambiente, 36310 Vigo

³ Estación Fitopatológica Areiro, Subida a la Robleada s/n, Pontevedra 36153, Spain

Resumen

Bursaphelenchus xylophilus es un nematodo considerado organismo de cuarentena en la Unión Europea, causando la muerte de gran número de especies de coníferas. Parece de interés analizar los cambios bioquímicos que se producen en el xilema, tejido donde se alimenta y reproduce este organismo. Se estudia la evolución del potencial redox y el pH en extractos de xilema de plántulas de 2 años de edad de 7 especies de pino con distinto grado de susceptibilidad a este nematodo. Después de la inoculación, se observa un incremento de acidez en el tejido xilemático alrededor de la zona de inoculación en todas las especies estudiadas: poco o nada susceptibles (*P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. taeda* y *P. pinea*), susceptibles (*P. pinaster* y *P. radiata*) y muy susceptible (*P. sylvestris*). Sin embargo, solo el xilema de la especie muy susceptible muestra incrementos evidentes en el potencial redox, indicando condiciones más oxidantes en ese tejido después de la inoculación con el nematodo.

Palabras clave

Nematodo del pino, xilema, madera, acidez, condiciones redox, conductividad.

1. Introducción

El pH de las maderas infectadas con el nematodo de la madera del pino (PWN, del inglés “pine wood nematode”), *Bursaphelenchus xylophilus*, es diferente al de las maderas sanas. Por este motivo, la medida del pH o la utilización de colorantes indicadores de pH son algunos de los tests utilizados para identificar positivos en maderas en cuarentena (ZHAO 2008, YOU et al. 1994, WANG et al. 2001). Junto con el pH, la conductividad también se ha utilizado para diferenciar maderas sanas de afectadas por PWN (CHEN et al., 2010). De igual forma, las condiciones redox en las plantas, después de un estrés biótico, como el caso que nos ocupa, también cambian; FOYER & NOCTOR (2013) hicieron una revisión sobre el tema, donde indican que, por medio de electrones procedentes de la fotosíntesis y del metabolismo, las plantas generan radicales de oxígeno y peróxido denominados ROS (reactive oxygen species), que reaccionan rápidamente en cadena. Las plantas utilizan esta explosión oxidativa para alertar al metabolismo de cambios bióticos o abióticos en el ambiente, generando ROS en la matriz de las células del apoplasto, incrementando la oxidación en ese lado, mientras que la cara interna citosólica permanece reducida. El gradiente redox a través de las membranas posibilita la regulación redox diferencial de proteínas en la cara celular, incluyendo receptores y canales iónicos que inician una cascada de rutas de señalización. Todos estos mecanismos pueden traducirse como una respuesta innata inmune de la planta, que induce unos patrones moleculares de reconocimiento de sustancias extrañas como por ejemplo ozono, quitina, o péptidos/proteínas de la saliva de insectos. Los primeros blancos de las ROS como moléculas señal son aminoácidos tales como cisteína en las proteínas o tioles de bajo peso molecular como el glutatión. El ambiente oxidativo creado por las ROS facilita también la señalización de otras rutas,

como la movilización de Ca, intercambio tiol-disulfuro, etc. La célula puede considerarse como un set de compartimentos discretos con unas condiciones redox particulares. Cambios en estas condiciones pueden alterar las rutas de señalización.

Dentro del ensayo que actualmente nos ocupa, datos publicados en un artículo anterior (MENENDEZ et al. 2017, aceptado) indicaron la existencia de tres grupos de especies de pino en relación a la susceptibilidad al PWN (*Bursaphelenchus xylophilus*): nada o poco susceptibles (*P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. taeda* y *P. pinea*), susceptibles (*P. pinaster* y *P. radiata*), y muy susceptible (*P. sylvestris*). Consideramos de importancia el estudio de los cambios en parámetros básicos como pH, Eh y conductividad, originados por efecto de la inoculación del nematodo del pino en la primera zona de contacto con la madera, en cada uno de esos grupos y su evolución a lo largo del tiempo.

2. Objetivos

Analizar los cambios originados por efecto de la inoculación de *B. xylophilus* en parámetros básicos como pH, Eh y conductividad, en la primera zona de contacto en especies de pino poco o nada susceptibles al nematodo (*P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. pinea* y *P. taeda*), en especies susceptibles (*P. pinaster* y *P. radiata*), y en una especie muy susceptible (*P. sylvestris*). Estudiar la evolución de esos cambios con el tiempo para cada grupo de susceptibilidad.

3. Metodología

Se realizó ensayo de inoculación en invernadero, con plantas de 2 años de edad, de siete especies de pino (*P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. pinea*, *P. taeda*, *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*), en condiciones de temperatura controlada, con una oscilación de 17 a 35°C debido a los cambios entre día/noche, y Tª media de 24°C. El riego fue por goteo dos veces por semana según demanda. El diseño del experimento fue de bloques completos aleatorizados, con siete especies, cinco bloques, y dos tratamientos (inoculados y control). Para el ensayo se utilizaron 525 plantas, 10 plantas por especie y bloque fueron inoculadas con *B. xylophilus* y 5 con agua destilada (controles). Todas las plantas fueron colocadas al azar dentro de los bloques.

El inóculo con *B. xylophilus* utilizado en el ensayo fue obtenido en la Estación Fitopatológica Areeiro, extraído de un *P. pinaster* procedente de As Neves (Pontevedra). Los nematodos fueron reproducidos en un medio de PDA con *Botrytis cinerea*. Un día antes de la inoculación, los nematodos se extrajeron utilizando el método del embudo de Baermann (THORNE, 1961) y las diluciones del inóculo se prepararon con agua destilada.

El 18 de junio del 2013, se inocularon un total de 75 plantas por especie en el invernadero del Centro de Investigación Forestal de Lourizán, 25 plantas fueron inoculadas con agua esterilizada (controles) y 50 inoculadas con una suspensión de *B. xylophilus*. Con un bisturí se hizo una incisión longitudinal en la zona central del crecimiento del año anterior del tallo principal. La herida fue cubierta con una gasa estéril y cubierta con un parafilm formando un embudo, donde se pipetearon 300 µl de la suspensión conteniendo 600 nematodos directamente sobre la gasa, cerrando luego el embudo para evitar la desecación del tejido (PHRAME 2007). Las plantas control se inocularon con 300 µl de agua estéril.

Los síntomas de daño en las plantas fueron evaluados dos veces por semana, en una escala de 1 a 7 (MENENDEZ et al., 2017, aceptado): 1 (sin síntomas), 2 (1-20% acículas de 2 años bajo el punto de inoculación dañadas (amarillas o marrones)), 3 (21-40% de acículas de 2 años bajo punto de inoculación dañadas), 4 (41-60% de acículas de 2 años bajo punto de inoculación dañadas), 5 (61-80% de acículas de 2 años y 0-50% de acículas de 1 año bajo punto de inoculación dañadas), 6 (81-99% de acículas de 2 años y 51-99% de acículas de 1 año bajo punto de inoculación dañadas) y 7 (todas las acículas dañadas).

Transcurridos 14, 30, 46 y 90 días después de la fecha de inoculación se muestreó una planta por especie de cada bloque y tratamiento para la determinación de compuestos químicos en distintos tejidos, excepto a los 90 días que solo se muestrearon las especies poco o nada

susceptibles, pues la mayoría de plantas del resto de las especies habían muerto ya. En 4 de esas 5 plantas, tanto inoculadas como controles se muestreo un cilindro de tallo de aproximadamente 3 cm de longitud y correspondiente a la zona de inoculación. Una vez eliminado el parafilm y la gasa, se descortezó y la madera del xilema se hizo lascas con un sacapuntas de acero inoxidable, congelando este material a continuación a -18°C hasta la fecha de análisis. Un día antes de la extracción acuosa del material congelado, éste se pasó del congelador al frigorífico a 4°C . El extracto se obtiene homogeneizando 0.5 g de material vegetal con 5 ml de agua destilada próxima a 0°C (mantenida sobre hielo) en un homogeneizador Polytrón (Polytrón Dispersing Technology Laboratory Systems, Kinematica AG, Lucerne, Switzerland), durante unos segundos, a velocidad 10 hasta formar una pasta homogénea, luego se adicionan otros 5 ml de agua y se vuelve a homogeneizar. El homogeneizador se inserta luego en otro tubo con 10 ml de agua, con el objeto de lavar el vástago para utilizarlo en la muestra siguiente. El contenido de los tubos se deja reposar unos minutos y luego se filtra a vacío, primero el contenido del tubo con la muestra y luego el del tubo con agua. El extracto obtenido se trasvasa a un matraz de 25 ml, enrasando con agua destilada. El contenido del matraz es pasado a un vaso e introducido en un baño termostatzado a 25°C (RTE 110 NESLAB Temperature Controlled Liquid Systems, Valkenswaard, Netherlands), donde se realizan las medidas de pH y Eh con un pHmetro (713 pHmeter Metrohm, Herisau, Switzerland). El electrodo de referencia utilizado en ambas medidas fue un Methrom 6.0786.100 Ag, AgCl 3M KCl. Para la medida del pH se utilizó un electrodo de vidrio Methrom 6.0123.100 pH, y para la medida del potencial redox un electrodo de platino Methrom 6.0351.100Pt. La calibración de la medida del pH fue con Buffer a pH 4 y 7. La medida del Eh en la solución se hace siguiendo el procedimiento descrito por NORDSTROM (1998), bajo burbujeo de N_2 , la calibración del equipo con disolución de ZoBell. El valor del Eh se corrigió añadiéndole el potencial del electrodo de referencia respecto al electrodo estándar de hidrógeno (209 mV). Debido a la dependencia del Eh con el pH, se calculó el valor del Eh a un pH determinado, en este caso 5.35, $Eh_{5.35} = Eh + (\text{pH} - 5.35) \cdot 59$ (MEGONIGAL et al., 1993), siendo 5.35 el valor promedio de pH del extracto acuoso del xilema de las especies consideradas. La conductividad eléctrica del extracto se midió con un conductivímetro tipo CDM3, en celda de 1cm (Radiometer, Copenhagen, Denmark).

El análisis estadístico de los datos se realizó con el software SPSS v. 13.0 (SPSS Inc., Chicago IL, USA), en base a resultados de susceptibilidad de las especies obtenidos previamente del mismo ensayo (MENENDEZ et al, 2017, aceptado). Se aplicó el siguiente modelo a los grupos de especies susceptibles y poco o nada susceptibles, en cada fecha de muestreo después de la inoculación,

$$X = \mu + Sp_i + I_j + (Sp \times I)_{ij} + \xi_{k(ij)}$$

donde Sp es la especie e I el tipo de inóculo (H_2O o *Bursaphelenchus xylophilus*); mientras que al grupo de muy susceptible, con una sola especie, se aplicó el modelo

$$X = \mu + I_i + \xi_{j(i)}$$

Para la comparación de medias se usó el test de Duncan.

4. Resultados

Los diagramas Eh-pH para cada grupo de especies de pino según su grado de susceptibilidad al nematodo muestran diferencias en la variación conjunta de ambos parámetros (Figura 1). Las especies poco o nada susceptibles parecen reaccionar al nematodo, en comparación a la simple inoculación con agua (control), con una tendencia al descenso de pH y Eh a los 14 días de la inoculación, luego a los 30, sigue el descenso de pH, a los 46, continua igual excepto *P. taeda* que incrementa su Eh. Estas especies sobrevivieron después de 90 días, fecha en que dichos parámetros se estabilizaron para todas las plantas (inoculadas con agua y con *B. xylophilus*) y se mantuvieron en un rango de pH (5.20-5.62) y Eh (247-305mV). Las especies susceptibles reaccionan más lento, primero a los 14 y 30 días con un descenso de pH y luego a los 46 días, también con un descenso de Eh. A los 90 días ya habían muerto todas las plantas. La especie muy susceptible reacciona a los 14 días con descenso de pH y Eh, luego a los 30 y 46 días mantiene la bajada de pH pero reacciona de forma contraria a las demás especies incrementando el Eh.

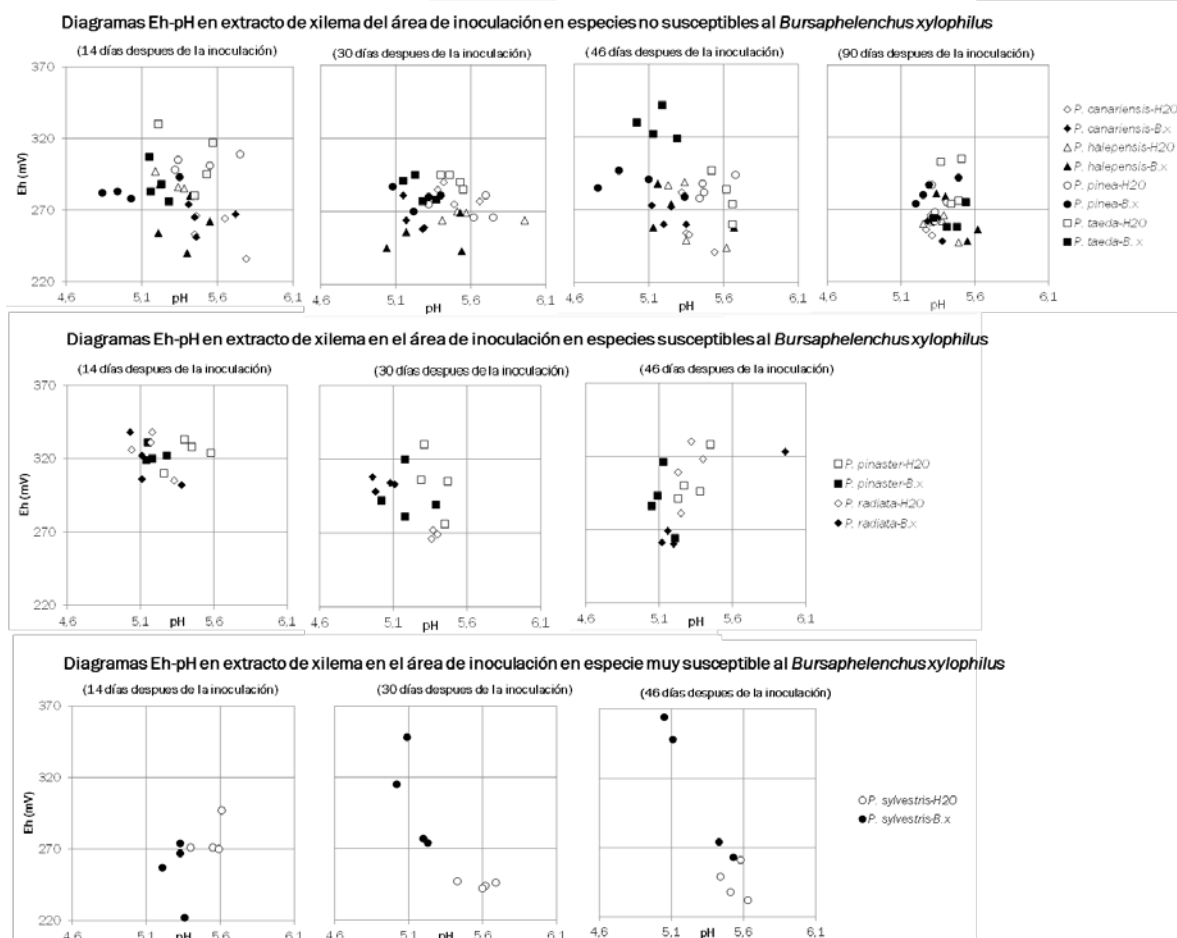


Figura 1. Diagramas Eh-pH del extracto de xilema en la zona de inoculación a los 14, 30, 46 y 90 días después de la inoculación de las plantas con *Bursaphelenchus xylophilus* (B. x) o con agua (H₂O) en especies de pino no susceptibles al nematodo (*P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. pinea* y *P. taeda*), susceptibles (*P. pinaster* y *P. radiata*) y muy susceptible (*P. sylvestris*). Las plantas de especies susceptibles y de la especie muy susceptible murieron antes de los 90 días.

Los resultados del ANOVA para cada grupo de especies según su susceptibilidad al nematodo del pino, para los parámetros testados en el extracto acuoso de xilema en la zona de inoculación, pH, Eh a pH 5.35, y conductividad eléctrica, se muestran en la Tabla 1, habiendo comprobado previamente la normalidad y homocedasticidad de los datos. Para las especies poco o nada susceptibles, los resultados del test de Duncan de comparación de medias (Figura 2), muestran un descenso significativo del pH a los 30 días de haber sido inoculadas, manteniéndose este descenso hasta los 45 días, para luego no apreciarse diferencia entre tratamientos a los 90 días; en las especies susceptibles, este descenso significativo de pH es observado también a los 30 días, no siendo ya significativo a los 46; en la especie muy susceptible, el descenso significativo del pH se observa ya a los 14 días, manteniéndose hasta los 30, no siendo ya significativo ese descenso después (Figura 2). El potencial redox, que está relacionado con el nivel de oxidación, en este caso del xilema en la zona de inoculación, y por tanto con el deterioro de ese tejido, desciende significativamente en las especies poco o nada susceptibles a los 30 días después de la inoculación con *B. x*, pero luego se estabiliza en las fechas de muestreo siguientes, no observándose diferencias en el Eh de plantas inoculadas con las control; en las especies susceptibles no se aprecian cambios significativos en ninguna fecha, y en la especie muy susceptible, disminuye significativamente a los 14 días después de la inoculación con *B. x*, para luego, al contrario de lo ocurrido en las especies no susceptibles y susceptibles, incrementar y ser este incremento significativo a los 45 (Figura 2).

Tabla 1. Componentes de la varianza del pH, Eh a pH 5.35 y conductividad del extracto acuoso de xilema en la zona de inoculación medidos a 25°C y presión atmosférica para cada grupo de especies según su susceptibilidad al nematodo del pino, en las distintas fechas de muestreo después de la inoculación con *B. xylophilus* ó H₂O. Sp (especie: no susceptibles (*P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. pinea*, *P. taeda*), susceptibles (*P. pinaster* y *P. radiata*) y muy susceptible (*P. sylvestris*), I (inóculo: H₂O ó *B. xylophilus*).

	Día	Especies no susceptibles						Especies susceptibles						Especie muy susceptible	
		Sp		I		Sp * I		Sp		I		Sp * I		I	
		F _{3,24}	Pr>F	F _{1,24}	Pr>F	F _{3,24}	Pr>F	F _{1,8}	Pr>F	F _{1,8}	Pr>F	F _{1,8}	Pr>F	F _{1,8}	Pr>F
pH	14	5,1	0,007	8,7	0,007	4,7	0,010	5,0	0,045	4,5	0,056	3,1	0,106	15,7	0,007
	30	0,8	0,513	23,9	0,000	0,2	0,911	2,4	0,149	25,6	0,000	2,2	0,164	37,4	0,001
	46	0,8	0,517	28,1	0,000	3,3	0,037	0,9	0,350	0,5	0,488	1,6	0,225	4,3	0,083
	90	4,9	0,008	0,5	0,493	1,0	0,408								
Eh a pH 5,35	14	4,9	0,008	20,2	0,000	4,0	0,019	3,2	0,096	4,3	0,060	0,2	0,655	6,6	0,000
	30	5,7	0,004	34,9	0,000	1,3	0,289	6,3	0,029	0,2	0,700	5,2	0,044	4,2	0,086
	46	18,8	0,000	0,2	0,695	4,6	0,011	0,0	0,846	2,7	0,124	0,0	0,972	6,9	0,039
	90	8,4	0,001	0,0	0,838	5,1	0,007								
Conductividad	14	8,9	0,000	0,0	0,983	0,7	0,533	0,1	0,782	0,2	0,630	2,9	0,117	3,4	0,116
	30	6,1	0,003	2,6	0,121	0,4	0,773	0,4	0,547	1,1	0,308	2,9	0,116	24,8	0,002
	46	9,1	0,000	1,1	0,306	1,4	0,259	0,2	0,685	11,6	0,005	0,9	0,371	1,9	0,213
	90	12,5	0,000	12,1	0,002	0,2	0,867								

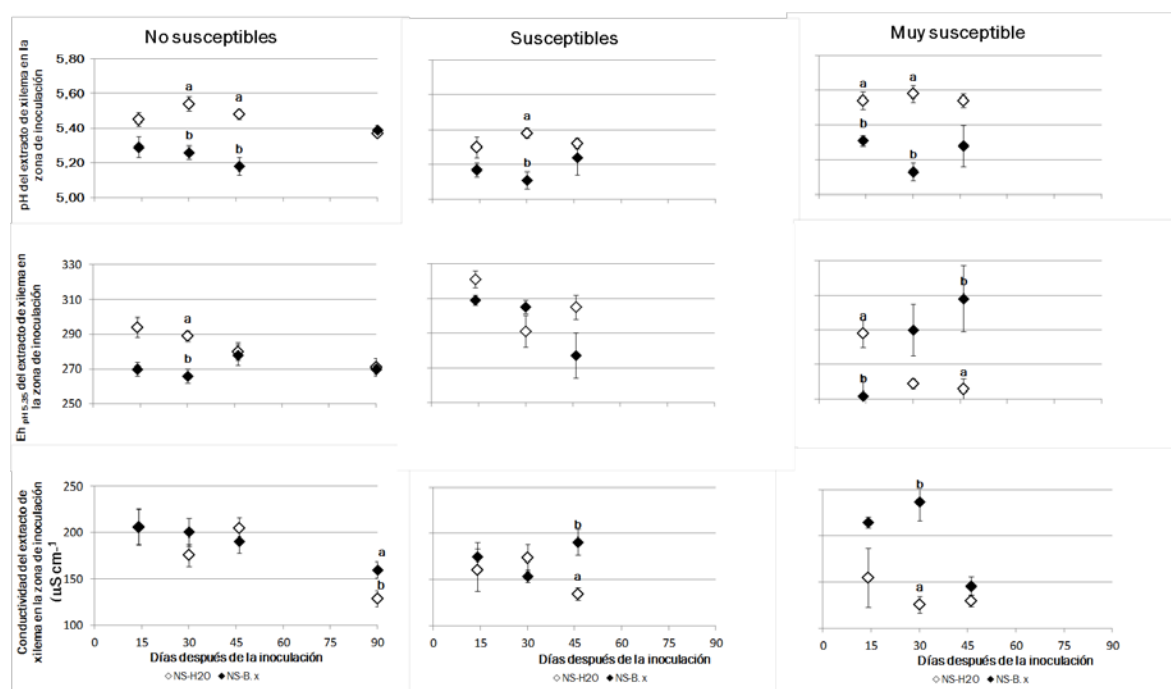


Figura 2. Variación de pH, Eh a pH 5.35 y Conductividad en el extracto de xilema en la zona de inoculación a los 14, 30, 46 y 90 días después de la inoculación de las plantas con *Bursaphelenchus xylophilus* (*B. x*) o con agua (H₂O) en especies de pino no susceptibles al nematodo (*P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. pinea* y *P. taeda*), susceptibles (*P. pinaster* y *P. radiata*) y muy susceptible (*P. sylvestris*). Las plantas de especies susceptibles y de la especie muy susceptible murieron antes de los 90 días.

La conductividad eléctrica del extracto nos da idea sobre la concentración de solutos en esa zona. En especies poco o nada susceptibles, no se observan cambios significativos de este parámetro hasta los 90 días después de la inoculación, cuando la conductividad es significativamente más alta en plantas inoculadas con *B. x* que en las inoculadas con agua; en las especies susceptibles, este mismo efecto se observa antes, a los 45 días de la inoculación, y en la especie muy susceptible, mucho antes, a los 30 días (Figura 2).

5. Discusión

El descenso significativo del pH en el extracto acuoso del xilema en la zona de inoculación con *B. xylophilus* en todas las especies de pino ensayadas en este experimento, independientemente de que sean poco o nada susceptibles al nematodo (*P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. pinea* y *P. taeda*), susceptibles (*P. pinaster* y *P. radiata*), o muy susceptible (*P. sylvestris*), podría inducirnos a pensar que sustancias de carácter ácido, que además pudieran ser antioxidantes (por el descenso añadido de Eh en las especies poco o nada susceptibles a los 30 días después de la inoculación con *B. x* y a los 14 en la especie muy susceptible) estarían implicadas en esa respuesta inicial de las plantas al patógeno. El glutatión, tripéptido de carácter ácido es considerado el mayor antioxidante endógeno producido por las células (FOYER & NOCTOR, 2013); el ácido ascórbico, de carácter ácido y considerado un antioxidante por excelencia es otro ejemplo (SMIRNOFF, 1996; HOREMANS et al. 2000); los ácidos fenólicos, metabolitos secundarios presentes en los pinos, con su carácter ácido por una parte, y su gran capacidad antioxidante, por otra, podrían ser también moléculas que interviniesen en el proceso de defensa (SIMIC, 2007; RICE-EVANS et al., 1996). ZHAO (2008) indicó que en China se estaba utilizando la medida de pH en tejidos de árboles muertos por la enfermedad del marchitamiento de los pinos causada por este nematodo, basándose en la información de un descenso significativo de pH en árboles muertos en relación a árboles sanos (YOU et al, 1994; WANG et al. (2000 & 2001)). La toma de muestra 14 días después de la inoculación de las plantas y no antes, nos impide saber el momento, en ese periodo de tiempo, en el que se produce una respuesta de defensa. Quizás en un primer momento se hubiese observado un incremento de Eh debido a ese incremento de radicales de oxígeno y peróxido supuestamente originados por el contacto del nematodo con el xilema y su paso a través de él. También es posible que después de esto, la planta respondiera biosintetizando sustancias antioxidantes para contrarrestar esa explosión oxidativa, y por tanto, a los 14 días de la inoculación con *B. xylophilus* observemos esa tendencia al descenso de Eh, que continúa en especies no susceptibles a los 30 días con respecto a las inoculadas con agua, y posteriormente deja de observarse; en las especies susceptibles hay una tendencia a la baja en este parámetro, aunque más tardíamente y sin significación estadística, mientras que en la especie muy susceptible, primero, a los 15 días de la inoculación el Eh baja en las plantas inoculadas con nematodo con respecto a las inoculadas con agua, pero luego incrementa, contrariamente a lo ocurrido en las otras especies, y a los 45 días es significativamente superior al valor observado en plantas inoculadas con agua, supuestamente no pudiendo esta especie responder de forma eficiente para contrarrestar la explosión oxidativa originada por la presencia del patógeno. En cuanto al incremento significativo de conductividad eléctrica en plantas inoculadas con nematodo en relación a plantas inoculadas con agua, es observado primero en la especie muy susceptible, a los 30 días de la inoculación, luego en las especies susceptibles, un poco después, a los 45 días, mientras en las especies no susceptibles, este hecho ocurre mucho más tarde, a los 90 días. Los solutos circulan en el xilema con la savia bruta, de las raíces a las hojas. Este incremento de conductividad en la zona de inoculación pudiera estar relacionado con la posible inmovilización de esos solutos en la zona, tras el bloqueo de estos canales debido a la emigración del nematodo a través de ellos.

6. Conclusiones

Independientemente de la susceptibilidad al nematodo del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*), el tejido xilemático de plántulas de 2 años de edad alrededor de la zona de inoculación en las especies estudiadas incrementa su acidez después de la inoculación, produciéndose este hecho antes en la especie muy susceptible. Por otra parte, la especie muy susceptible se diferencia de los demás grupos de susceptibilidad en que después de un descenso inicial del potencial redox, éste incrementa rápidamente de forma significativa, pudiendo este hecho estar relacionado con una pronta oxidación de estos tejidos.

Los incrementos de conductividad después de la inoculación con *B. xylophilus* son observados primero en la especie muy susceptible, luego en las especies susceptibles y más tardíamente en las no susceptibles, pudiendo indicar un bloqueo en la movilización de solutos a través del tallo.

7. Agradecimientos

Damos las gracias al INIA por la financiación del proyecto RTA2011-069-C03-01 (NEMOPIN) para la realización de este ensayo, y a Ricardo Ferradás, Maribel Juncal y Belén Aramburu por su asistencia técnica.

8. Bibliografía

- CHEN, Y.; ZHAO, N.; NING, X.; LIU, J. 2010. The difference of conductivity and pH value between healthy and pine wilt diseased woods of *Pinus kesiya* var. *langbianensis*. *Journal of Nanjing Forestry* 59-62.
- CLARK, W. M.; 1961. Oxidation-reduction Potential of organic systems. Williams and Wilkins. Baltimore.
- FOYER, C.; NOCTOR, G. 2013. Redox signaling in plants. *Antioxid Redox Signal* 18 (16): 2087-2090.
- HOREMANS, N.; FOYER, C.; POTTERS, G.; ASARD, H. 2000. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 531-540.
- MEGONIGAL, J.P.; PATRICK, W.H. & FAULKNER, S.P.; 1993. Wetland identification in seasonally flooded forest soil: soil morphology and redox dynamic. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57(1): 140-149.
- NORDSTROM, D.K. & WILDE, F.D.; 1998. Reduction-oxidation potential (electrode method). In: F.D. Wilde, D.B. Radtke, J. Gibs & R.T. Iwatsubo (eds.), National Field Manual for the Collection of Water-Quality Data, U.S. Geological Survey Techniques in Water-Resources Investigations Book 9, Handbooks for water-Resources Investigations, A6.5.
- MENENDEZ, M.; ALONSO, M.; JIMENEZ, E.; TOVAL, G.; MANSILLA, P.; ABELLEIRA, A.; ABELLEIRA-SANMARTIN, A.; DIAZ, R. 2017. Interspecific variation of constitutive chemical compounds in *Pinus* spp xylem and susceptibility to pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *European Journal of Forest Pathology*. En prensa.
- PHRAME. 2007. Development of improved pest risk analysis techniques for quarantine pests, using pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Portugal as a model system.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANDA, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20 (7): 933-956.
- SIMIC, A.; MANOJLOVIC, D.; SEGAN, D.; TODOROVIC, M. 2007. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules* 12: 2327-2340.
- SMIRNOFF, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661-669.
- TAN, J.J.; YE, J. R.; WU, X. Q.; ZHU, Y. F.; LI, Y. 2005. A study on disease development and early diagnosis of pine Wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, infection of Japanese black pine. *Nematology* 7 (4): 481-485.
- THORNE, G. 1961. *Principles of Nematology*. New York: McGraw-Hill Book Company Inc.
- WANG, Y. Y.; LI, H. V.; SHU, C. R.; GUO, Z. H. 2000. A study on the techniques of the rapid quarantine detection for diseased wood caused by the pine wood nematode. *Scientia Silvae Sinicae* 36(5): 59-62.
- WANG, Y. Y.; LI, H. V.; SHU, C. R.; GUO, Z. H. 2001. A study on difference of pH between healthy and pine wilt diseased woods of several pine species. *Acta Phytopathologica Sinica* 31: 342-348.
- YOU, J. X.; SONG, Z.; HE, W.; WANG, Y. Y.; SONG, Y. S. 1994. Study on distinguishing between pine wilt diseased wood and sound wood. *Scientia Silvae Sinicae* 30: 145-150.

ZHAO, B. G. 2008. Pine wilt disease in China. En: ZHAO, B. G.; FUTAI, K.; SUTHERLAND, J. R.; TAKEUCHI, Y. (Eds). Pine Wilt Disease. 18-25. Springer. Japan.