Universidade Vigo

ESCUELA UNIVERSITARIA DE INGENIERÍA TÉCNICA FORESTAL DE PONTEVEDRA

UNIVERSIDADE DE VIGO

"PERCEPCIÓN DEL RIESGO DE HERBIVORÍA EN DOS PINOS DE INTERÉS FORESTAL: CAMBIOS EN LA QUÍMICA DEFENSIVA"

PROYECTO FINAL DE CARRERA

Autora:

BEATRIZ DIZ DIZ

Directores:

RAFAEL ZAS ARREGUI LUIS SAMPEDRO PÉREZ

Tutor:

JOSE CARLOS SOUTO OTERO

2013

Universidade Vigo

ESCUELA UNIVERSITARIA DE INGENIERÍA TÉCNICA FORESTAL DE PONTEVEDRA

UNIVERSIDADE DE VIGO

"PERCEPCIÓN DEL RIESGO DE HERBIVORÍA EN DOS PINOS DE INTERÉS FORESTAL: CAMBIOS EN LA QUÍMICA DEFENSIVA"

El alumno **Los directores**

Fdo. Beatriz Diz Diz Fdo. Rafael Zas Arregui Fdo. Luís Sampedro Pérez

Vº Bº. Tutor

Fdo. Jose Carlos Souto Otero

Mayo 2013

A mi abuela y a mi tía

Este Proyecto Final de Carrera se ha realizado en la Misión Biológica de Galicia (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Pontevedra) en el seno del grupo de investigación "Genética y Ecología Forestal" bajo la dirección de los Dres. Rafael Zas y Luís Sampedro. El trabajo se ha realizado con fondos del Proyecto de investigación AGL2010-18724 - COMPROMPIN "*Compromisos entre crecimiento y resistencia constitutiva e inducida en el género Pinus: Variación entre y dentro de especies e implicaciones para los programas de mejora*" y AGL2012-40151-C03-01 -. FENOPIN "*Estrategias defensivas en pinos ibéricos: relevancia adaptativa en relación a caracteres alternativos de historia vital*" financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación y Ministerio de Economía y Competitividad, respectivamente.

ÍNDICE

RESUMO **8**

RESUMEN **9**

ABSTRACT **10**

1. INTRODUCCIÓN **12**

1.1. Estrategias defensivas en coníferas 12

1.2. Mecanismos de resistencia en coníferas 14

1.3. Mecanismos de tolerancia en coníferas 17

1.4. Mecanismos de resistencia indirecta 19

1.5. Comunicación planta - planta 21

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **24**

3. MATERIALES Y MÉTODOS **26**

3.1. Los hospedadores 27

a) Pinus pinaster Ait. 27

b) Pinus radiata D. Don 29

3.2. El Curculiónido *Hylobius abietis (L).* 30

3.3. Material vegetal utilizado 33

3.4. Captura y mantenimiento del Curculiónido *Hylobius abietis.* 34

3.5. Diseño experimental. 36

3.6. Levantamiento del experimento. 40

3.7. Bioensayos con el Curculiónido *H. abietis.* 41

3.8. Determinación del contenido de resina. 46

3.9. Determinación de la concentración de los fenoles totales. 49

3.10. Análisis estadísticos. 53

4. RESULTADOS **56**

4.1. Efecto de la herbivoría en plantas vecinas sobre la concentración constitutiva de defensas en plantas receptoras de la misma especie. 56

4.2. Efecto de la herbivoría en plantas vecinas sobre la intensidad de la respuesta al consumo de *Hylobius abietis* en plantas receptoras de la misma especie. 59

4.3. Efecto de la herbivoría en plantas vecinas sobre la dinámica de la respuesta al consumo de *Hylobius abietis* en plantas receptoras de la misma especie. 65

4.4. Influencia de la especie emisora sobre la química defensiva y la respuesta a la herbivoría en plantas de la vecindad. 67

4.5. Respuesta química defensiva de las plantas emisoras a la exposición a los tratamientos de herbivoría con *Hylobius abietis*. 68

5. DISCUSIÓN 70

6. CONCLUSIONES 76

7. BIBLIOGRAFÍA 78

AGRADECIMIENTOS 82

Resumo

Percepción do risco de herbivoría en dous piñeiros de interese forestal: cambios na química defensiva

As plantas liberan continuamente complexas mesturas volátiles ó aire e a composición destas emisións pode variar dependendo de si a planta foi atacada e da natureza específica do atacante. Estudos recentes demostraron que os compostos orgánicos volátiles (VOCs) emitidos tras episodios de herbivoría poden ser empregados polas plantas para transmitir información á tecidos distantes, poden ser percibidos por antagonistas dos herbívoros, e mesmo poden ser percibidos polas plantas veciñas indicándolles a existencia de risco, desencadeando cambios antes de un posible ataque e aumentando a súa resistencia en consecuencia. Tanto o piñeiro do país (*P. pinaster)* como o piñeiro insigne *(P. radiata)* son dúas especies que adquiriron unha gran importancia económica no sector forestal galego nos últimos tempos polo que, a comprensión do seu comportamento defensivo fronte a agresións biolóxicas, en particular na idade xuvenil, pode ser de utilidade para reducir as perdas económicas debidas á herbivoría nestes xéneros. No presente traballo de investigación estudouse se plántulas de *P. pinaster* e *P. radiata* (*receptoras*) poden modificar as súas características defensivas cando crecen na veciñanza de plantas atacadas polo gurgullo *Hylobius abietis* (*emisoras*). En particular, cuantificamos o contido de resina non volátil e polifenois totais no talo superior, inferior e acículas nas dúas especies. Nas plantas emisoras observouse un incremento significativo das defensas químicas en *P. pinaster*, pero non en *P. radiata*. A herbivoría en plantas veciñas tivo como consecuencia un incremento significativo dun 66% na concentración constitutiva de resina na parte superior do talo de *P. radiata* en relación a plantas que creceron sen herbivoría na veciñanza. Sen embargo non se observou efecto noutros tecidos, no contido de polifenois totais, nin en *P. pinaster.* As plantas que creceron en presenza de veciñas atacadas por *H. abietis* mostraron respostas significativas ou marxinalmente significativas de susceptibilidade inducida unha vez que foron expostas a herbivoría real, en comparación con plantas que creceron sen herbivoría na veciñanza. As concentracións de defensas constitutivas son diferentes na parte superior e inferior do talo de piñeiros xuvenís, con máis resina na parte superior e máis polifenois na inferior nas dúas especies estudadas. De xeito conxunto, os resultados suxiren que os piñeiros poderían percibir os cambios bióticos no seu entorno, e a herbivoría en plantas veciñas pode modificar de algún xeito o sistema defensivo e a capacidade de resposta fronte a ataques posteriores dos piñeiros xóvenes. Sen embargo, os resultados non permiten concluír nin xeneralizar sobre o tipo de resposta.

Palabras clave: *Pinus* pinaster, *Pinus radiata, Hylobius abietis*, VOCs, agresións biolóxicas, emisora, receptora.

Resumen

Percepción del riesgo de herbivoría en dos pinos de interés forestal: cambios en la química defensiva.

Las plantas liberan continuamente complejas mezclas volátiles al aire y la composición de estas emisiones puede variar dependiendo de si la planta fue atacada y de la naturaleza específica del atacante. Estudios recientes han demostrado que los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) emitidos tras episodios de herbivoría pueden ser utilizados por las plantas para transmitir información a tejidos distantes, pueden ser percibidos por antagonistas de los herbívoros, y mismo pueden ser percibidos por las plantas vecinas indicándoles la existencia de riesgo, desencadenando cambios antes de un posible ataque y aumentando su resistencia en consecuencia. Tanto el pino del país (*P. pinaster)* como el pino insigne *(P. radiata)* son dos especies que han adquirido una gran importancia económica en el sector forestal gallego en los últimos tiempos por lo que, la comprensión de su comportamiento defensivo frente a agresiones biológicas, en particular en la edad juvenil, puede ser de utilidad para reducir las pérdidas económicas debidas a la herbivoría en estos géneros. En el presente trabajo de investigación se ha estudiado si plántulas de *P. pinaster* y *P. radiata* (*receptoras*) pueden modificar sus características defensivas cuando crecen en la vecindad de plantas atacadas por el coleóptero *Hylobius abietis* (*emisoras*). En particular, hemos cuantificado el contenido de resina no volátil y polifenoles totales en el tallo superior, inferior y acículas en las dos especies. En las plantas emisoras se ha observado un incremento significativo de las defensas químicas en *P. pinaster*, pero no en *P. radiata*. La herbivoría en plantas vecinas ha tenido como consecuencia un incremento significativo de un 66% en la concentración constitutiva de resina en la parte superior del tallo de *P. radiata* en relación a plantas que han crecido sin herbivoría en la vecindad. Sin embargo no se ha observado efecto en otros tejidos, en el contenido de polifenoles totales, ni en *P. pinaster.* Las plantas que han crecido en presencia de vecinas atacadas por *H. abietis* han mostrado respuestas significativas o marginalmente significativas de susceptibilidad inducida una vez que fueron expuestas a herbivoría real, en comparación con plantas que han crecido sin herbivoría en la vecindad. Las concentraciones de defensas constitutivas son diferentes en la parte superior e inferior del tallo de pinos juveniles, con más resina en la parte superior y más polifenoles en la inferior en las dos especies estudiadas. De forma conjunta, los resultados sugieren que los pinos podrían percibir los cambios bióticos en su entorno, y que la herbivoría en plantas vecinas puede modificar de alguna manera el sistema defensivo y la capacidad de respuesta frente a ataques posteriores de los pinos jóvenes. Sin embargo, los resultados no permiten concluir ni generalizar sobre el tipo de respuesta.

Palabras clave: *Pinus* pinaster, *Pinus radiata, Hylobius abietis*, VOCs, agresiones biológicas, emisora, receptora.

Abstract

Perception of biotic risk in the neighbourhood by young pine trees of two forestry species: changes in the concentration of chemical defences.

Most plants deliver continuously complex admixtures of volatile organic compounds (VOCs) to the surrounding atmosphere that may change in response to biotic aggressions. Recent papers have shown that those induced VOC's could serve for within-plant signalling of distant tissues, also for attracting herbivore predators and parasitoids, but also may be perceived by other plants in the neighbourhood as danger signals activating their defensive system. Little is know about these defensive abilities in Maritime Pine (*P. pinaster*) and Radiata Pine (*P. radiata*), two pine species with major relevance for forestry in northern Spain. Here we studied the ability of pine saplings of those species ('receptor' plants) growing during 40 days in experimental greenhouses for perceiving the herbivory suffered by neighbour plants ('emitters') by the large pine weevil (*Hylobius abietis*), and for changing their defensive phenotypes accordingly. In particular, we quantified the content on non-volatile resin and total polyphenolics in the needles and in the upper and lower part of the stems of receptor plants just after the growing period (constitutive) and after being exposed by herbivory by the weevil for 5 days (induced defences). Constitutive defences in the stem showed a marked within-plant distribution pattern, with more resin in the upper part a more polyphenolics in the lower part of the stem in both pine species. We found a significant 66% increase in the constitutive concentration of non-volatile resin in the upper part of P. radiata saplings grown in presence of herbivory in their neighbourhood. However we did not found changes in polyphenolics or other tissues in P. radiata neither in P. pinaster. Plants growing in the neighbourhood of attacked plants showed significant or marginally significant induced susceptibility responses when exposed to real herbivory, with lower levels of chemical defences than naive plants. Taken together, our results suggest that young pine trees can perceive biotic interactions in their surrounding environment, and that herbivory in the neighbourhood may modify defensive phenotype and the plasticity of defensive system in response to further attacks. However, our results do not allow to conclude about a generalized pattern of response across species or tissues and further research is needed in this field.

Key words**:** *Pinus pinaster, Pinus radiata, Hylobius abietis*, VOCs, chemical defences, priming, herbivory.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estrategias defensivas en coníferas

El género *Pinus* comprende un grupo de especies arbóreas muy longevas que aparecieron en la tierra hace unos 280 millones de años, y que cuentan con una amplia distribución geográfica, adaptados a vivir en diferentes hábitats, desde el trópico hasta zonas boreales *(Richardson 1998)*. Fruto de esta longevidad y de su gran tamaño, los árboles de este género están especialmente expuestos a los enemigos naturales, entre los que destacan los insectos herbívoros y los hongos patógenos. Por ello, es lógico pensar que estas especies tienen que estar dotadas de unos excelentes mecanismos de defensa que hagan posible esta expansión y persistencia a lo largo de las eras geológicas superando a las numerosas plagas y enfermedades a las que se encuentran expuestos día a día *(Phillips & Croteau 1999).*

Dichos mecanismos de defensa resultan eficaces incrementando la **resistencia** frente al ataque de insectos y patógenos (*Schulman 1954*), en la manera que lleguen a reducir los daños causados, bien sea evitando o reduciendo la incidencia del ataque (*Wagner et al. 2002*). Pero además, los pinos, como el resto de las plantas también pueden presentar mecanismos de **tolerancia** por los cuales reducen el efecto negativo que los daños de agentes externos provocan sobre el éxito biológico de la planta (*fitness*) (*Strauss & Agrawal 1999*).

Los mecanismos de resistencia en coníferas pueden clasificarse, dependiendo del tiempo de aparición en la planta, en **defensas constitutivas** y **defensas inducidas**. Las defensas constitutivas son estructuras físicas o compuestos químicos que se producen y acumulan independientemente de la presencia de daño, y están determinadas fundamentalmente por la genética y el ambiente (*Rosner & Hannrup 2004; Franceschi et al. 2005*). Las defensas inducidas son aquellas que aparecen como consecuencia de un ataque, con la finalidad de incrementar la capacidad defensiva de la planta en respuesta a esa primera invasión (Karban & Baldwin 1997; Franceschi et al. 2005). Su naturaleza depende del genotipo de la planta y del ambiente, pero también está determinada por el agente causante del daño y por complejas interacciones entre este y la planta (*Agrawall & Heil 2012*).

Una importante ventaja que presentan las defensas inducidas frente a las constitutivas es que el coste que estas suponen para la planta sólo se produce si es necesario, es decir, cuando la planta es lesionada o percibe información de la presencia de un herbívoro (*Karban & Myers 1989; Strauss & Agrawal 1999*). Por el

contrario, las defensas constitutivas, están siempre presentes en la planta, resultan muy costosas de producir y mantener, y por lo tanto podrían estar comprometiendo la inversión con otras funciones principales de la planta, tales como el crecimiento y la reproducción (*Sampedro et al. 2011*). Las defensas constitutivas suponen un coste muy elevado que podría resultar en vano si nunca se llega a hacer uso de ellas, es decir, si la planta no resulta finalmente atacada. Dicho de otra manera, una planta con bajas defensas constitutivas dispondría de más recursos para crecer y reproducirse y por lo tanto tendría mayores posibilidades de conseguir un éxito biológico superior en ausencia de daños.

La desventaja de las defensas inducidas reside, fundamentalmente, en el tiempo que transcurre entre el primer ataque y la activación de la defensa, durante la cual las plantas siguen siendo vulnerables *(Heil & Baldwin 2002)*. Lo contrario ocurre en el caso de los mecanismos constitutivos, que resultan eficaces en el momento preciso porque están siempre presentes. Una posibilidad de evitar esta desventaja de las defensas inducidas, es utilizar información del medio ambiente o de ataques anteriores para predecir o prever el riesgo futuro de ser atacado y ajustar el fenotipo defensivo en consecuencia.

Las defensas constitutivas e inducidas actúan como un conjunto integrado en el espacio y en el tiempo. En un primer lugar, las defensas constitutivas repelan o inhiben la invasión de los tejidos. En el caso de que esta fase no resultase efectiva, el siguiente paso sería aniquilar al enemigo biológico mediante respuestas defensivas inducidas, incluso aislando al tejido dañado. La tercera fase se basaría en reparar el daño producido por la herbivoría para que la planta pueda continuar con su función normal. Finalmente, la última fase consiste en adquirir una resistencia adquirida de manera sistemática para protegerse de ataques que puedan suceder en el futuro *(Franceschi et al. 2005)*.

Investigaciones recientes indican que también existe un estado intermedio entre el nivel constitutivo e inducido de las plantas en el que, estas, una vez advertidas de la presencia de un aumento de riesgo de una agresión biótica reaccionan “preparando” su maquinaria defensiva mediante cambios en el nivel molecular dando lugar a un estado conocido como **cebado de la defensa** o *priming*, en el que la planta lo que hace, más que incrementar las defensas, es simplemente preactivarse ante un futuro ataque probable. Una planta en este estado es capaz de responder más rápidamente y enérgicamente al ataque de herbívoros si dicho ataque se llegase a producir.

Las defensas inducidas también pueden activarse mediante la aplicación exógena de fitohormonas como el ácido jasmónico, involucradas en la señalización de las respuestas de defensa de las plantas *(Thaler et al. 2001; Pieterse et al. 2012)*.

El Metil-Jasmonato (MeJa), derivado del ácido jasmónico, es una sustancia reguladora del metabolismo vegetal para el que se tienen descrito varias funciones fisiológicas, como son la inducción de la senescencia y la caída de la hoja, la inhibición del crecimiento radical y, se demostró que induce la expresión de varios genes relacionados con el estrés hídrico *(Creelman & Mullet, 1997)* . A principios de los años 90 se descubrió que la aplicación de esta fitohormona a cultivos celulares de tejidos de varias especies de plantas herbáceas inducía a la síntesis de proteínas específicas y de sustancias defensivas similares a las que se producen mediante la herbivoría real *(Gundlach et al. 1992; Creelman & Mullet 1995)*. Y posteriormente se demostró el mismo efecto del MeJa en plantas vivas *(Heijari et al. 2005; Huber et al. 2005; Zeneli et al. 2006).*

Existen varias rutas de señalización del daño hecho por herbívoros y patógenos. Es un campo de investigación muy activo en los últimos años, sobre todo con plantas modelo, y se tienen descrito varias hormonas vegetales implicadas en la señalización y activación de la síntesis de compuestos defensivos, como el ácido jasmónico y sus derivados, el ácido salicílico, el etileno, ácido abcísico, etc. *(Pieterse et al. 2012)*. En general, parece que la ruta del ácido jasmónico se activa ante daños por insectos masticadores de hojas o corteza y hongos patógenos necrotrofos; mientras que la ruta del ácido salicílico se activa más en respuesta a insectos chupadores de floema y hongos patógenos biótrofos *(Thaler et al. 2012)*.

1.2. Mecanismos de resistencia en coníferas

A lo largo de su larga historia evolutiva, las coníferas han conseguido adaptar su anatomía para protegerse de los ataques que pudiesen llegar a sufrir por parte de multitud de organismos nocivos. Estas **adaptaciones anatómicas** incluyen la corteza externa, compuesta principalmente de células lignificadas y suberificadas, que sirven de barrera física contra el ataque de insectos y hongos; la corteza interna y floema secundario, que contienen una gran variedad de tipos de células relacionadas con la defensa tales como el esclerénquima y esclereidas (células fuertemente lignificadas que contienen cristales de oxalato de calcio y parénquima polifenólico que puede estar implicado en la producción y almacenamiento de compuestos fenólicos tóxicos); y

conductos de resina o canales resiníferos formados por células especializadas que segregan terpenos al lumen del canal *(Franceschi et al. 2005; Bohlmann 2008)*.

A nivel químico, uno de los mecanismos de defensa constitutivos de mayor importancia en las coníferas es la producción de **oleorresina**, una mezcla de ácidos resiníferos y monoterpenos, que se produce en células resinosas especializadas y en los canales resiníferos axiales del floema y del xilema (Figura 1). En el xilema, existen también canales de resina radiales que pueden contribuir al flujo de resina cuando son conectados a los canales axiales del floema *(Franceschi et al. 2005)*.

Los monoterpenos (C10) y los diterpenos (C20) son los principales componentes de la oleorresina en coníferas *(Bohlmann & Croteau 1999; Trapp & Croteau 2001)*, mientras que los sesquiterpenos (C15), son menos abundantes en la resina y, tienen una gran diversidad estructural. La oleorresina se moviliza a la herida y a los lugares de infección y los terpenos que contienen sirven para proteger contra los herbívoros y la invasión de patógenos debido a su toxicidad y capacidad de disuasión *(Phillips & Croteau 1999)*. Después de la exposición a la atmosfera, los mono- y sesquiterpenos volátiles se evaporan, mientras que los diterpenos ácidos polimerizan, sellando la herida.

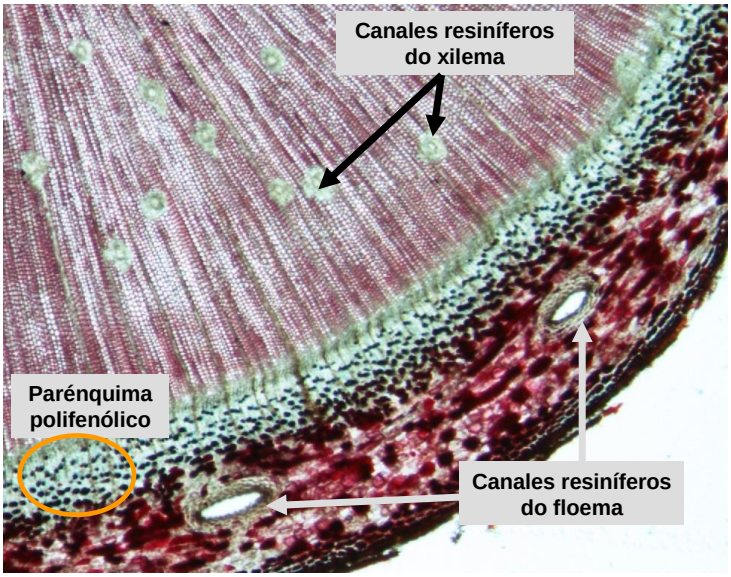


Figura 1. Corte transversal del tallo de un pino joven en donde se aprecian diferentes estructuras defensivas características de las coníferas. Foto: Luís Sampedro y Xoaquín Moreira.

Un grupo importante de compuestos secundarios por su abundancia, diversidad y complejidad son los llamados **compuestos fenólicos**, considerados como una de las mayores defensas en coníferas contra insectos herbívoros y hongos patógenos *(Franceschi et al. 2005)*. Existe una gran variedad de estos compuestos, entre ellos: fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, flavonoides, lignanos y taninos. La síntesis de fenoles está relacionada con el proceso fotosintético mediante un precursor común, la fenilalanina, por lo que es más asequible en términos de tiempo, e incluso pueden traslocarse compuestos fenólicos de unos órganos de la planta a otros si fuese necesario, permitiendo una reacción anti patógena casi inmediata. La modificación en la concentración y composición de metabolitos secundarios (fenoles y terpenos) y la producción de canales de resina traumáticos (que producen a su vez resina inducida con una mayor concentración de fenoles y terpenos que la resina normal) son las defensas inducidas más comunes en coníferas. Los canales traumáticos aparecen normalmente en el xilema en forma de anillo, generando una barrera capaz de aumentar el flujo y la acumulación de resina aumentando la resistencia para futuros ataques *(Franceschi et al. 2005)*. En respuesta al ataque se tiene observado también una mayor acumulación de resina en el floema, aunque sin un incremento en el número de canales resiníferos *(Moreira et al. 2008)*; *(Moreira et al. 2012)*.

Se puede decir que los cambios en la concentración y perfil de los terpenos y compuestos fenólicos constituyen una de las primeras respuestas ante el ataque o el estrés provocado por la herbivoría *(Baraza et al. 2004)*, ya que no implica la creación de nuevas estructuras. Por el contrario, el aumento de la cantidad total de la resina puede precisar la producción de canales traumáticos (Figura 2) para su conducción, lo cual conlleva a un retraso temporal en la respuesta defensiva.

Por ello, el estudio de la concentración de los compuestos fenólicos tras una inducción de respuestas defensivas puede ser útil para conocer la capacidad defensiva de una planta bajo unas determinadas condiciones.

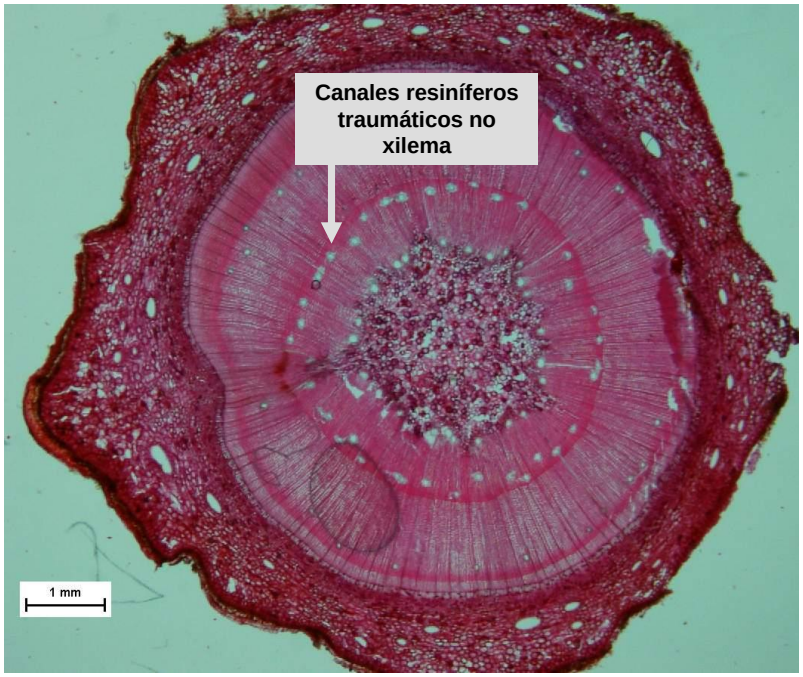


Figura 2. Corte transversal del tallo de un pino joven donde se aprecia un anillo de canales resiníferos traumáticos al final del crecimiento del primer año. Foto: Xoaquín Moreira.

1.3 . Mecanismos de tolerancia en coníferas

Las coníferas, como el resto de las plantas, también pueden apostar por tolerar el ataque minimizando los efectos del daño sobre la eficacia biológica y desenvolviendo una mayor capacidad de recuperación tras el ataque. Podemos definir la **tolerancia** como la habilidad que presentan las plantas para soportar condiciones de estrés sin consecuencias importantes para su crecimiento, apariencia y reproducción *(Strauss & Agrawal 1999)*.

Existen diferentes mecanismos de tolerancia al daño causado por la herbivoría, como por ejemplo el aumento de la actividad fotosintética de las hojas remanentes, el crecimiento compensatorio, el incremento en la ramificación y los brotes cuando se produce una pérdida de la dominancia apical, la activación de meristemos durmientes, el almacenamiento de altos niveles de hidratos de carbono en diversos tejidos y órganos para su posterior distribución a los tejidos reproductivos, el cambio en los patrones de adjudicación de nutrientes y biomasa entre los diferentes tejidos de las plantas o la redistribución de hidratos de carbono desde las raíces a las partes aéreas o incluso la activación de la asociación con hongos mutualistas del suelo *(Trumble et al. 1993; Strauss & Agrawal 1999; Tiffin 2000; Núñez-Farfán et al. 2007)*.

En particular, la tolerancia al daño causado por los herbívoros puede incluir una reasignación rápida y activa de los recursos vegetales para reducir el impacto de los mismos sobre la aptitud futura de la planta. Recientemente, *Moreira et al. (2012)* han descubierto dos nuevos supuestos mecanismos de tolerancia en plántulas de *Pinus pinaster*, inducidos mediante MeJa, que pueden ayudar a minimizar el impacto del daño de los herbívoros sobre el suelo de la futura aptitud de pinos jóvenes: (i) la asignación de carbono a las raíces finas, una estrategia generalizada con débil modulación ambiental y (ii) la reasignación de nutrientes (P e N) de las raíces a los brotes, reasignación que puede ayudar en la síntesis de defensas inducidas en la parte aérea.

Los mecanismos de tolerancia y la capacidad de responder a la herbivoría mediante la activación de defensas inducidas pueden jugar un papel clave para superar la presión de los enemigos naturales. Por ejemplo, las diferencias entre la resistencia inducida y la tolerancia a los herbívoros nativos entre especies nativas y exóticas podría contribuir a explicar por qué algunas especies se vuelven invasivas fuera de su hábitat natural y otras no. *(Zas et al. 2011)* Han examinado las diferencias en resistencia constitutiva, inducibilidad y tolerancia entre el pino nativo (*Pinus pinaster)* y el pino exótico (*Pinus radiata*) para profundizar en el papel de los herbívoros locales en la escasa invasibilidad de *P. radiata* en el noroeste de España, en donde estas dos especies conviven estrechamente y están amenazadas por el gorgojo del pino, *Hylobius abietis*. Los resultados indican que el pino nativo *P. pinaster* es el preferido por el *H.abietis* aun que en el campo el que resulta más atacado es el pino exótico (*P. radiata*) porque este presenta una menor capacidad para responder al daño del insecto y una tolerancia mucho más reducida que la del pino nativo quien, además, mostró una variación genética en la tolerancia al daño. La preferencia del herbívoro por las especies nativas se vio contrarrestada por una menor capacidad para la expresión de la resistencia inducida al gorgojo y a la reducción de la tolerancia por parte de las especies exóticas, dando lugar a ninguna ventaja aparente en la aptitud de *P. radiata* sobre el nativo *P. pinaster*. Las diferencias en la capacidad de inducción y en la tolerancia a los enemigos nativos entre congéneres exóticas y nativas aparecen como rasgos clave para la comprensión de cómo los enemigos nativos podrían contribuir a la prevención de que una especie introducida se convierta en invasora.

1.4. Mecanismos de resistencia indirecta

Los mecanismos de defensa en coníferas también se pueden clasificar, dependiendo de cómo se causa el efecto negativo sobre el agente invasor, en **defensas directas** y **defensas indirectas**. Las defensas directas actúan directamente sobre el agente invasor, alterando su comportamiento o su eficacia biológica. Un buen ejemplo de defensas directas es el caso de producción de resina ya que la presencia en cantidad de esta hace que la planta resulte menos palatable y atractiva para los insectos pudiendo reducir así los daños causados por estos *(Moreira 2010).*

Pero las plantas también pueden afectar a las poblaciones de herbívoros indirectamente a través de otros elementos del ecosistema que actúan a modo de intermediarios. Las plantas liberan continuamente complejas mezclas volátiles al aire y la composición de estas emisiones puede variar dependiendo de si la planta fue atacada y de la naturaleza específica del atacante. Estos compuestos, llamados compuestos orgánicos volátiles (*Volatile Organic Compounds,* VOCs), a veces se pueden considerar como una defensa indirecta ya que pueden proporcionar información sobre el estado de la planta atacada al resto de la comunidad biológica. En las dúas últimas décadas, emergió un gran interés por los VOCs debido a sus propiedades como atrayentes de polinizadores, como señales para situar fuentes de comida, anidación, cría, recompensa, feromonas, etc. *(Knudsen et al. 1993)* (Figura 3).

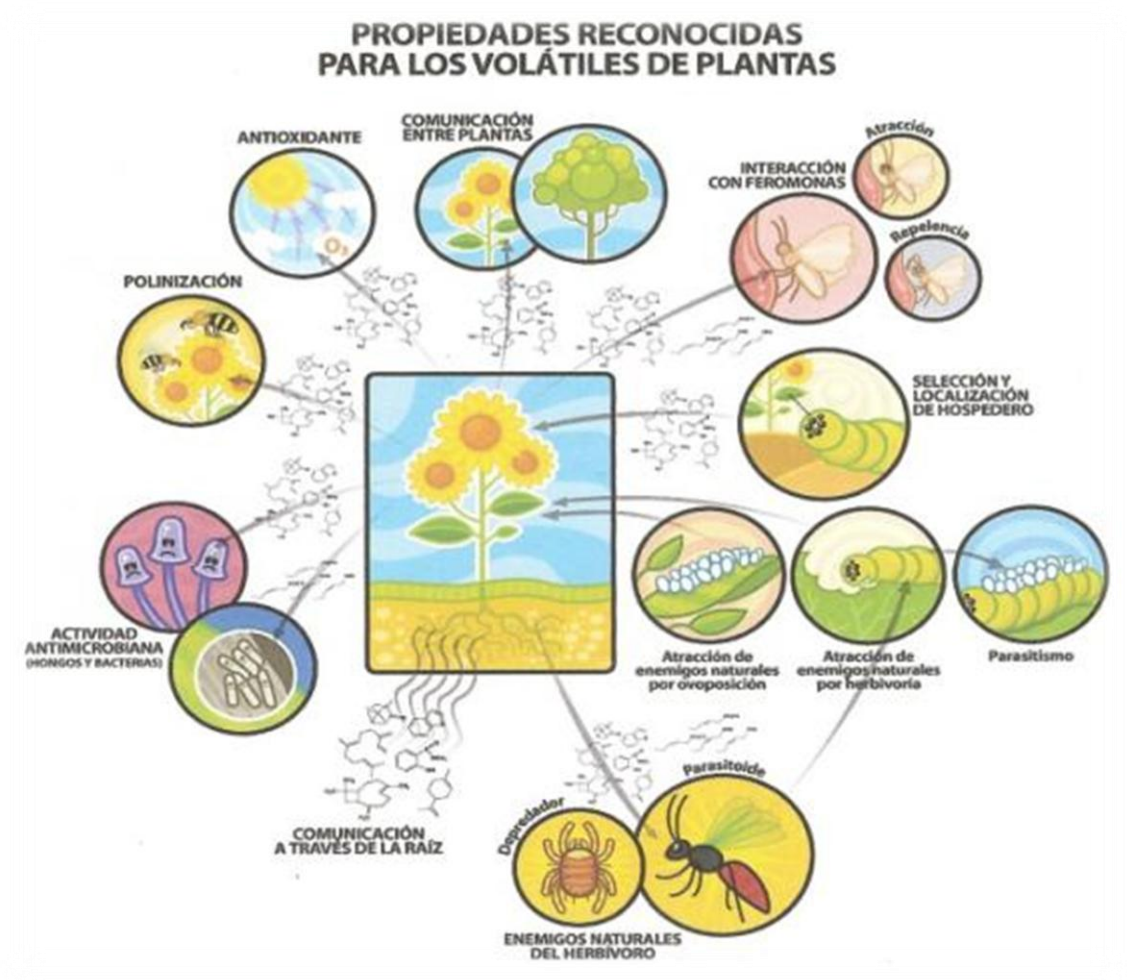


Figura 3. Esquema de las propiedades reconocidas para los volátiles de plantas *(Marín-Loaiza & Céspedes 2007)*.

En particular, como consecuencia del daño efectuado por los herbívoros, las plantas pueden liberar volátiles al quedar expuestas las estructuras secretoras donde los sintetizan o almacenan, o debido a la ruptura de los propios tejidos vegetales. Otros compuestos volátiles son sintetizados de nuevo horas o días después del daño *(Mattiacci et al. 1995; Rose et al. 1996)*.

Los VOCs pueden llegar a llenar el espacio aéreo alrededor de una hoja dañada por un herbívoro e inducir, rápidamente, a las hojas vecinas, que podrían estar anatómicamente distantes *(Heil & Silva Bueno 2007)*, es decir, los VOCs actuarían como un método de señalización entre partes del propio organismo en el que el mensaje de daño se transmite vía aérea. Esto puede ser especialmente relevante en grandes plantas muy ramificadas y árboles en donde partes físicamente próximas pueden estar muy alejadas vía el sistema vascular *(Heil & Ton 2008)*. Este sistema de

comunicación vía aérea resultaría mucho más rápido y eficaz para prevenir o controlar el ataque.

Los VOCs, particularmente aquellos inducidos por la herbivoría, son señales que pueden indicar a los depredadores y parasitoides que una planta está siendo atacada, y funcionar pues como defensa indirecta contra los herbívoros que la están consumiendo, a modo de una especie de señal de socorro o "*call for help" (Baldwin et al. 2006)*. Así los VOCs pueden funcionar como señales de comunicación en interacciones tritróficas que aumentan el éxito de la búsqueda de alimento por parte de los predadores o parasitoides y facilitan el control de las poblaciones de herbívoros de la planta *(Takabayashi & Dicke 1996; Heil 2008)*. Igualmente, las plantas pueden proporcionar alimento y refugio en estructuras especializadas a los enemigos de los herbívoros *(Kessler & Baldwin 2001)*.

Como ejemplo de la interacción con depredadores se puede citar el de la planta *Phaseolus lunatus,* que al ser infectada por el ácaro *Tetranychus urtica* libera volátiles que atraen al depredador *Phytoseiulus persimilis* que se alimenta de ellos. Aunque el ataque por parte de *T. urtica* sea masivo, cuando los depredadores aparecen se reduce drásticamente la población de herbívoros *(Dicke et al. 1990; Dicke et al. 1993; Takabayashi & Dicke 1996)*.

1.5. Comunicación planta - planta

Casi desde que se evidenció que los volátiles mediaban en la defensa indirecta, se viene discutiendo la posibilidad de que las mezclas de volátiles orgánicos fueran transportadoras de información entre plantas y les permitiese establecer una "comunicación" entre ellas. Los estudios iniciales carecían de rigor científico por contar con serias deficiencias experimentales, como la dosis aplicada, mecanismos de acción desconocidos, carencia de experimentos en el campo y de realismo en las metodologías empleadas, por lo que no había un consenso de aceptación. En los últimos años este panorama ha cambiado y se han reportado una serie de experimentos contundentes que apoyan al postulado de la comunicación planta -planta mediada por volátiles.

Así, en determinadas especies, las plantas incrementan rápidamente sus defensas en respuesta a las señales que emiten a las vecinas que se encuentran bajo el ataque de herbívoros o patógenos, y emplean esta información para desplegar defensas directas o indirectas *(Dicke & Bruin 2001; Frost et al. 2007; Heil & Silva*

Bueno 2007). Las plantas que son capaces de activar sus defensas en respuesta a la información proporcionada por sus vecinas, aparte de hacer su defensa más efectiva pueden tener ventaja sobre las plantas que no reconocen esa información *(Dicke et al. 2003)*.

La comunicación con plantas dañadas o enfermas se puede dar de varias maneras: señalización con plantas sanas de la misma especie, con plantas de otras especies, y señalización interna en la planta a través de substancias volátiles *(Farmer 2001)*.

Podemos poner como ejemplo el realizado por Karban, Baldwin et al.*(2000)*, en donde ha confirmado que las hojas de plantas sanas de *Nicotiana attenuata* respondían a las señales liberadas por sus vecinas *Artemisia tridentata.* Durante tres de las cinco temporadas que duró el estudio, las plantas de *N. attenuata* que tenían como vecinas a plantas de artemisa dañadas (corte con tijera) han reducido considerablemente los niveles de daño por herbivoría, comparado con el control sin cortar, e incrementaron sus niveles de enzimas oxidativas implicadas en la defensa, como polifenoloxidasas.

Los descubrimientos mencionados muestran claramente que puede existir la comunicación entre plantas por medio de señales aéreas, lo que ilustra lo complejas que pueden llegar a ser las interacciones que involucran compuestos volátiles, herbívoros, depredadores o parasitoides, además de señales responsables de transmitir la información a otras partes de la planta o a otras plantas, y la interacción de estas redes de comunicación *(Van der Putten et al. 2001; Bezemer & Dam 2005)*. En el vídeo documental producido por el CSIC y patrocinado por la FECYT y Fundación Barrié titulado “El lenguaje de los bosques” (ver enlace en: http://www.cienciatk.csic.es/Videos/EL+LENGUAJE+DE+LOS+BOSQUES_26018.html) se explican algunas de las funciones de los VOCs y que, si las plantas se comunican entre sí, esta comunicación podría ayudar a garantir su supervivencia, a lo largo de los años. La comunicación entre plantas es un fenómeno que, por lo tanto, está demostrado en un buen número de especies, pero aun no se sabe si esto se puede llegar a dar en coníferas.

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A día de hoy se sabe que cuando ciertas partes de un pino resultan dañadas por algún insecto, estas transmiten al resto del árbol mediante señales químicas el mensaje de la existencia de peligro, y pueden dejar de crecer y dedicar todos sus recursos a producir barreras químicas y físicas adaptando su anatomía y fisiología a dicha situación de riesgo *(Moreira 2010)*. Así, los pinos pueden percibir cambios en el ambiente que los rodea, detectar la presencia de organismos perjudiciales, identificarlos, activar sus defensas y cambiar su fisiología para hacer frente al estrés biótico que se avecina.

Recientes estudios, ponen de manifiesto que una de las respuestas defensivas más características de las plantas, incluyendo los pinos, a los ataques de herbívoros, son las alteraciones en la emisión de compuestos orgánicos volátiles a la atmosfera *(Sampedro et al. 2010)*. Dichas emisiones de compuestos volátiles podrían estar involucradas en un sistema de comunicación interna en el propio árbol, donde los cambios en la emisión de VOCs tras un daño en un determinado tejido, señala la presencia del ataque a partes remotas de este, sin necesidad de recorrer al costoso transporte por el sistema vascular. Del mismo modo, los cambios en la emisión de VOCs tras un episodio de herbivoría podrían ser percibidos por plantas vecinas como un mensaje de riesgo que lleve a modificaciones en su fenotipo para hacer frente al estrés biótico que previsiblemente se avecina. Esto se sabe que ocurre en distintas especies de plantas como *Nicotiana attenuata (Karban et al. 2000)* o *Alnus glutinosa (Dolch & Tscharntke 2000)* pero aun no se conoce si también puede ocurrir en pinos. A día de hoy, en pinos sabemos que la emisión de VOCs se modifica notablemente tras un episodio de daño biótico (p. ej. *(Sampedro et al. 2010)*, pero se desconoce si estos cambios pueden ser detectados por árboles vecinas.

En el presente trabajo de investigación pretendemos estudiar si las plántulas de pino podrían de alguna manera modificar su fenotipo defensivo tras percibir la herbivoría en plántulas vecinas. En particular, estudiamos las especies *Pinus pinaster* y *Pinus radiata* cuando son sometidas al ataque experimental por parte del curculiónido *Hylobius abietis* para encontrar respuestas a los siguientes objetivos específicos:

1. ¿Es capaz una plántula de pino de detectar el daño de un insecto herbívoro en una planta vecina? En particular se pretende determinar si:

1a. ¿Modifican las plantas de pino los niveles basales de resistencia química constitutiva ante la presencia de un ataque de H. *abietis* en una planta vecina?

1b. ¿Son capaces de reaccionar más intensamente al ataque de *H. abietis* las plantas de pino que crecieron próximas a plántulas atacadas?

1c. ¿Se acelera la respuesta al ataque de *H. abietis* en las plantas de pino que crecieron próximas a plántulas atacadas?

2. ¿Son estas respuestas de las plantas receptoras dependientes de la especie emisora-receptora, es decir, reconocen los pinos las señales volátiles emitidas por otras especies congéneres o solo las de su misma especie?

Responder a la pregunta 1 nos informará de la existencia de procesos de señalización entre pinos, estando la pregunta 1a relacionada con las respuestas defensivas inducidas y las preguntas 1b y 1c con fenómeno del *priming*. La pregunta 2 nos estará informando sobre si el lenguaje de la comunicación entre pinos es compartido entre especies o por el contrario es particular de cada especie.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Fotografía de Niklas Björklund

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Los hospedadores

a) Pinus pinaster Ait.

Pinus pinaster Ait., también conocido como “pino del país” o “pino gallego”, es una gimnosperma del género *Pinus* perteneciente a la familia *Pinaceae*. Dentro del género, se encuadra en la sección *Pinea*, de pinos de carácter mediterráneo como *P. brutia*, *P. canariensis* y, *P. halepensis*.

Su tronco es grueso, derecho, ramoso y con la corteza de la parte media y baja del fuste pardo-negruzco y, profundamente, fendida. Las acículas son largas y punzantes, distribuyéndose de forma helicoidal a lo largo de las ramas, y están insertadas en los braquiblastos en grupos de dos. Sus piñas suelen tener forma encorvada, con un ombligo comprimido, recto y case punzante, con dos piñones alados en cada escama.

El pino del país está considerado como una de las especies más importantes en el sector forestal gallego, en donde se distinguen dos procedencias, la noroeste litoral y la noroeste interior (LRP de *P. pinaster;* Figura 4), es donde ocupa alrededor de 400.000 ha en masas puras y 200.000 ha formando masas mixtas con *Eucaliptus globulus Labill.* y *Quercus robur L.* (Figura 5).

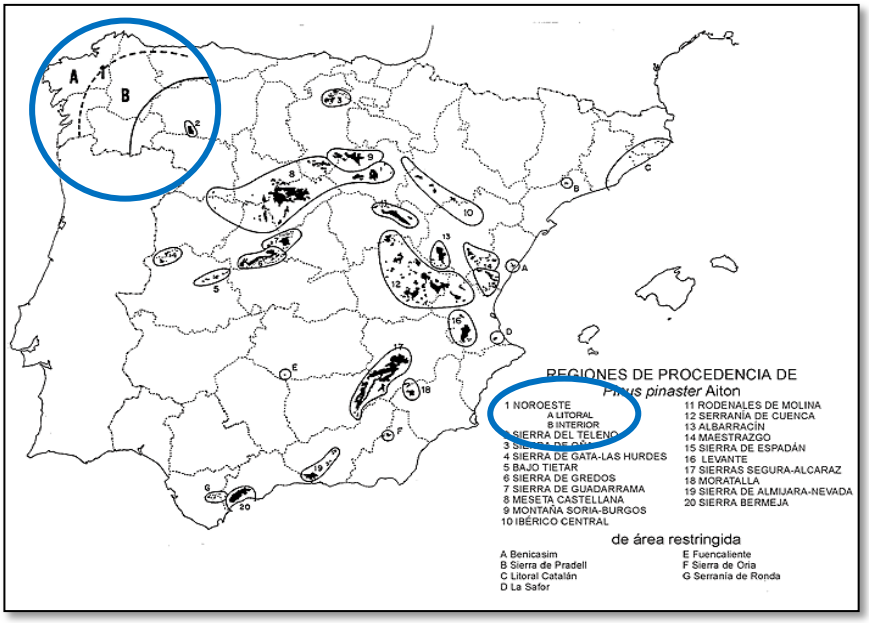


Figura 4. Libro de regiones de procedencia de *P. pinaster (Alia et al., 1996).* http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/montes-y-politica-forestal/pinus_pinaster_tcm7-26719.gif

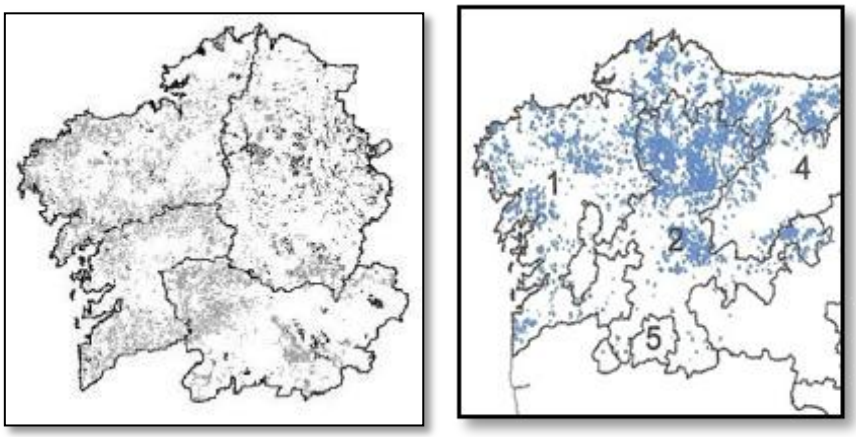


Figura 5. Distribución de las especies forestales utilizadas en la presente memoria en masas monoespecíficas o como especie principal en Galicia. http://wwwsp.inia.es/Investigacion/centros/CIFOR/redes/Genfored/Documents/pinus_radiata.df

En Galicia, se ha convertido en la especie más utilizada en repoblaciones, con una tasa de plantación superior a las 3.000 hectáreas anuales *(Álvarez-González et al. 2005)*. Dada su relevancia productiva, en los años 80 se empezó un programa de mejora genética, impulsado por la Xunta de Galicia a través del Centro de Investigaciones Forestales de Lourizán, y cuyo fin último es el abastecimiento de semilla de alta calidad genética para su uso en las repoblaciones de la zona costa de Galicia *(Zas & Merlo 2008)*.

De todos los pinos peninsulares, *P. pinaster* es el de crecimiento más rápido y la especie que más contribuye a la producción de madera en España (15%) *(de la Mata et al. 2012)*. Durante los últimos cincuenta años esta especie ha sufrido fuertes pérdidas de superficie a causa del fuego, factor al que muestra variadas adaptaciones, como el florecimiento precoz, corteza gruesa y la presencia de conos serotinos *(Alía & Martín 2009)*.

Se trata de un árbol de 25 m. de altura, aun que en suelos ricos y profundos puede llegar hasta los 40 metros. Antiguamente, se utilizaba para obtener la resina de la que se extraía la trementina aunque ahora su uso está más enfocado para la producción de madera de sierra y trituración.

b) *Pinus radiata D. Don*

El pino insigne o pino de Monterrey (*Pinus radiata* D. Don), junto con *P. pinaster* y *E. globulus,* está considerado como una de las especies forestales de mayor importancia comercial en Galicia.

Su copa tiene forma cónica y las acículas son de color verde oscuro, insertadas de forma helicoidal en grupos de tres en tres en los braquiblastos. Las piñas son asimétricas, pueden permanecer varios años sentadas en las ramas sin abrirse, y contienen un grupo de escamas con la apófisis hinchada.

Es una especie originaria del suroeste de América del Norte (Figura 6) que ha tenido una buena adaptación en regiones templadas de distintos continentes. A pesar de que en su área natural la especie se encuentra casi en peligro de extinción, hoy en día es una de las especies arbóreas más plantadas, ocupando más de 4 millones de ha, principalmente repartidas por países del Hemisferio Sur como Nueva Zelanda, Chile o Sudáfrica.

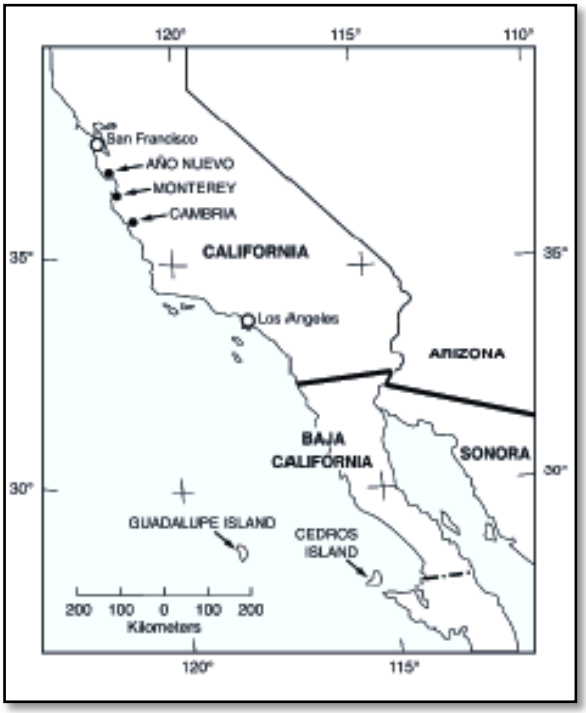


Figura 6. Área de distribución natural del Pino insigne (*Pinus* radiata) en las costas de California (Estados Unidos), y en las islas de Guadalupe y de Cedros, en la Baja California (Méjico). http://www.fao.org/docrep/005/y4341e/Y4341E07.htm

En España se encuentra principalmente en una franja estrecha del Norte de la Península Ibérica, en altitudes inferiores a los 800 metros *(Dans et al. 1999)*. El tercer

Inventario Forestal Nacional (IFN) señala que Galicia cuenta con 89.915 ha arboladas de *Pinus radiata* D. Don con fracción de cabida cubierta superior al 20%, si bien se reconoce que únicamente 59.198 revisten cierta entidad superficial, en donde la especie es dominante (D.G.C.N., 2000; Xunta de Galicia, 2001).

Por su difícil regeneración natural, el método generalizado de regeneración de los montes de esta especie en la Península Ibérica es la repoblación artificial.

Esta especie se ha plantado mucho en los últimos años en Galicia a causa de sus buenos crecimientos y de sus buenas características tecnológicas para distintos usos de la madera. Sin embargo, junto con *P. pinaster,* se trata de una especie relativamente delicada de manejo, en cuanto a su sensibilidad a plagas (ej. *Hylobius abietis, Thaumetopoea pityocampa,…*) y enfermedades (ej. *Fusarium circinatum*).

3.2. El Curculiónido *Hylobius abietis (L).*

Hylobius abietis (L) es un coleóptero de la familia *Curculionidae*, conocido como el gorgojo de los pinos (Figura 7), que se distribuye por toda Europa y gran parte de Asia. El adulto mide de 7 a 13 mm de longitud y está provisto de una trompa ligeramente arqueada, con dos antenas insertadas en su extremo, carácter este que los diferencia de su pariente *Pissodes notatus.*

Figura 7. Fotografía de un insecto adulto del curculiónido *H. abietis* (*Linnaeus,* 1758). Foto de Claes Hellqvist.
http://www2.ekol.slu.se/snytbagge/image_downloads/snytbaggebilder/Hylobius_09_Claes_Hellqvist.jpg

A finales de la primavera, los insectos adultos vuelan largas distancias en busca de nuevos hábitats, atraídos por los productos químicos volátiles emitidos a partir de troncos recientemente cortados *(Nordlander et al. 1986)*. Las hembras realizan la puesta sobre los tocones y raíces de árboles recién cortados o debilitados

(Nordenhem & Nordlander 1994). Una vez pasadas dos o tres semanas, nacen las larvas, blanquecinas y encorvadas (Figura 8), que empiezan a alimentarse del floema bajo la corteza, escavando galerías y, al completar su desarrollo realizan la pupación (Figura 9), dejando la entrada taponada con serrín.

Figura 8. Larva del gorgojo *H. abietis* (*Linnaeus,* 1758)- Foto de D. Doychev. http://www.zin.ru/Animalia/Coleoptera/eng/hylabldc.htm.

Figura 9. Detalle de una cámara de pupación de *H. abietis* dentro de una raíz (*Linnaeus,* 1758)- Foto de C. Hellqvist. http://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5434905

Pasadas dos o tres semanas después de la fase de pupación, emergen los adultos. Debido a la longevidad de este insecto y a las nuevas generaciones que se forman, una población puede permanecer en un mismo lugar de 2 a 4 años *(Örlander et al. 1997)*.

El daño principal lo hace el adulto, que se alimenta de la corteza y del floema de distintas especies arbóreas, principalmente coníferas (Figura 10). Cuando el ataque es intenso, se producen verdaderas decortificaciones, seguidas de anillamiento del tallo y muerte de la planta. El adulto come durante todo el período vegetativo, pero los ataques se observan, sobre todo, en los meses de abril-mayo y agosto-septiembre.

Figura 10. a) Adulto de *H. abietis* alimentándose de la corteza y floema de una planta de semillero de *Pinus sylvestris*. http://www2.ekol.slu.se/snytbagge/hem_eng.php. **b)** Adulto de *Hylobius abietis* alimentándose de la corteza y floema de un pino.

Los factores que favorecen la propagación de la plaga son todos los que ocasionen debilitamiento de la planta y especialmente la existencia de pies moribundos y tocones. Sin embargo, los daños ocasionados en el regenerado pueden ser más fuertes en plantas vigorosas, bien fertilizadas y de buenos crecimientos *(Zas et al. 2006; Zas et al. 2008)*.

Durante los primeros años después de la corta de rodales maduros de coníferas, los adultos se alimentan de la corteza y del floema de plantas jóvenes (Figura 10) causando pérdidas importantes de crecimiento, deformación del tallo, pérdida de dominancia apical y una alta mortalidad *(Örlander & Nordlander 2003; Sampedro et al. 2009; Nordlander et al. 2011)*.

La regeneración exitosa de los bosques de coníferas depende en gran medida de la supresión efectiva de los daños causados por el gorgojo del pino *H. abietis.* En el centro y norte de Europa, para llegar a lograr unos niveles aceptables de supervivencia de plántulas es necesario la aplicación de diferentes medidas preventivas e incluso recurrir al uso de insecticidas *(Nordlander et al. 2011)*. La mortalidad causada por *H. abietis* es mucho menor en plantas que se encuentran enterradas en el suelo de mineral puro, sin humus, y en plantas de más edad con un diámetro de tallo mayor. Las de tallo delgado son mucho más vulnerables a sufrir anillamiento del tallo (Figura 11).

Figura 11. Plántula de pino dañada por *H. abietis* provocándole anillamiento del tallo y, por tanto, su posterior muerte. Foto de C. Hellqvist. http://www2.ekol.slu.se/snytbagge/image_downloads/snytbaggegnag/Snytbaggegnag_05_Claes_Hellqvist.JPG

3.3. Material vegetal utilizado.

Para conseguir los objetivos marcados en el presente proyecto, utilizamos un **total** de **264 plantas,** cuya semilla era de procedencia desconocida, de dos savias, cultivadas en el vivero Norfor-Pontevedra (Croas, 15 Figueirido, 36140, Vilaboa, Pontevedra- http://www.ence.es), de las cuales 132 pertenecían a la especie *P. pinaster* y las otras 132 a *P. radiata*. Las plantas fueron escogidas al azar entre el lote existente, y plantadas en macetas de 2 L con un substrato de turba y corteza de pino triturada (1:1 vol) (Figura 12a), y fertilizadas con Multicote (11-22-9+ (6)) a razón de 3 g por planta (Figura 12b).

Figura 12. (a) Turba y (b) fertilizante utilizados como substrato para las plantas.

3.4. Captura y mantenimiento del Curculiónido *Hylobius abietis.*

La captura de la mayoría de los coleópteros utilizados se llevó a cabo en el monte Castrove (Figura 13a), perteneciente al Municipio de Poio, Pontevedra. Escogimos dos zonas posibles para su colocación. Una, un pequeño regenerado de *P. pinaster* con gran cantidad de *Pteridium aquilinum* o helecho común (Latitud 42º 28' 20" N; Longitud 8º 42' 47" W) situado en una corta a hecho de una masa adulta de *P. pinaster* talada en 2010. La otra, una corta reciente de pinos de aproximadamente 30 años de edad en donde los restos de corta y los tocones aún estaban frescos (Latitud 42º 26' 52" N; Longitud 8º 44' 6" W).

En ambas dos zonas se han colocado aproximadamente 25 trampas distribuidas por cada zona de manera que estas no quedasen muy juntas y permitiesen aumentar así la superficie de captura. La separación media entre trampas ha sido de aproximadamente 50 m.

En el regenerado, lo primero que se hacía antes de colocar cada trampa, era observar si en las plántulas de pino que estaban más cerca había algún indicio de la presencia del coleóptero. Las trampas se situaron cerca de los tocones, pues es ahí en donde los adultos realizan la puesta y se refugian, y por tanto, la zona en donde es más fácil encontrarlos (zona con más éxitos en capturas) (Figura 13c).

Para el trampeo se ha empleado un tipo de trampa Nordlander, diseñada por el profesor Göran Nordlander (SLU, Uppsala, Suecia) que consistía en un recipiente de plástico provisto de tapa, con agujeros equidistantes a su alrededor en la parte superior (Figura 13b). Para evitar que los insectos se llegasen a escapar, se untaba el extremo superior del interior del recipiente con una capa de teflón líquido lo suficientemente ancha para que los insectos al intentar subir resbalasen y cayesen de nuevo en su interior.

En el interior de cada trampa se introducía un pequeño trozo de papel empapado con esencia de trementina y etanol, que servía como atrayente de los insectos *(Moreira et al. 2008)*, y otro empapado en agua, además de unos trozos de ramas de pino frescas para que los insectos capturados pudiesen beber y alimentarse mientras se encontraban dentro (Figura 13b).

Las trampas han sido semienterradas en el suelo, de manera que los agujeros quedasen a ras del terreno para que los insectos pudiesen entrar sin complicación alguna (Figura 13c). Cada trampa ha sido señalizada con una tira de plástico de color (Figura 13d).

Las trampas han sido revisadas semanalmente durante 6-7 semanas, colocando los insectos capturados en un recipiente cerrado, y llevándolos de inmediato para el laboratorio. Una vez allí, se metieron en una cámara de cultivo a 10ºC y se han alimentado con ramas jóvenes de especies del género *Pinus.* La población total de insectos con los que se contaba para llevar a cabo tanto los tratamientos de inducción como los bioensaios ha sido de aproximadamente 450 individuos.

Figura 13. a) Monte Castrove-Poio en donde se llevaron a cabo las capturas de *Hylobius abietis*, **b)** Detalle de la trampa diseñada por el profesor Göran Nordlander empleada en la captura de insectos, **c)** Detalle de la colocación de las trampas cerca de los tocones y a ras del terreno, **d)** Colocación de las trampas en el terreno y detalle de su señalización.

3.5. Diseño experimental.

El experimento se ha llevado a cabo en el mes de abril del 2012 en la finca de la Misión Biológica de Galicia en Salcedo, Pontevedra (42.405387º N, 8.645799º W). El experimento ha consistido en la creación de atmosferas aisladas en pequeños invernaderos de plástico en los que se han colocado pinos "emisores" sometidos o no a herbivoría del curculiónido *H. abietis*, y también pinos "receptores", plantados alrededor de los anteriores.

El día 9 de abril de 2012 se ha empezado con la construcción de los invernaderos utilizando malla electrosoldada de 5 x 2.5 cm y plástico agrícola trasparente de 0.5 mm de espesor. Los invernaderos se han construido con forma de cilindro, de base circular y diámetro y altura de 1 m (Figura 14). En total se han construido 24 mini-invernaderos que se han colocado en una parcela de la finca de la MBG-CSIC.

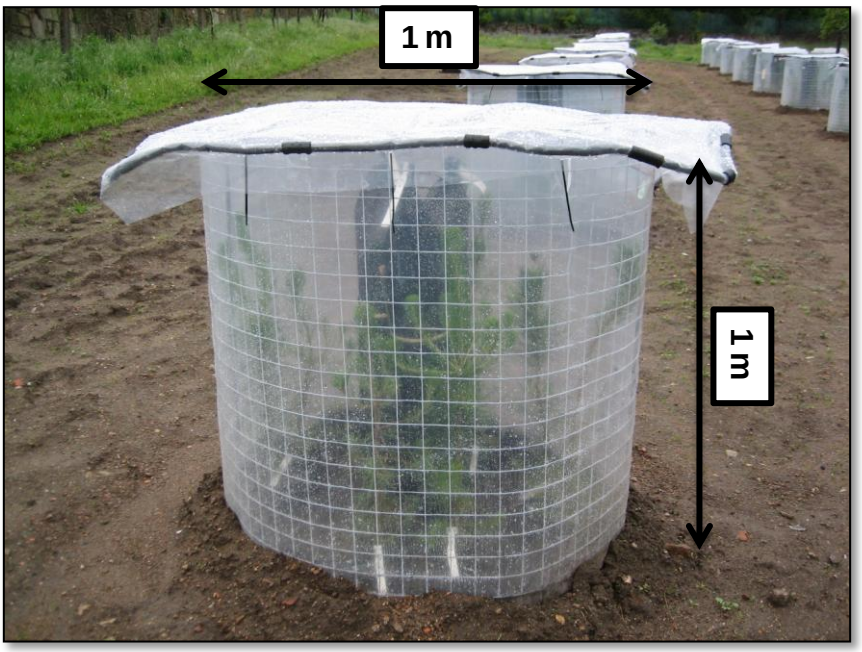


Figura 14. Detalle de la construcción de los invernaderos con malla electrosoldada de 5 x 2,5 cm y plástico transparente de 0.5 mm de espesor.

Antes de la implantación de dichos invernaderos en el campo, la finca ha sido arada para eliminar los restos de las hierbas presentes y facilitar la implantación de nuestras especies disminuyendo así la competencia que se pudiese llegar a dar. Los invernaderos se han colocado en dos filas con una separación entre ellos de 3 m (Figura 15).

Figura 15. Colocación de los invernaderos en la parcela de la MBG- Pontevedra.

En cada invernadero se han incluido 11 plantas de pino de dos savias, enterrando la propia maceta en la tierra, impidiendo así el contacto entre los sistemas radicales de las distintas plantas. Las 11 plantas incluyen 3 plantas "emisoras" situadas en el centro del invernadero y 8 plantas "receptoras" plantadas formando un círculo alrededor de las anteriores. Las 3 plantas emisoras de un invernadero siempre han sido de la misma especie (*P. pinaster* o *P. radiata*), mientras que las ocho plantas receptoras incluyen plantas de las dos especies intercaladas una a una (Figura 16).

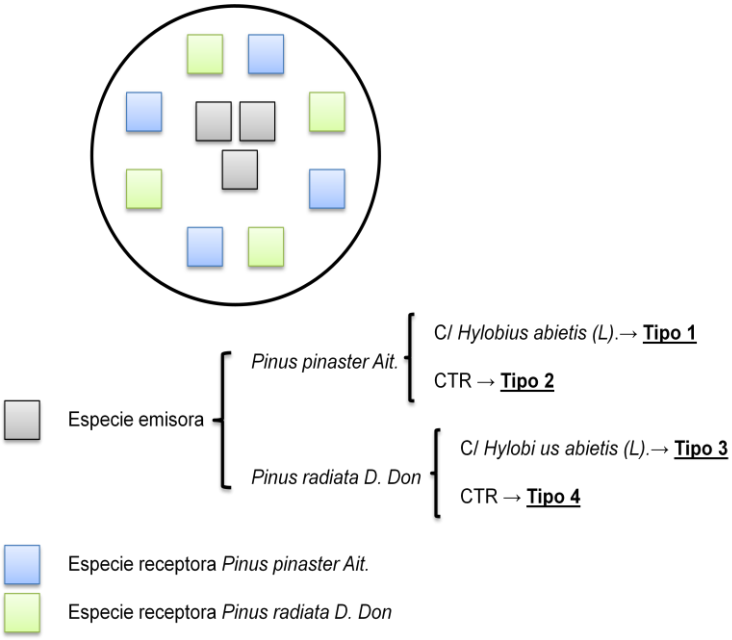


Figura 16. Detalle de la distribución de las plantas en los invernaderos.

En la mitad de los invernaderos (invernaderos tipo 1 y tipo 3) se han colocado cuatro *H.abietis* de peso y sexo conocido (dos machos y dos hembras) en cada planta emisora. Los invernaderos restantes actuaron como controles. Todas las plantas emisoras, independientemente de si han sido inoculadas o no, han sido cubiertas por una malla de plástico (protector forestal para plantones mod. PLANFOR® PA121; polietileno negro; alt. 120 cm, Ø 20 cm, malla 2 mm) tupida bien apretada a la maceta para impedir el escape de los insectos (Figura 17).

Figura 17. Detalle colocación de la malla a las plantas para evitar que los insectos se escapasen de la misma.

El diseño experimental ha consistido en un diseño de bloques al azar con 6 bloques. Cada bloque está formado por 4 invernaderos dos de ellos en donde las 3 plantas emisoras fueron de *P. pinaster* y otros dos con *P. radiata* como emisoras. De cada pareja de invernaderos de cada especie emisora, uno ha sido inoculado con *H. abietis* y el otro se ha mantenido libre del insecto actuando como control (Figura 18).

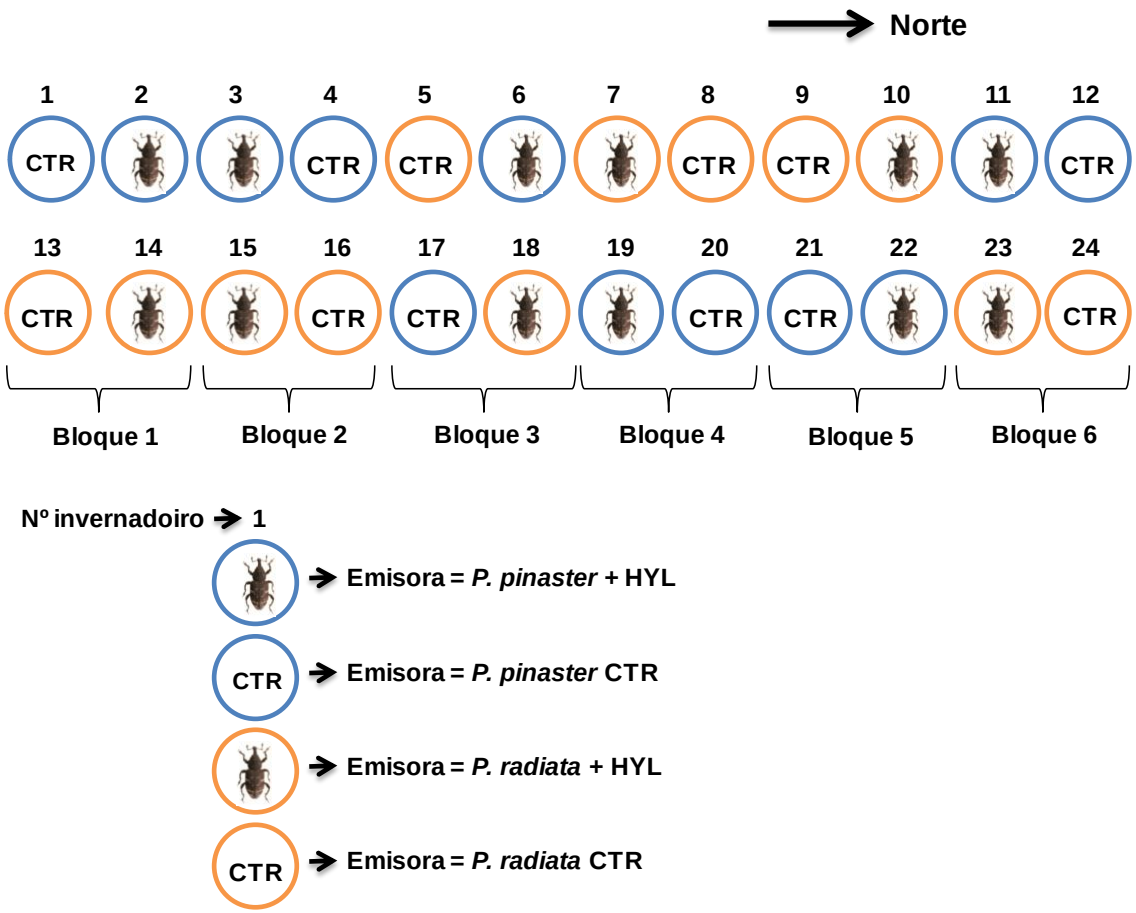


Figura 18. Esquema diseño experimental.

El día 26 de abril de 2012, se han colocado las plantas en los invernaderos, en donde fueron enterradas en el suelo con la maceta. Una vez plantadas se ha procedido a medirles las alturas iniciales tomando nota en un cuaderno de campo para poder así después evaluar su crecimiento con el transcurso del tiempo (Figura 19).

Figura 19. Medición de la altura inicial de las plantas.

La inoculación con los insectos se ha realizado el día 26 de abril de 2012, y los insectos se han mantenido en las plantas emisoras hasta el levantamiento del ensayo los días:

- 06 y 11 de junio de 2012 emisoras bloques 1 y 2.
- 11 de junio de 2012 emisoras bloques 3 y 4.
- 19 de junio de 2012 Emisoras bloques 5 y 6.

Durante estos 41-54 días los insectos se han alimentado de las plantas emisoras produciendo fuertes daños a lo largo de los tallos tal y como se muestra en la figura 20.

Figura 20. Detalle del daño producido por *H. abietis* en una plántula de *P. pinaster.*

3.6. Levantamiento del experimento.

El **6 de junio de 2012** se ha procedido al levantamiento de las plantas **emisoras**, por bloques, extrayéndose los *H. abietis* presentes, midiéndoseles varias variables de crecimiento y, posteriormente, cosechándolas para análisis químicos (Tabla 1).

El día **8 de junio de 2012** se ha comenzado el levantamiento de las plantas **receptoras**, transportando estas al laboratorio de dos en dos bloques. De las 8 plantas receptoras que componían cada invernadero, dos plantas (una de cada especie) han sido directamente utilizadas para la estimación de los niveles defensivos basales (defensas constitutivas) (Tabla 1) y las seis restantes han sido utilizadas para evaluar

la respuesta a la herbivoría de *H. abietis* mediante bioensayos de distinta duración según el esquema:

- **Tiempo 0**: 0 días de permanencia del *H. abietis* en las plantas. Estas plantas se han cosechado directamente para análisis químicos y determinación de los niveles defensivos constitutivos.
- **Tiempo 1**: 1 día de exposición a *H. Abietis,* cosechándose las plantas a continuación.
- **Tiempo 2**: 2 días de exposición a *H. abietis*.
- **Tiempo 3**: 5 días de exposición a *H. abietis*.

Tabla 1. Resumen de las fechas principales en las que se ha llevado a cabo el procesado de las plantas en el laboratorio.

	Emisoras	Receptoras T0	Receptoras T1	Receptoras T2	Receptoras T3
Bloques 1 y 2	6 y 11/06/2012	08/06/2012	08/06/2012	09/06/2012	12/06/2012
Bloques 3 y 4	11/06/2012	13/06/2012	14/06/2012	15/06/2012	18/06/2012
Bloques 5 y 6	19/06/2012	11/06/2012	21/06/2012	22/06/2012	25/06/2012

Antes de proceder con los bioensayos se ha tomado nota, en un estadillo, de la presencia de pulgones y hormigas aéreas y subterráneas presentes por planta, valorándose subjetivamente de 0 a 4 cada variable en función de la cantidad de individuos presentes.

3.7. Bioensayos con Curculiónido *H. abietis.*

Para la realización de los bioensayos sometiendo las plantas a herbivoría real y encontrar así respuestas a los objetivos planteados (objetivos 1b y 1c), ha sido necesaria la construcción de unos tubos para la exposición de las plantas receptoras al ataque de *H. abietis.* Para su construcción se ha utilizado PVC transparente de 750 µm y cinta adhesiva de doble faz de 2 cm de ancho (Figura 21). La cara interna superior de los cilindros resultantes se ha pintado con teflón líquido para evitar la huída de los insectos.

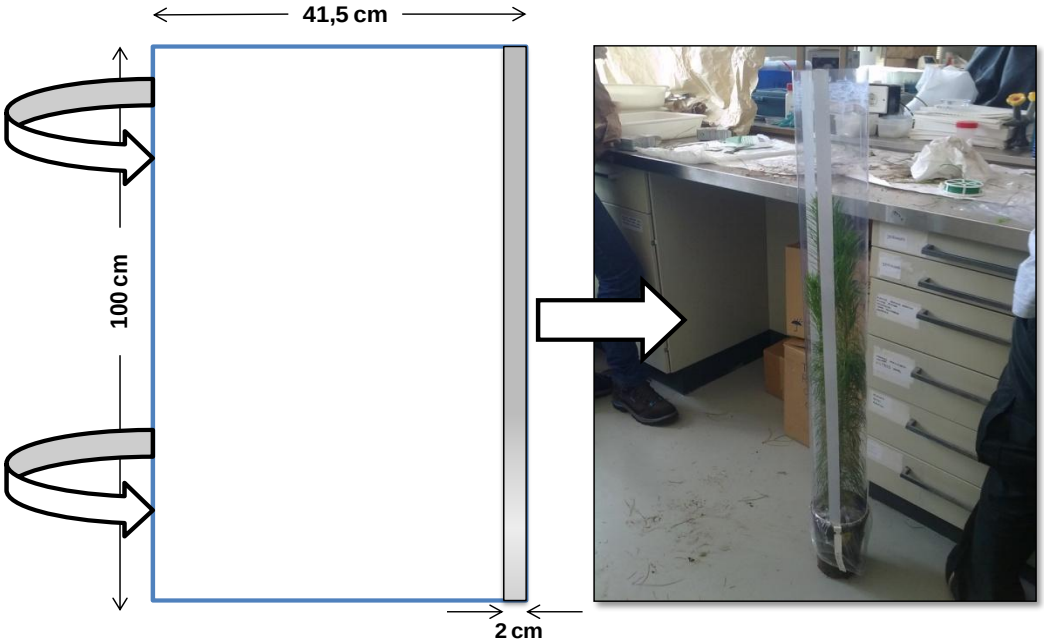


Figura 21. Detalle de la construcción de los tubos de plástico para la realización de los bioensayos con *H. abietis,* y su resultado final.

Los adultos de *H. abietis,* antes de ser colocados en las plantas, han sido sexados, pesados individualmente y numerados en placas Petri con papel de filtro humedecido, anotando los datos en un estadillo. Esto ha permitido evaluar si existe alguna influencia del tamaño del insecto en los daños causados en cada planta.

El bioensayo ha consistido en la colocación de una pareja (macho y hembra) adulta de *H. abietis* en cada planta receptora, dejando que estos se alimentasen de la misma durante un tiempo determinado para después evaluar las mordidas en cada caso y, posteriormente, poder determinar mediante el análisis de caracteres químicos de resistencia, la respuesta de las plantas a los daños causados por el insecto. Para ello, las 8 plantas receptoras de cada invernadero se han repartido en 4 tiempos de exposición al insecto (Figura 22). Dentro de cada invernadero las plantas para cada tiempo han sido escogidas al azar pero de forma que quedase un *P. pinaster* y un *P. radiata* para cada tiempo.

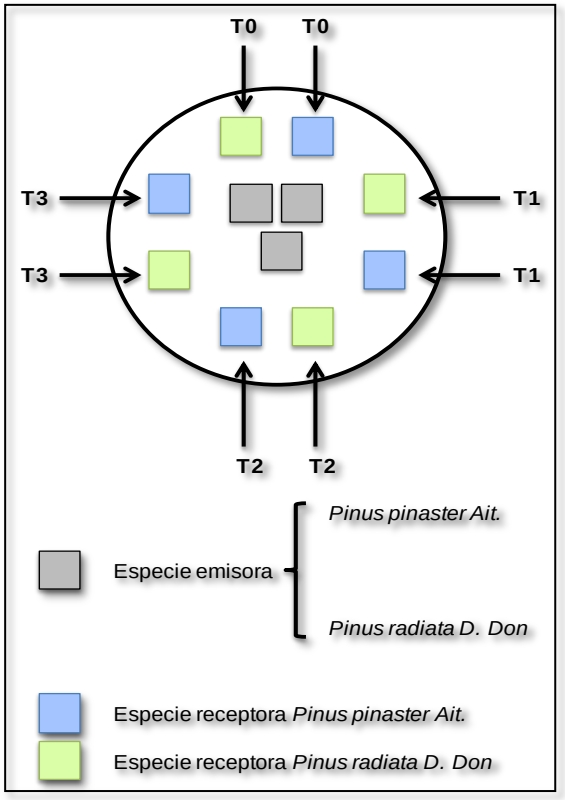


Figura 22. Detalle de la distribución de las plantas receptoras a los distintos tiempos de exposición al insecto en los bioensayos dentro de un mismo invernadero. Las plantas para cada tiempo dentro del invernadero han sido escogidas al azar pero, siempre, de froma que quedase un *P. pinaster* y un *P. radiata* para cada tiempo.

Antes de la colocación de los insectos y para evitar que estos huyesen a través de la tierra se ha colocado una bolsa de plástico envuelta en el cuello de la raíz que ha sido sujetada por la parte exterior del tubo con una goma elástica (Figura 23). Además, la parte superior de la maceta se ha llenado con una capa de arena de unos 2 cm de espesor. Para extremar la seguridad, también se ha colocado una malla en el extremo superior del tubo que se ha sujeto con otra goma (Figura 23).

Figura 23. Detalle del cierre de los extremos de los tubos para los bioensayos.

Una vez colocados los adultos de *H. abietis* en las plantas, se ha anotado en un cuaderno de campo tanto el día como la hora de su colocación para así poder llevar a cabo la extracción de los mismos en el momento adecuado, dependiendo del tiempo del que se tratase (T1, T2 o T5).

Las plantas de los distintos tiempos se han mantenido agrupadas mediante cinta adhesiva (Figura 23). Posteriormente, se han transportado a un lugar sombreado y tranquilo para facilitar la actividad de los insectos, en donde se han dejado el tiempo correspondiente en cada caso antes de ser procesadas.

Las plantas receptoras correspondientes al T0 (control, sin *H. abietis*) una vez transportadas al laboratorio han sido procesadas en el momento, mientras que las correspondientes a los tiempos 1,2 y 5 fueron siendo procesadas a medida que iban transcurriendo los días de exposición al insecto en las mismas (Tabla 1).

Una vez concluido el tiempo de permanencia de los *H. abietis* en las plantas, estos se han extraído de las mismas anotando en un estadillo el peso final. A las plantas se les ha vuelto a medir la altura total y diámetro en la base del tallo).

Una vez medidas estas variables, se ha procedido a evaluar los daños (Figura 24) que han realizado los insectos durante su tiempo de alimentación en cada planta.

Figura 24. Detalle de las mordidas de *H. abietis* en una plántula de *P. pinaster.*

Las mordidas se han evaluado con la ayuda de una plantilla milimetrada (Figura 25), anotándose tanto la superficie como el número total de las heridas. La evaluación se ha hecho por tramos con la ayuda de una cinta métrica, contabilizando y midiendo las mordidas cada 5 cm. Una vez evaluada la planta por un lado, procedíamos a girar esta un ángulo de 180º para seguir evaluando por el otro lado y conseguir así reducir el error de la evaluación. El análisis del patrón de alimentación

del insecto es del efecto de los tratamientos en la intensidad del daño está siendo objeto de otro PFC elaborado por Patricia Casas (Casas, 2013).

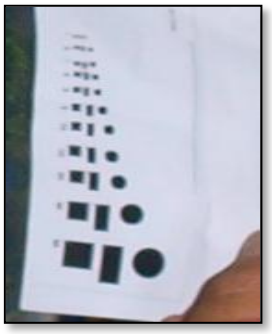


Figura 25. Plantilla milimetrada utilizada para la evaluación de las mordidas.

Una vez evaluadas las mordidas, las plantas se han procesado separando la parte aérea de la parte radical cortando la planta con una tijera de podar a la altura del cuello de la raíz. Después se han separado las acículas del tallo (Figura 26) y se ha extraído la tierra al sistema radical.

Figura 26. Procesado de las plantas. Detalle de la separación de las acículas del tallo.

Las muestras de tallo (T), raíces (R) y acículas (A) se han guardado por separado en bolsas previamente identificadas con el número (ID) de cada planta y la parte y tejido de la que se trataba (Figura 27). Las muestras se han congelado inmediatamente a una temperatura de -30ºC. Las plantas control o tiempo 0 se han ido procesando de manera similar.

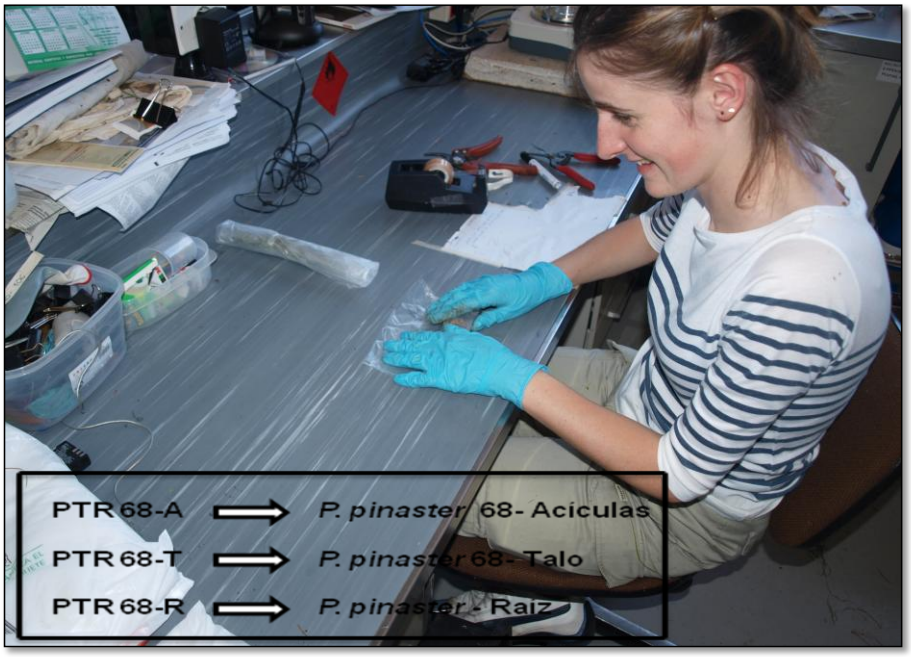


Figura 27. Etiquetado de las bolsas y separación de acículas, tallo y raíces.

Por su banda, las plantas emisoras también han sido llevadas al laboratorio procediéndose de manera similar. Tras retirar los *H. abietis* (plantas Tipo 1 y Tipo 3) y anotado tanto el peso final como el número de ellos presentes por planta (ha habido alguna perdida), se han medido las variables de crecimiento (diámetro y altura final) y las mordidas en todas las plantas antes de ser procesadas (Tabla 1). El muestreo se ha hecho del mismo modo que en las plantas receptoras.

Para la caracterización de las defensas químicas de las plantas se ha evaluado tanto el contenido de resina no volátil como el contenido de polifenoles totales, dos caracteres relacionados con la resistencia de las plantas de pino frente al ataque del curculiónido *H. abietis (Moreira 2010; Sampedro et al. 2011).* Estos caracteres se han analizado en tres tejidos diferentes: las acículas, y la parte superior e inferior del tallo (aproximadamente 5 cm por debajo del ápice y 5 cm por encima del cuello de la raíz).

3.8. Determinación del contenido de resina.

La cuantificación del contenido de resina por unidad de peso seco del tejido (mg de residuo resinoso g^{-1} peso seco de tejido) se ha realizado mediante el método gravimétrico descrito por *(Moreira et al. 2009)*. La extracción de la resina se ha llevado a cabo con un disolvente orgánico, el hexano. En el caso de las muestras de tallo, de

aproximadamente 3 cm de largo, se ha separado el floema del xilema con la ayuda de un bisturí, fraccionándose estos por separado en pequeños segmentos de más o menos 1 cm (Figura 28-1). Los segmentos resultantes han sido colocados en un tubo de ensayo previamente numerado y pesado en una balanza de precisión con cuatro decimales, y el material vegetal dentro del tubo ha sido cubierto en su totalidad con hexano (Figura 28-2).

Para la extracción de la resina en las acículas, se ha cogido una muestra de aproximadamente 2 g (mezclando acículas basales y apicales). La muestra se ha introducido en un tubo de ensayo previamente numerado y pesado, y cubriéndose después con hexano en su totalidad (Figura 28-2).

Cada uno de los tubos con las muestras se han agitado en un Vortex VWR (VV3) durante 10 segundos (Figura 28-3) y, seguidamente, se han metido en graditas metálicas de 50 tubos en un baño de ultrasonidos (BRANSON 2510) durante 20 minutos (Figura 28-4), para facilitar la penetración del disolvente en los canales resiníferos de los tejidos. Las muestras se han dejado reposar en la campana extractora durante 24 horas (Figura 28-5). Pasado ese tiempo, se ha filtrado el hexano con la ayuda de un embudo y papel de filtro de fibra de vidrio en un segundo tubo de ensayo, también previamente enumerado y pesado (Figura 28-6).

Después de la primera extracción se ha vuelto a añadir hexano al material vegetal, haciendo una segunda extracción (incluyendo agitación (Figura 28-7), baño de ultrasonidos (Figura 28-8) y, una segunda filtración en el mismo tubo pesado y enumerado (Figura 28-9). El material vegetal que contenían los tubos se ha introducido en un sobre de papel identificado con el ID de la planta y la parte a la que correspondía y secado hasta peso constante en una estufa de aire forzado a baja temperatura (45ºC; 5 días) (Figura 28-10). La razón del secado a baja temperatura es no alterar los compuestos fenólicos que van a ser analizados a continuación en el mismo material vegetal. La mezcla de hexano y resina se ha dejado en la campana extractora (Figura 28-10) hasta que se ha volatilizado todo el hexano, quedando el residuo resinoso en el tubo (aproximadamente 1 semana). Una vez evaporado el hexano, se han pesado todos los tubos con el residuo resinoso en una balanza de precisión (Figura 28-11) y por diferencia de peso entre los tubos de la primera y segunda filtración y los pesos de los mismos vacios, se han calculado los mg de residuo resinoso (suma de los mg de resina de la primera y segunda filtración).

Por último, con el peso de la muestra seca y el peso de la resina se ha establecido la relación del peso de resina por peso de tejido seco (mg g^{-1} peso seco).

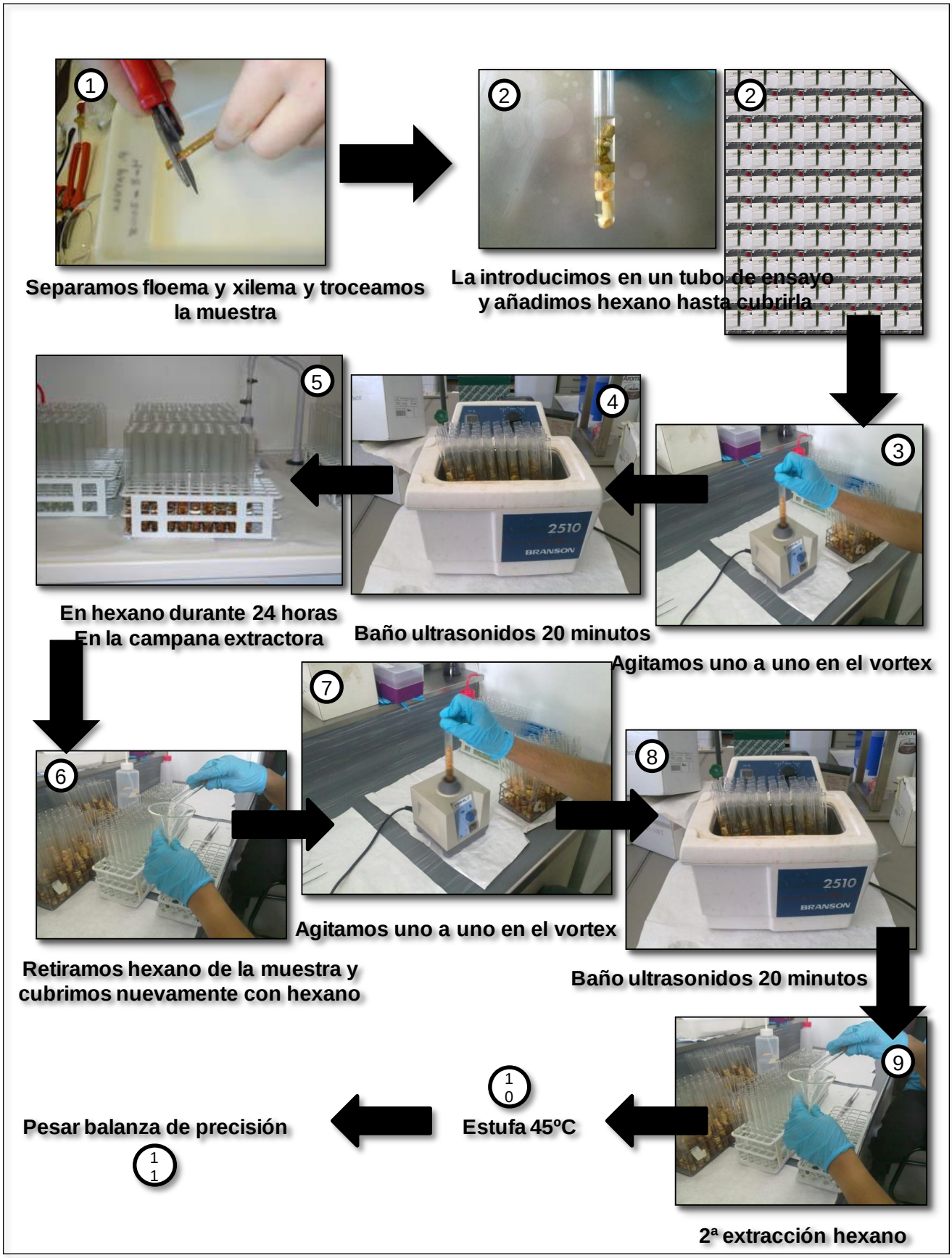


Figura 28. Procedimiento de la extracción de la resina en las muestras de tallo y acículas según el método gravimétrico descrito en *Moreira et al.* (2009).

3.9. Determinación de la concentración de los fenoles totales.

Para el análisis de los polifenoles totales en las muestras (mg de fenoles g^{-1} peso seco muestra) se ha hecho una extracción en metanol seguida de una cuantificación mediante el método del reactivo Folin-Cicocalteau según el método descrito en *Moreira et al. (2012)*. Los fenoles se han determinado en las muestras secas de acículas y de floema de la parte superior e inferior del tallo procedentes del secado realizado en el análisis del contenido de resina. Las muestras de floema y acículas procedentes de la extracción con hexano se han molido por separado con la ayuda de nitrógeno líquido (Figura 29-1), introduciéndose el polvo resultante en tubos bien identificados que se han dejado en la estufa a 45º durante 3-4 días hasta que se secasen por completo (Figura 29-2). Después, se han pesado aproximadamente 0,0300 g de cada muestra y se han introducido en microtubos de 1mL (Figura 29-3), que han sido colocados en soportes colectivos, añadiéndoles a continuación a cada uno 750 µl de la solución extractante de metanol:agua 1:1 (v:v), utilizando micro pipetas automáticas (Figura 29-4).

La solución resultante se ha sometido a un baño de ultrasonidos durante 15 minutos (Figura 29-5) sin calor y sin la tapa inferior del soporte. Después se han centrifugado los microtubos, en sus propios soportes colectivos, durante 20 minutos a 3500 rpm para favorecer el decantado de la fase sólida. Con la ayuda de pipetas *Pasteur* (Figura 29-6), se ha transferido el sobrenadante (extracto) de cada muestra a unos tubos *eppendorf* de 2mL debidamente identificados, dejando la fase decantada en el fondo del vial, que ha sido desechada (Figura 29-7). Los extractos en los viales han sido guardados en el congelador hasta su valoración colorimétrica.

La cuantificación de la concentración de fenoles totales se ha realizado mediante valoración colorimétrica en microplacas de 96 pocillos (Figura 29-8). Para ello se han preparado 7 patrones de concentraciones conocidas de ácido tánico partiendo de una disolución madre de 20 mg ml^{-1}, que se ha obtenido diluyendo 0,500 g de ácido tánico en 25 ml de agua destilada. Cinco de los seis patrones se han preparado diluyendo la disolución madre de 20 mg ml^{-1} hasta 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 y 3,9063 µg ml-1, es decir, de manera que el segundo patrón tuviese la mitad de concentración que el primero y así sucesivamente, por lo que cada uno de ellos se prepararía diluyendo 50 mL del patrón anterior en 100 ml de volumen de agua destilada. El sexto patrón ha sido agua destilada (0 mg g^{-1}).

Una vez descongelados los extractos metanólicos y llevados a temperatura ambiente, se ha procedido a diluir una alícuota de 40 ul de cada muestra en 420 ul de

agua destilada en microtubos de 1.2 ml. A continuación, alícuotas de los patrones de ácido tánico (por quintuplicado en cada placa) y de los extractos diluidos (por triplicado) han sido pipeteados en las microplacas. En cada pocillo se han depositado 100 µl de cada muestra o patrón. Cuatro pocillos por micro placa han sido utilizados como blanco sin reactivos. A continuación, se han añadido 20 µl del reactivo Folin-Ciocalteau a cada pocillo con muestra o patrón (Figura 29-8) (exceptuando por tanto los blancos). Tras 8 minutos, se ha añadido 20 µl de Carbonato sódico (Na2CO3) al 20% (exceptuando al blanco), de modo que todos los pocillos tuviesen un volumen total de 140 µl. Después de un período de entre 2-2,30 h de incubación, tiempo durante el cual la mezcla iba adquiriendo una tonalidad azul con una oscuridad proporcional a la concentración de fenoles totales presente en la muestra, se ha procedido a la lectura de la Absorbancia en un lector de microplacas (BIO RAD Model 680) con un filtro de 740 nm (Figura 29-9).

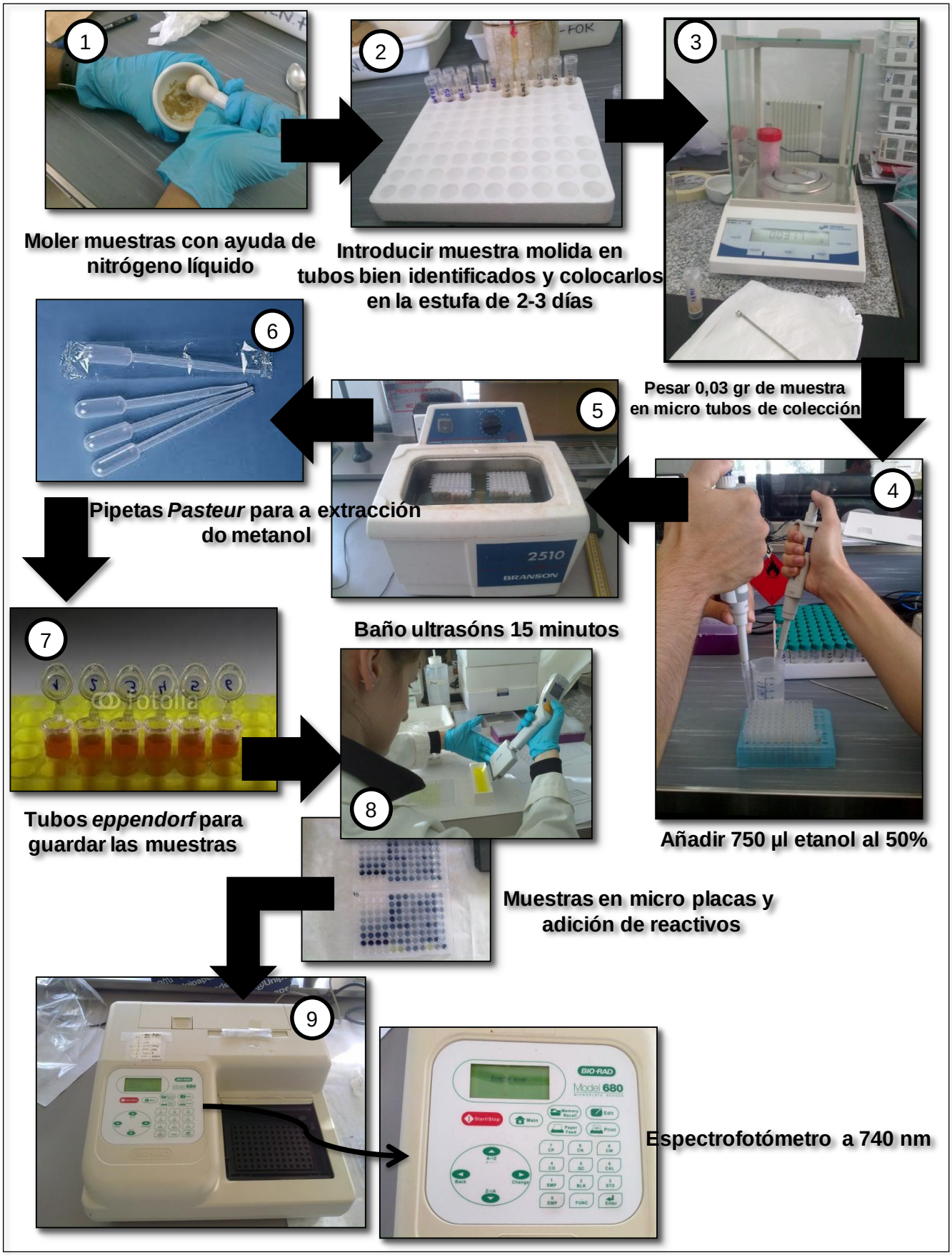


Figura 29. Procedimiento de determinación de fenoles totales en el floema y acículas.

Conocida la concentración de los 6 patrones y una vez determinada su absorbancia, se ha calculado la ecuación que relacionaba ambas variables mediante una regresión lineal.

La ecuación de la recta patrón ha sido del tipo y = a * x + b, en donde *y* es la absorbancia y *x* a la concentración de fenoles totales medidos como mg equivalentes de ácido tánico. *a* y *b* son parámetros deducidos para cada recta.

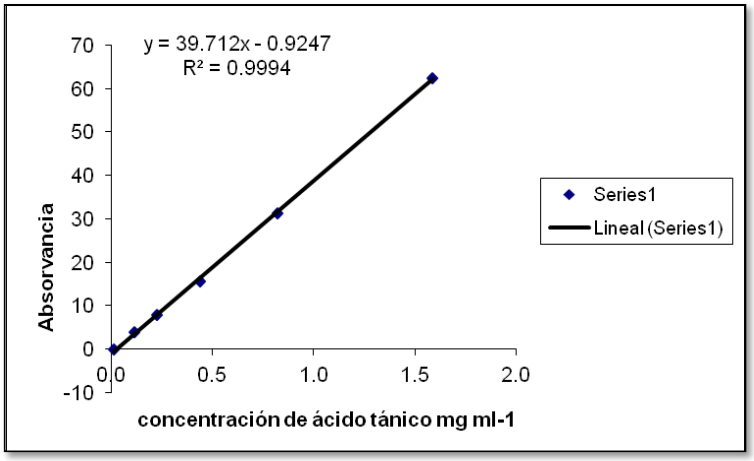


Figura 30. Ejemplo de recta patrón de una micro placa de fenoles totales. Muestra la relación entre la absorbancia registrada por el espectrofotómetro a 740 nm y la concentración de fenoles totales en equivalentes de ácido tánico.

De este modo, y a partir de las absorbancias de las muestras, se ha calculado la concentración de cada una de ellas aplicando la función de la recta patrón, expresando la concentración en mg equivalentes de ácido tánico en la solución y cada pocillo. Previamente, a las absorbancias tanto de los patrones como de las muestras se les ha restado la absorbancia del agua destilada en los blancos.

No obstante, las concentraciones obtenidas con este cálculo no corresponden a los extractos metanólicos originales, sino a los 140 µl de solución de cada pocillo, correspondiente a las muestras diluidas y los reactivos. Para determinar la concentración de las muestras originales se ha empleado la relación:

$$C * V = C' * V'$$

En donde *C* es la concentración en el pocillo (mg ml-1), *V* el volumen en el pocillo (260 µl), *C´* la concentración en la alícuota (mg ml-1), y *V´* el volumen de la alícuota (200 µl).

La concentración real de mg equivalentes de ácido tánico de cada muestra, expresada en mg ml^{-1}, se ha obtenido con esta misma fórmula tras corregir el paso de dilución. Finalmente, para el cálculo de los mg equivalentes de ácido tánico por gramo de muestra de material vegetal seco, se ha realizado la siguiente operación:

C´ * 10 mL MeOH / peso muestra seca g

3.10. Análisis estadísticos.

El análisis estadístico se ha llevado a cabo siguiendo el esquema de los cuatro objetivos específicos planteados.

Para analizar el efecto de la herbivoría en las plantas circundantes en los niveles de defensa constitutivos hemos utilizado un análisis de varianza con el tratamiento de herbivoría en las plantas emisoras (control vs *H. abietis*) como factor fijo y los bloques del diseño experimental (1-6) como factor aleatorio. En este análisis solamente se han considerado los invernaderos en donde la especie emisora es la misma que la especie receptora analizada. Así mismo, solo consideramos las plantas receptoras control, no expuestas a herbivoría en los bioensayos (plantas receptoras tiempo 0).

Para analizar el efecto de la herbivoría en las plantas circundantes en la intensidad de las respuestas de las plantas receptoras a un episodio de herbivoría, hemos utilizado un análisis de varianza con dos factores principales: los tratamientos en las plantas emisoras dentro de los invernaderos (control vs *Hylobius*) y los tratamientos de herbivoría en las plantas receptoras (control o plantas no expuestas (tiempo 0) y plantas expuestas a *H. abietis* durante cinco días (tiempo 5)). El análisis incluye estos dos factores y su interacción como factores fijos y los bloques del diseño experimental como factor aleatorio. La interacción entre los dos factores principales nos informa si la convivencia con plantas atacadas o no atacadas influye en la capacidad de respuesta a la exposición posterior al insecto. Al igual que antes, solamente se han considerado los invernaderos en donde la especie emisora es la misma que la especie receptora analizada.

Para estudiar la influencia de la herbivoría en las plantas circundantes en la dinámica de las respuestas a la exposición al insecto, hemos utilizado un análisis similar al anterior pero considerando todos los tiempos de exposición al insecto (tiempo 0, 1, 2 y 5 días).

Por último, para estudiar si las respuestas observadas dependen de la especie emisora, los análisis anteriores se han repetido analizando la respuesta en cada especie cuando la especie emisora era de otra especie (*P. pinaster* como receptora con *P. radiata* como emisora, y viceversa).

Todos los análisis se han realizado en SAS utilizando el procedimiento PROC MIXED *(Littell et al. 2006)*. En todos los casos se han estimado las medias de cuadrados mínimos (*least square means*) mediante el comando LSMEANS para la comparación de medias entre los distintos niveles de los factores de estudio.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efecto de la herbivoría en plantas vecinas sobre la concentración constitutiva de defensas en plantas receptoras de la misma especie.

En este apartado se presentan los resultados de las plantas control no expuestas a herbivoría (Tiempo = 0), comparando los niveles constitutivos de resina no volátil y polifenoles entre las plantas de los invernaderos control (sin herbivoría) y de los invernaderos con *Hylobius abietis* en las plantas emisoras. Solo se consideran los invernaderos en donde la especie emisora es la misma que la especie analizada. Es decir, para *Pinus pinaster* hemos utilizado las plantas de tiempo 0 de los invernaderos en donde la especie emisora es *P. pinaster*, y del mismo modo con *P. radiata.* Así, el análisis es de 6 plantas receptoras T0 procedentes de invernaderos control frente a las otras 6 plantas de invernaderos con *Hylobius* (es decir, N=6). Se presentan los resultados para cada especie por separado, considerando parte inferior y superior del tallo y acículas.

La herbivoría en plantas vecinas ha tenido un efecto significativo sobre la concentración de resina constitutiva en la parte superior del tallo de *P. radiata* (Tabla 3). Las plantas que han crecido alrededor de plantas atacadas por *H. abietis,* han mostrado un 66% más de resina constitutiva que las plantas que vivieron alrededor de plantas control (Figura 31). Sin embargo, en el resto de los casos estudiados, los niveles constitutivos de resina no volátil no han sido significativamente diferentes entre las plantas que crecieron junto a plantas emisoras control o sometidas a daños por *H. abietis* (Tabla 2, Figura 31).

En las dos especies de pino el contenido de resina no volátil se ha observado un patrón similar de distribución en los distintos tejidos, siendo claramente mayor la concentración de resina en el tallo que en las acículas, y ligeramente superior los niveles de resina en la parte superior del tallo respecto a la parte inferior (Figura 31).

Tabla 2. Resultados del análisis de varianza mostrando el efecto de la herbivoría en plantas circundantes sobre el contenido en resina no volátil y polifenoles totales en distintos tejidos de plántulas de *P. pinaster* y *P. radiata*. Se muestran los grados de libertad (GL), los F ratios y los niveles de probabilidad asociados (P > F). Solo se consideran en el análisis los invernaderos con la misma especie emisora. Los valores de probabilidad significativos ($p < 0.05$) se resaltan en negrita.

		Pinus pinaster		***Pinus radiata***	
Compuesto defensivo	**GL**	**F**	**P > F**	**F**	**P > F**
Resina no volátil					
Acículas	1,5	0.7	0.446	0.0	0.984
Tallo inferior	1,5	0.4	0.573	0.6	0.459
Tallo superior	1,5	0.5	0.518	10.7	**0.022**
Polifenoles totales					
Acículas	1,5	0.4	0.581	0.1	0.754
Tallo inferior	1,5	1.4	0.295	0.7	0.453
Tallo superior	1,5	0.3	0.612	0.8	0.427

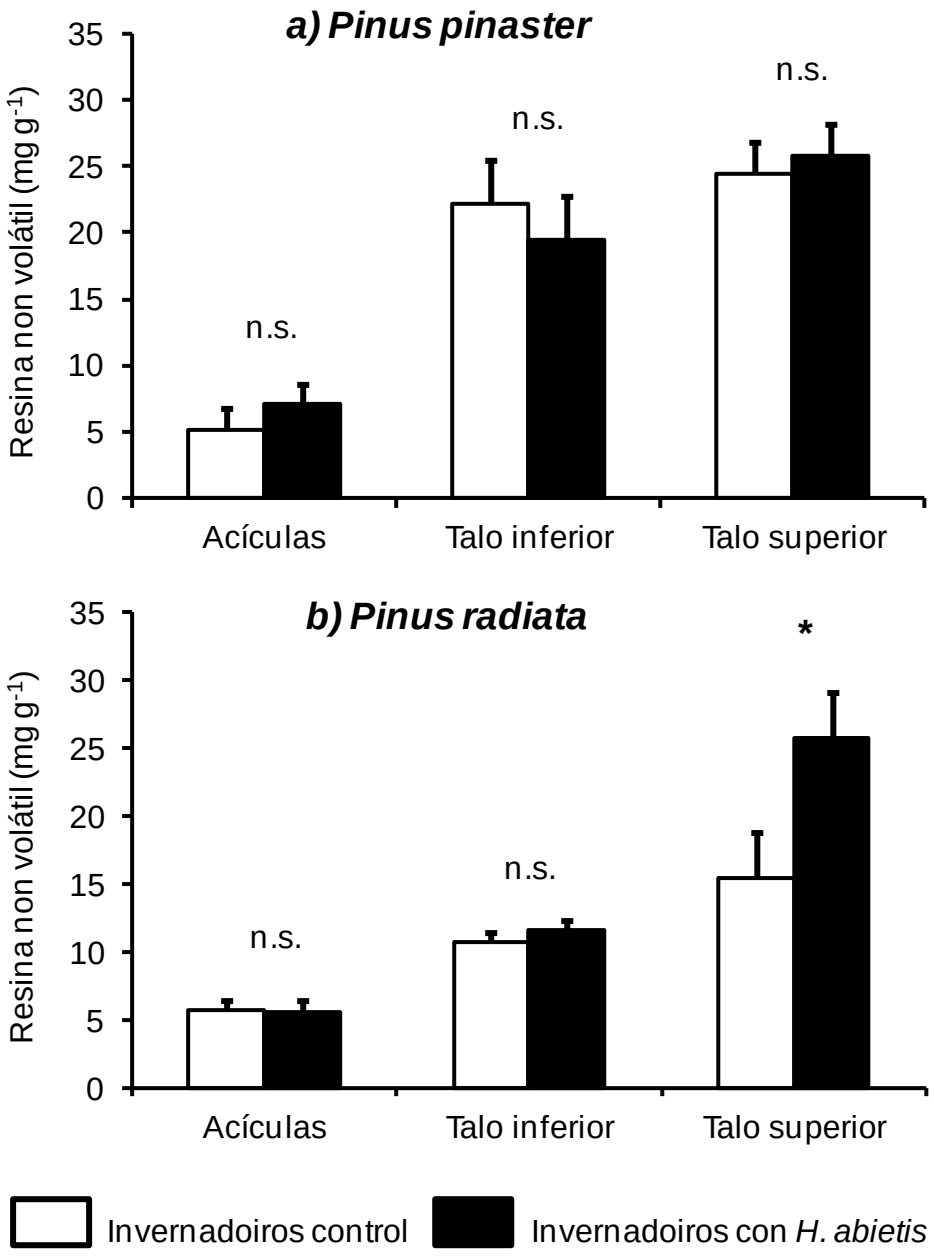


Figura 31. Concentración de resina no volátil en acículas, tallo inferior y tallo superior de plantas de *P. pinaster* (a) y *P. radiata* (b) que crecieron durante ~40 días en la vecindad de pinos de la misma especie sometidas (barras negras) o no (barras blancas) a herbivoría experimental con *H. abietis.* Se muestran las medias de mínimos cuadrados derivadas de los respectivos análisis estadísticos sus correspondientes errores estándar. n.s.: diferencias no significativas; * : $p<0.05$.

En cuanto al contenido de polifenoles en las distintas partes de las plantas, no se ha apreciado ningún efecto de la herbivoría en las plantas circundantes, siendo las diferencias entre las plantas de los invernaderos control y de los invernaderos con *H. abietis* no significativas en todos los casos (Tabla 2, Figura 32). En este caso, el patrón de distribución en los distintos tejidos ha sido diferente en las dos especies de pino. En el caso de *P. radiata* el patrón es el opuesto al de la distribución de la resina no volátil, con mayor concentración de polifenoles en las acículas y menor concentración en el tallo, especialmente en la parte superior (Figura 32b). Por el contrario, en el caso de *P. pinaster*, el contenido de polifenoles es mayor en la parte inferior del tallo y menor en las acículas y en la parte superior del tallo (Figura 32a).

4.2. Efecto de la herbivoría en plantas vecinas sobre la intensidad de la respuesta al consumo de *Hylobius abietis* en plantas receptoras de la misma especie.

Para responder al objetivo 1b hemos estudiado la respuesta a los daños por *H. abietis* en plantas procedentes de invernaderos control y de invernaderos con plantas emisoras expuestas a *H. abietis.* Para ello, hemos comparado la concentración de compuestos defensivos en las plantas receptoras expuestas al herbívoro (Tiempo = 5 días) frente a las plantas control (Tiempo = 0 días), interpretando la diferencia entre ambas dos medidas como la respuesta de las plantas a la herbivoría del insecto. Igual que en el sub-apartado anterior, solo hemos considerado los invernaderos con plantas emisoras de la misma especie con la especie estudiada. Los resultados del análisis estadístico del efecto de los factores de diseño sobre el contenido de resina no volátil y polifenoles totales se muestran en la Tabla 3. En este caso, se trata de un anova mixto tipo *'split-plot'* con el tratamiento de emisión (control/hylobius) y la exposición de las plantas a la herbivoría (control/hylobius) como factores fijos y los bloques y la interacción B*T como factores aleatorios.

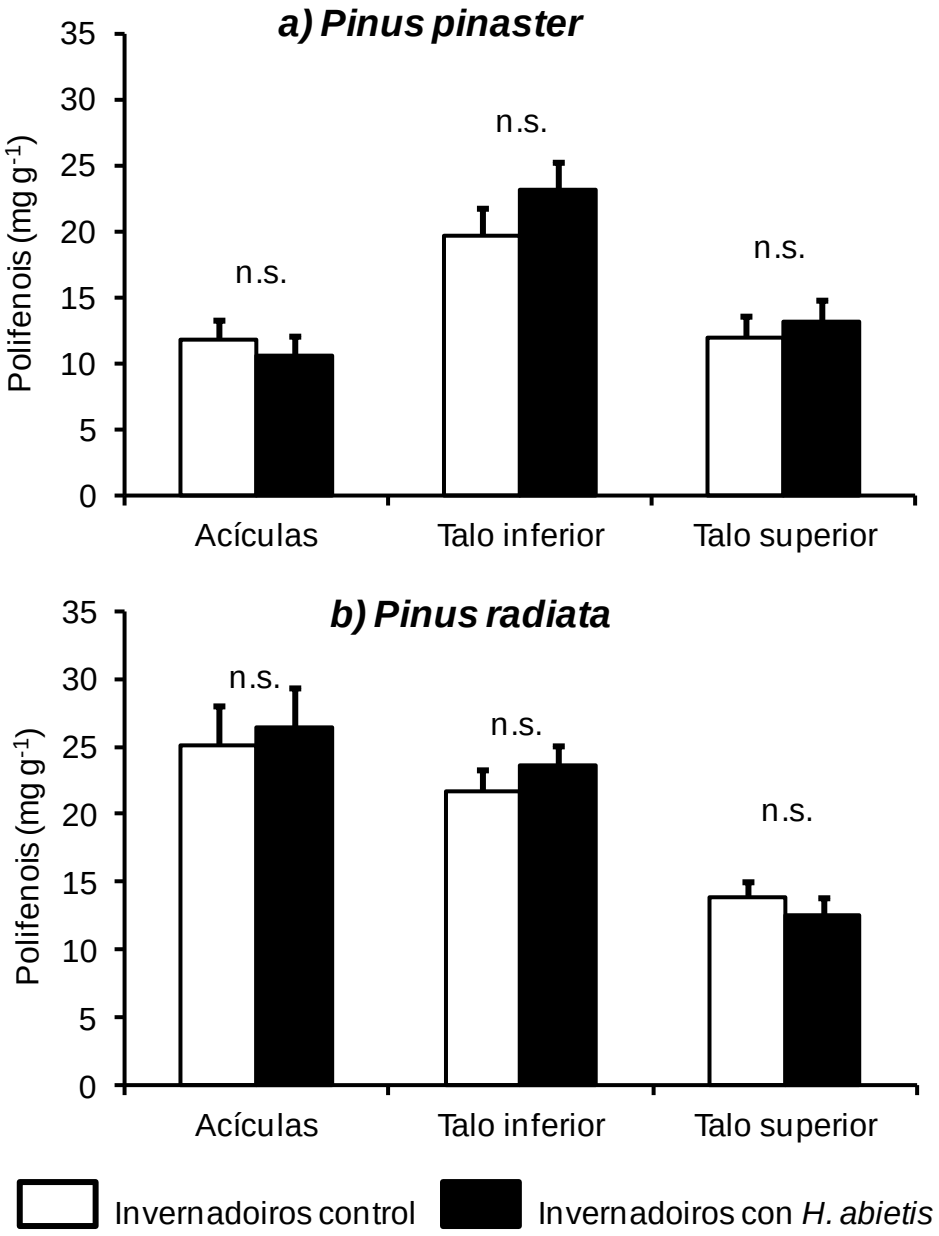


Figura 32. Concentración de polifenoles totales en acículas, tallo inferior y tallo superior de plantas de *P. pinaster* (a) y *P. radiata* (b) que crecieron durante ~40 días en la vecindad de pinos de la misma especie sometidas (barras negras) o no (barras blancas) a la herbivoría experimental con *H. abietis.* Se muestran las medias de mínimos cuadrados derivadas de los respectivos análisis estadísticos y sus correspondientes errores estándar. n.s.: diferencias no significativas.

Tabla 3. Análisis de varianza mostrando el efecto de la herbivoría en plantas vecinas sobre la respuesta química de plántulas de *P. pinaster* y *P. radiata* a 5 días de exposición al curculiónido *H. abietis,* cuantificada como resina no volátil y polifenoles totales en diferentes tejidos de la planta. Se muestran los grados de libertad (GL), los F ratios y los niveles de probabilidad asociados (P>F) del efecto de la herbivoría en plantas vecinas, de la respuesta a la exposición al insecto y la interacción entre ambos factores. Solo se consideran en el análisis los invernaderos con la misma especie emisora. Los valores de probabilidad significativos ($p < 0.05$) se resaltan en negrita.

	Pinus pinaster			***Pinus radiata***		
Compuesto defensivo	**GL**	**F**	**p > F**	**GL**	**F**	**p > F**
Resina total en acículas						
		0,4	0,555	1,5	0,4	0,555
Herbivoría en emisoras	1, 5					
Inducción *Hylobius*	1, 8	0,7	0,434	1,11	0,5	0,541
Emisión*Inducción	1, 8	0,5	0,482	1,11	1,1	0,323
Resina total en tallo inferior						
Herbivoría en emisoras	1, 5	0,3	0,613	1,5	0,9	0,378
Inducción *Hylobius*	1, 8	12,2	**0,008**	1,1	0,2	0,632
Emisión*Inducción	1, 8	0,3	0,616	1,1	0,2	0,694
Resina total en tallo superior						
Herbivoría en emisoras	1, 5	0,1	0,793	1,5	2,4	0,185
Inducción *Hylobius*	1, 8	0,2	0,675	1,11	0,1	0,814
Emisión*Inducción	1, 8	0,6	0,454	1,11	3,4	0,093
Polifenoles totales en acículas						
Herbivoría en emisoras	1, 5	0	0,980	1,5	0,2	0,688
Inducción *Hylobius*	1, 8	2	0,195	1,1	0,4	0,537
Emisión*Inducción	1, 8	0,6	0,479	1,1	0	0,954
Polifenoles totales en tallo inferior						
Herbivoría en emisoras	1, 5	5,7	0,062	1,5	3	0,145
Inducción *Hylobius*	1, 8	0,5	0,497	1,11	1,1	0,323
Emisión*Inducción	1, 8	0,6	0,466	1,11	8,4	**0,014**
Polifenoles totales en tallo superior						
Herbivoría en emisoras	1, 5	0,1	0,788	1,5	3,9	0,105
Inducción *Hylobius*	1, 8	0	0,990	1,11	0,6	0,464
Emisión*Inducción	1, 8	0,2	0,658	1,11	3,7	0,081

Solamente hemos encontrado respuestas significativas de la planta tras 5 días de herbivoría por *H. abietis* (efecto *Inducción Hylobius* en la tabla 3) en la resina no volátil del tallo inferior de *P. pinaster.* Podemos decir por tanto que la respuesta al consumo del insecto ha sido en general baja y menor de la esperada. En el resto de los casos, la respuesta al consumo del insecto no ha sido significativa o bien esta ha dependido del tratamiento de las plantas emisoras en los invernaderos de origen (interacción *Emisión*Inducción* significativa en la tabla 3). Además, en el caso de la resina no volátil en el tallo inferior, la respuesta de las plantas de *P. pinaster* a la exposición al insecto ha sido contraria a la esperada dando lugar a un menor contenido de resina en las plantas expuestas al insecto (Figura 33). En la resina y polifenoles en el talo superior de *P. radiata* hemos observado una interacción marginalmente significativa (p = 0,093 e 0,081 respectivamente) entre el tratamiento de emisión y la exposición al insecto. Pero también el sentido del efecto ha sido paradójico. Las plantas receptoras que han crecido en la vecindad de plantas emisoras control han mostrado un incremento de la resina no volátil tras ser sometidas a herbivoría mientras que, por el contrario, las plantas procedentes de invernaderos con plantas expuestas a herbivoría, el contenido de resina se ha reducido tras el consumo de *H. abietis* (Figura 33).

En cuanto al contenido de polifenoles totales, la respuesta al consumo del insecto en los bioensayos no ha sido significativa en ningún tejido y para ninguna especie (Tabla 3, efecto *Inducción Hylobius*). Sin embargo se han encontrado interacciones significativas entre los tratamientos de emisión y de inducción en el tallo inferior de *P. radiata* y marginalmente significativas en el tallo superior (p = 0,081) (efecto *Emisión*Inducción* en la tabla 3). De forma semejante a lo sucedido con la resina, las plantas receptoras que han convivido en los invernaderos con plantas emisoras control han mostrado un ligero incremento de los polifenoles tras el episodio de herbivoría, mientras que, por el contrario, las plantas procedentes de invernaderos con emisoras sometidas a herbivoría, el contenido de polifenoles ha descendido tras el período de alimentación del curculiónido (Figura 34).

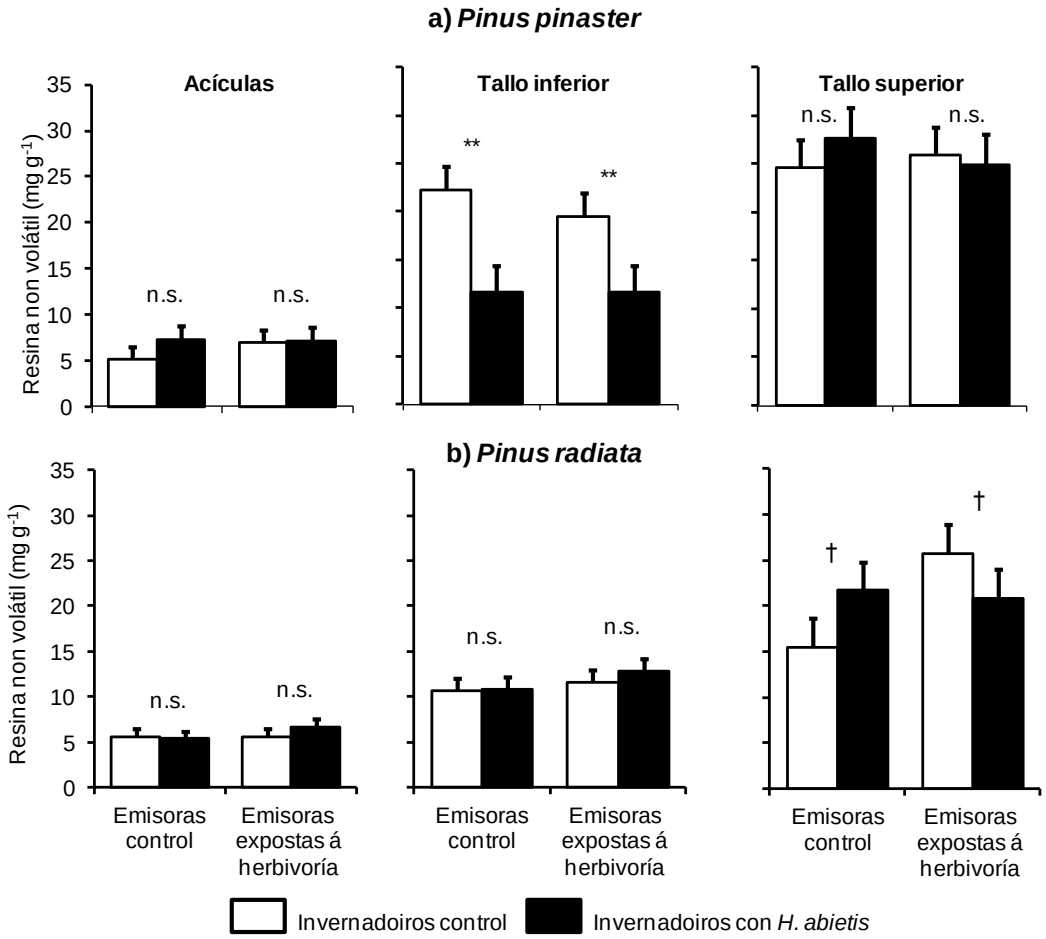


Figura 33. Concentración de resina no volátil en acículas, tallo inferior y tallo superior de plantas de *P. pinaster* (a) y *P. radiata* (b) que han crecido durante ~40 días en la vecindad de pinos de la misma especie sometidas o no a la herbivoría experimental con *H. abietis.* Se presenta la concentración de este carácter defensivo para plantas control (barras blancas) y para plantas expuestas durante 5 días al consumo de *H. abietis* (barras negras). Se muestran las medias de mínimos cuadrados derivados de los respectivos análisis estadísticos y sus correspondientes errores estándar. n.s.: diferencias no significativas; **: $p < 0.01$; † $p < 0.10$.

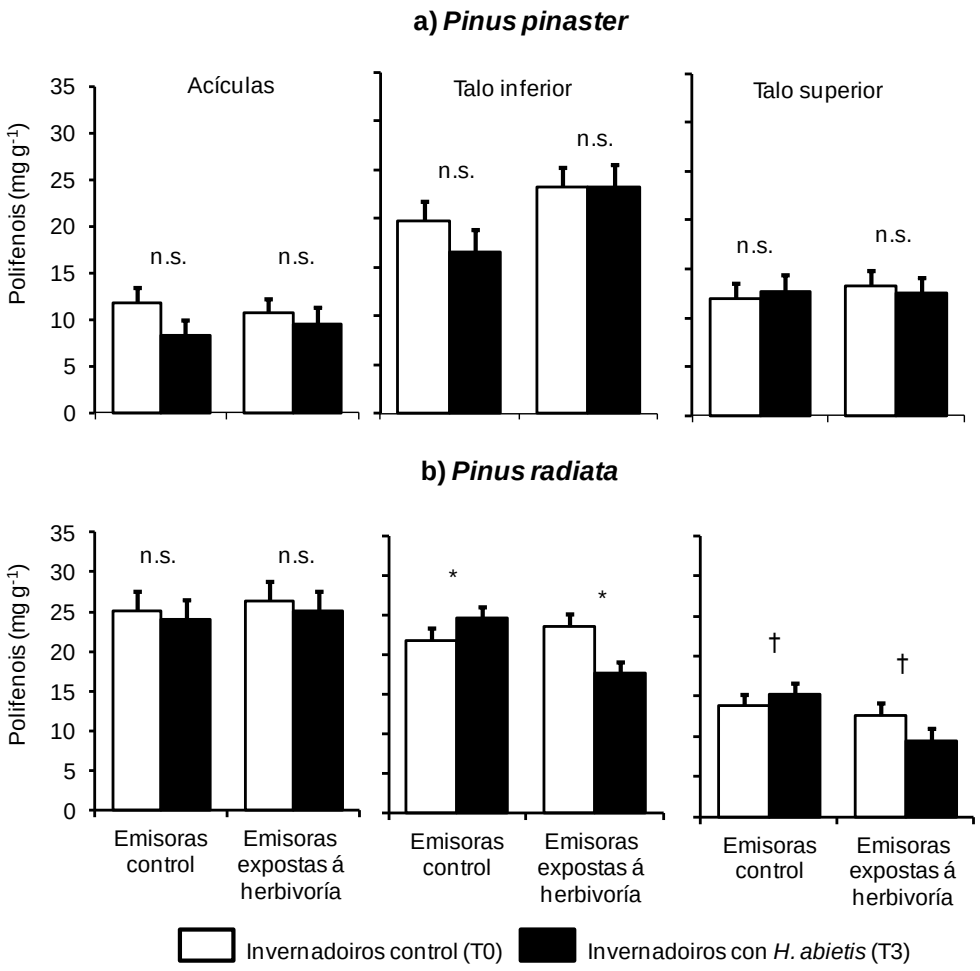


Figura 34. Concentración de polifenoles totales en acículas, tallo inferior y tallo superior de plantas de *P. pinaster* (a) y *P. radiata* (b) que han crecido durante ~40 días en la vecindad de pinos de la misma especie sometidas (barras negras) o no (barras blancas) a herbivoría experimental con *H. abietis.* Se muestran las medias de mínimos cuadrados derivados de los respectivos análisis estadísticos y sus correspondientes errores estándar: n.s.: diferencias no significativas; *: $p<0.05$; † $p<0.10$.

4.3. Efecto de la herbivoría en plantas vecinas sobre la dinámica de la respuesta al consumo de *Hylobius abietis* en plantas receptoras de la misma especie.

Para responder al objetivo 1c hemos estudiado la velocidad de respuesta en la química defensiva de las plantas receptoras durante el período de exposición a herbivoría en el bioensayo con *H. abietis*. Hemos analizado la evolución de la concentración de resina no volátil (Figura 35) y de los polifenoles totales (Figura 36) tras 0, 1, 2 y 5 días de exposición al insecto entre las plantas de invernaderos control y de invernaderos con *H. abietis.*

El contenido de resina no volátil en el tallo inferior de P. pinaster durante el período del bioensaio con *H. abietis* ha mostrado un patrón de diminución significativa de la concentración con el tiempo, con respuestas muy similares en plantas de los dos tipos de invernadero (Figura 35). En el resto de los casos la evolución del contenido de resina no ha seguido un patrón temporal de cambio estadísticamente significativo, y, en ningún caso se apreciaron diferencias en el patrón de evolución entre las plantas procedentes de invernaderos control frente aquellas procedentes de invernaderos con plantas emisoras expuestas al insecto.

Las respuestas a la herbivoría en el contenido de polifenoles totales no han seguido un patrón común entre especies y tejidos y no se han apreciado de forma general diferencias evidentes entre el comportamiento de las plantas procedentes de invernaderos control y de invernaderos con *H. abietis* (Figura 36). Como excepción al caso de los polifenoles en el tallo en *P. radiata* en donde, al cabo del tiempo, se aprecia que en el 5º día de exposición al insecto, el contenido de polifenoles totales es menor en las plantas procedentes de invernaderos con plantas emisoras expuestas al insecto. Por el contrario, en el caso de P. pinaster, el patrón observado es el contrario, observándose una reducción más pronunciada de los polifenoles en el tallo inferior en plantas procedentes de invernaderos control.

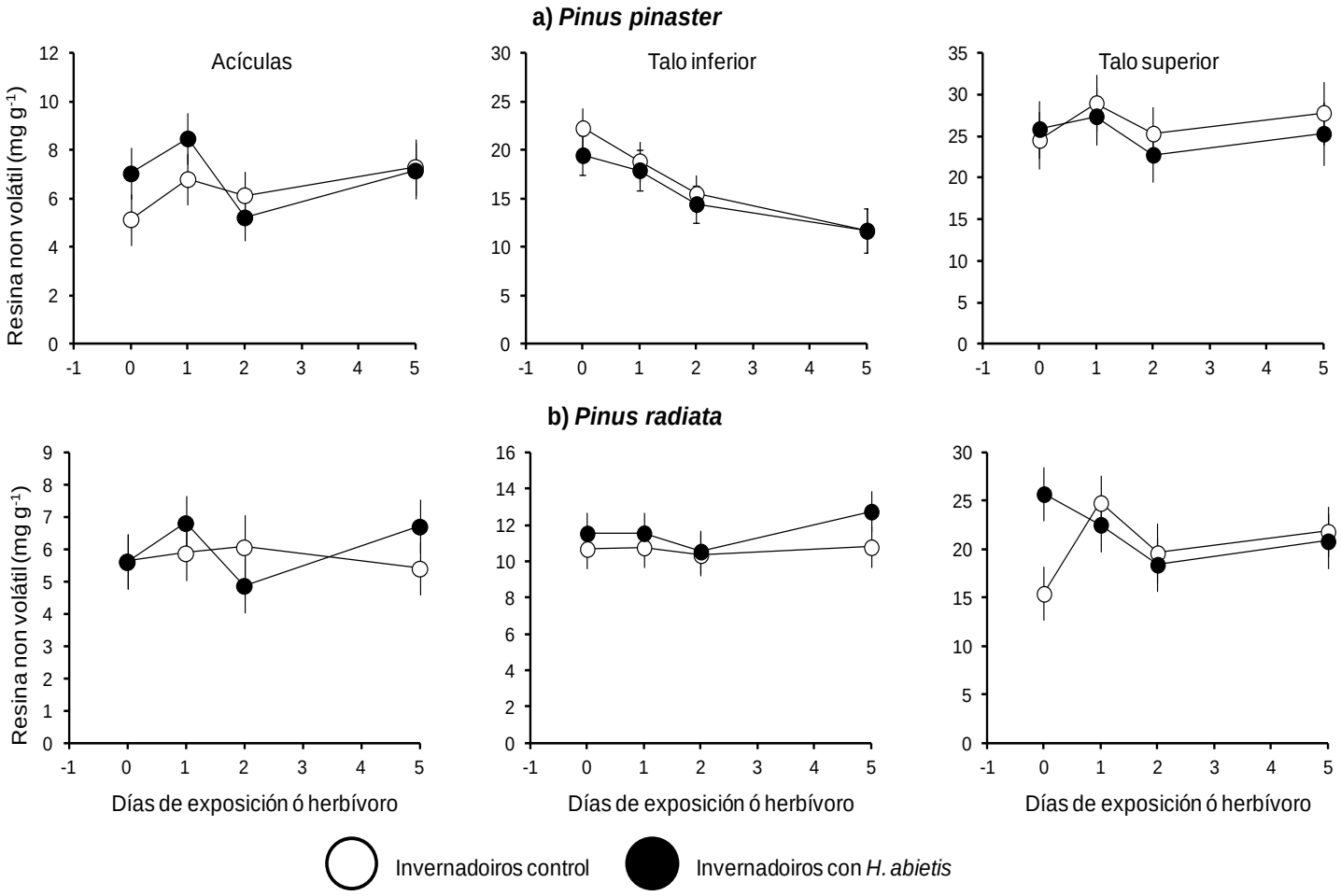


Figura 35. Dinámica de respuesta al consumo de *H. abietis* cuantificada mediante los cambios en la concentración de resina no volátil en acículas, tallo inferior y tallo superior de plantas de *P. pinaster* (a) y *P. rad*iata (b) que han crecido durante ~40 días en la vecindad de pinos de la misma especie sometidos (puntos negros) o no (puntos blancos) a herbivoría experimental con *H. abietis.* Se presenta la concentración de este carácter defensivo para las plantas control y las plantas expuestas durante 1,2 y 5 días al consumo de *Hylobius abietis.* Se muestran las medias de mínimos cuadrados derivadas de los respectivos análisis estadísticos y sus correspondientes errores estándar. n.s.: diferencias no significativas, *: $p<0.05$.

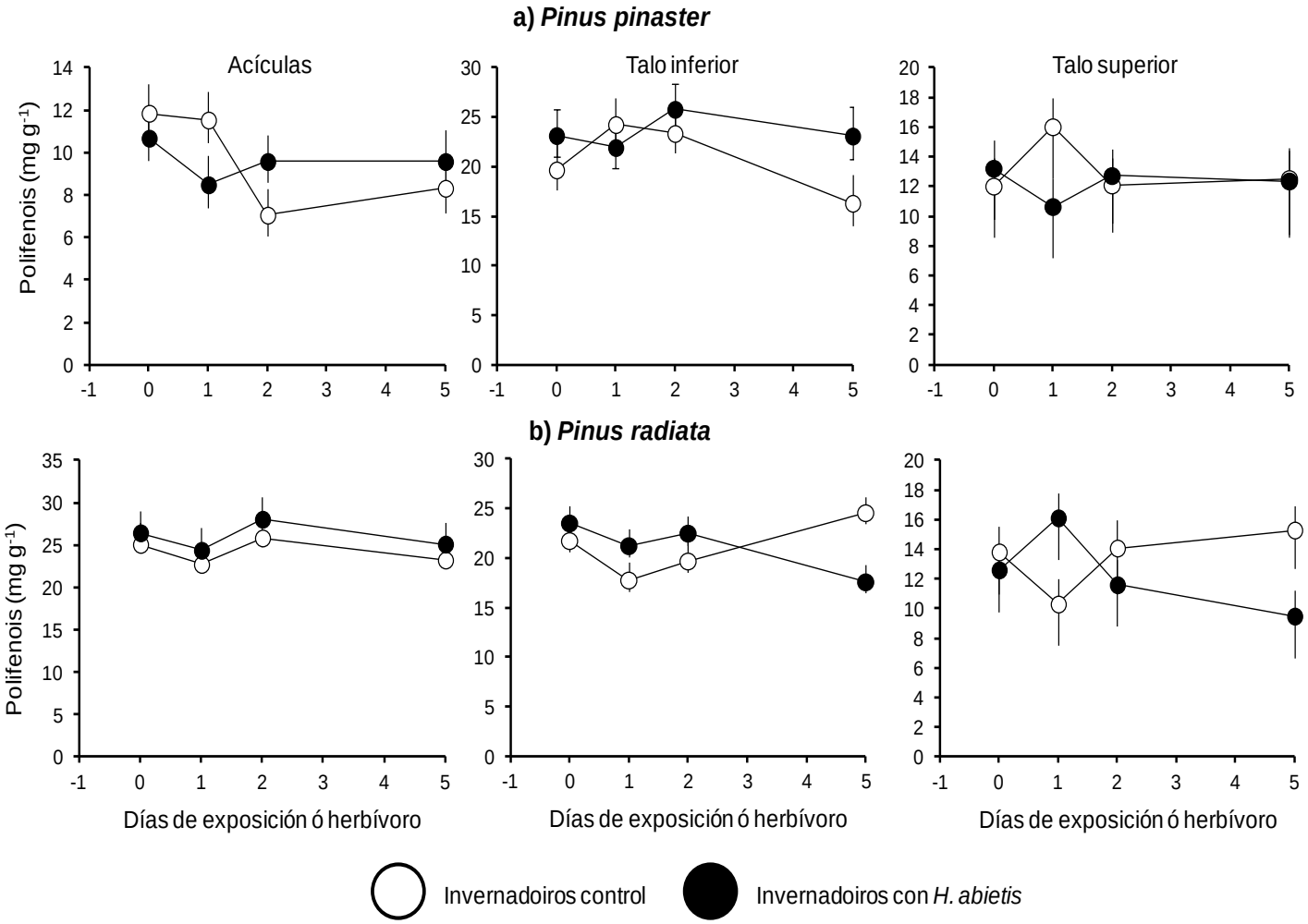


Figura 36. Dinámica de respuesta al consumo de *Hylobius abietis* cuantificada mediante los cambios en la concentración de polifenoles totales en acículas, tallo inferior y tallo superior de plantas de *P. pinaster* (a) y *P. rad*iata (b) que han crecido durante ~40 días en la vecindad de pinos de la misma especie sometidos (puntos negros) o no (puntos blancos) a herbivoría experimental con *H. abietis.* Se presenta la concentración de este carácter defensivo para las plantas control y las plantas expuestas durante 1,2 y 5 días al consumo de *H. abietis.* Se muestran las medias de mínimos cuadrados derivadas de los respectivos análisis estadísticos y sus correspondientes errores estándar. n.s.: diferencias no significativas, *: p<0.05.

4.4. Influencia de la especie emisora sobre la química defensiva y la respuesta a la herbivoría en plantas de la vecindad.

4.5.

El objetivo 2 de este proyecto pretendía determinar si la especie emisora puede influir en la química defensiva de la otra especie y como es esa respuesta. Buscábamos determinar si, siendo *P. pinaster* la especie emisora, la herbivoría en la vecindad afecta sobre los contenidos de resina no volátil y polifenoles en la especie receptora *P. radiata* y, viceversa, si tratándose de *P. radiata* como emisora se puede

observar algún efecto en la química defensiva de *P. pinaster.* En general, los resultados que se han obtenido no indican respuestas significativas ni en las defensas constitutivas ni en la capacidad de respuesta de las plantas a los daños provocados por *H. abietis* en los bioensayos (resultados no mostrados).

4.6. Respuesta química defensiva de las plantas emisoras a la exposición a los tratamientos de herbivoría con *Hylobius abietis*.

Con el objetivo de comprobar si las plantas emisoras han reaccionado a los tratamientos de herbivoría en los invernaderos y valorar la modificación de sus defensas, se ha cuantificado y comparado el contenido de resina no volátil de las plantas emisoras sometidas a la herbivoría frente a las plantas de los invernaderos control (Figura 37).

En el caso de *P. pinaster* se ha observado un mayor contenido de resina no volátil en aciculas, tallo inferior y tallo superior en las plantas expuestas al insecto, aun que las diferencias solo han sido marginalmente significativas (p = 0,075 en el caso de las acículas y p = 0,088 en el caso del tallo superior) (Figura 37a). En cuanto a las plantas de *Pinus radiata* no se han apreciado diferencias significativas en el contenido de resina no volátil entre las plantas control y las sometidas a herbivoría en ninguno de los tres tejidos analizados (Figura 37b).

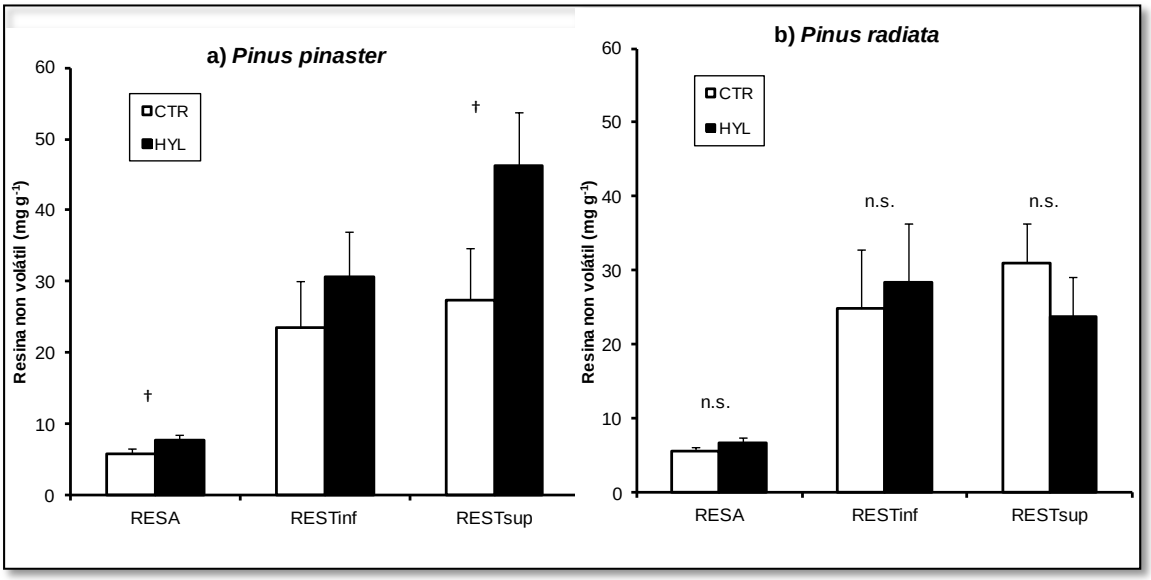


Figura 37. Concentración de resina no volátil en acículas, tallo inferior y tallo superior en plantas de *Pinus pinaster* (a) y *P. radiata* (b) expuestas (barras negras) o no (barras blancas) durante 40 días al consumo de *Hylobius abietis*. Se muestran las medias de mínimos cuadrados derivadas de sus respectivos análisis estadísticos y sus correspondientes errores estándar. n.s.: † p<0.10.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

De forma general, hemos encontrado que la respuesta a la herbivoría de *H. abietis* ha sido mucho menor de la esperada según resultados anteriores del mismo grupo de trabajo y de otros autores *(Franceschi et al. 2002; Zeneli et al. 2006).* Son diversos los trabajos que han demostrado que las defensas inducidas en los pinos al ataque de insectos herbívoros masticadores llevan a cambios cuantitativos en el contenido de defensas químicas (terpenoides y fenoles, principalmente), así como a un aumento del flujo de resina y otras respuestas anatómicas. Este incremento en la concentración de defensas químicas está normalmente (aunque no siempre) asociado con un aumento de la resistencia a la herbivoría *(Bauce et al. 1994; Wainhouse et al. 2009)*.

En contra de lo esperado, la respuesta a la herbivoría de *H. abietis* observada en el presente trabajo ha sido poco clara, y en el único caso en donde se ha observado una respuesta bien definida, esta ha sido en dirección opuesta a lo comúnmente observado. Así, las plantas de *P. pinaster* expuestas al insecto, más que aumentar el contenido de resina y polifenoles, han presentado una clara reducción de la resina no volátil en el tallo inferior sin observarse aumentos en otros tejidos. Es lo que se conoce como susceptibilidad inducida, o diminución en la resistencia tras el ataque. Esto contrasta con lo observado en estudios previos en los que se ha observado de forma consistente un claro aumento del contenido de resina no volátil en el tallo tras la herbivoría de este insecto (Moreira et al. 2012; Sampedro et al. 2011; Zas et al. 2011), incremento también observado en otras especies de pino como *P. sylvestris (Heijari et al. 2011)* o *P. radiata (Zas et al. 2011; Moreira et al. 2013)*. Estas respuestas se extienden también a los polifenoles del tallo, que en contra de lo observado en el presente trabajo, normalmente aumentan significativamente tras el ataque de *H. abietis (Moreira et al. 2013)*.

El patrón de distribución de las dos defensas químicas analizadas a lo largo de los distintos tejidos de las plantas concuerda con lo observado previamente en *P. radiata,* especie en la que el contenido de resina no volátil aumenta de abajo a arriba en el tallo, mientras que los polifenoles siguen el patrón opuesto *(Moreira et al. 2012)*. Concordando también con trabajos previos *(Carrillo-Gavilán et al. 2012)* las acículas presentan muy poca cantidad de resina no volátil pero niveles muy altos de polifenoles totales (en comparación con otros tejidos). La falta de concordancia de las respuestas observadas a la herbivoría en relación a trabajos anteriores no parece, por lo tanto, derivado de un problema metodológico.

Que las plantas de nuestro experimento no hubiesen reaccionado de forma similar a lo observado en otros estudios pudo ser debido a múltiples causas. Por un lado, las condiciones de cultivo en donde se ha llevado a cabo el experimento han podido resultar estresantes para estas, al pasar las plantas de estar viviendo en el vivero en el exterior a, de repente, encontrarse dentro de un invernadero con temperaturas mucho más elevadas y condiciones ambientales alteradas. El estrés generado bien ha podido condicionar la capacidad de respuesta de las plantas. Por otra banda, en el presente experimento no se ha llegado a tener en cuenta la variación genética en el diseño experimental lo que es posible que tenga generado mucha variabilidad y dificultado la observación de diferencias significativas entre tratamientos *(Sampedro et al. 2010)*. Es conocido que, en pinos, las respuestas inducidas a la herbivoría muestran una fuerte variación genética intraespecífica *(Moreira et al. 2013)*. Pero quizás, de entre todas, la explicación más plausible de porqué las plantas no han reaccionado a la herbivoría como era esperable es que los bioensayos han sido situados en un lugar sombrío y con una baja entrada de luz solar. Esto se ha hecho buscando la tranquilidad de los insectos, y minimizar el estrés y las interferencias del exterior y favorecer su alimentación. Si los recursos necesarios para producir más defensas químicas en respuesta al daño de un insecto herbívoro proceden de la fotosíntesis actual, la capacidad de respuesta de nuestras plantas podría estar impedida por esta falta de luz, y por tanto de carbono y energía disponible. Esta idea se está a verificar ahora con un nuevo experimento en la Misión Biológica de Galicia (*Goldar et al*., en preparación). Pronto podremos saber hasta qué punto la falta de luz en los bioensayos puede explicar nuestros resultados anómalos.

La falta de respuestas claras en los bioensayos dificulta el análisis de respuestas a la herbivoría en la vecindad. En general los resultados obtenidos no han sido muy claros, aunque podemos decir que se observan indicios de que los pinos si han percibido de alguna forma la herbivoría en las plantas vecinas y las interacciones bióticas que tuvieron lugar en su entorno. Así lo demuestra las modificaciones observadas en la concentración de resina no volátil constitutiva en tallos de *P. radiata*, o la variación en la intensidad de respuesta a la herbivoría de *H. abietis* en polifenoles del tallo superior e inferior y de resina no volátil en el tallo superior de las plantas de *P. radiata* en función de si estas han convivido en los invernaderos con plantas control o con plantas sometidas a daños por este insecto. De todas formas, los resultados no son muy concluyentes y no han sido consistentes entre las dos especies estudiadas. En general, la respuesta a la herbivoría en las plantas vecinas ha sido más evidente en *P. radiata* que en *P. pinaster* a pesar de que se sabe que esta especie exótica

responde normalmente menos al ataque de este insecto, con el que no comparte un pasado evolutivo común *(Zas et al. 2011)*.

Uno de los factores que puede estar influyendo en la reducida respuesta observada podría estar relacionado con la escasa respuesta de las plantas emisoras a los tratamientos de herbivoría. En las plantas emisoras, la respuesta no ha sido tan patente como esperábamos, encontrando, curiosamente, respuestas claras solamente en la especie *P. pinaster* pero no en *P. radiata.* Sin embargo, incluso en *P. pinaster* la respuesta ha sido mucho menor de la esperada, a pesar del grandísimo nivel de daños conseguido durante los 40 días de exposición al insecto. Precisamente una posible explicación a la reducida respuesta de las plantas emisoras a los tratamientos de herbivoría es, precisamente, los grandes daños sufridos por las plantas. Con cuatro insectos recluidos en la malla protectora durante 40 días es bien posible que los daños resultasen demasiado intensos y continuados como para haber permitido una respuesta fisiológica natural de la planta. En este sentido, las plantas emisoras han resultado intensamente descortezadas llegándose a observar una cierta mortalidad de las mismas (*Casas*, 2013). Actualmente, no existe ningún trabajo en donde se hubiesen estudiado las respuestas tras 40 días sostenidos de herbivoría para comparar nuestros resultados, circunstancia por otra parte que es bastante infrecuente en la naturaleza. Así, es posible que los insectos hubiesen atacado masivamente, que las plantas emisoras hubiesen muerto pronto, y/o que el ataque simultáneo de 4 individuos sin posibilidad de escape hubiese sobrevenido en un colapso del sistema defensivo de las plantas. Todas estas posibilidades son especulaciones que deberían ser resueltas en futuras experiencias. En cualquier caso, los daños sufridos han sido mucho más grandes de los observados en el campo habitualmente. Un problema que debe ser resuelto es que los daños no se apreciaban con facilidad desde el exterior de la malla de protección de plantación. El dispositivo experimental debe ser mejorado para poder observar la evolución del daño y evitar así la mortalidad de las plantas por daños tan intensos.

Por otro lado, las plantas emisoras en los invernaderos estaban cubiertas con una malla muy tupida (Figura 38) para evitar el escape de los insectos, lo que pudo haber generado un sombreo intenso y prolongado. A pesar de que dicha malla es un producto comercial para protección de plántulas de arboles contra herbivoría de ungulados en plantaciones, como ya mencionamos anteriormente, la reducción de la luz en las plantas sometidas a la herbivoría pudo haber limitado la capacidad de respuesta de las plantas, y por tanto, reducir las posibilidades de influir en las plantas vecinas.

Figura 38. Mallas utilizadas en el campo para cubrir las plantas emisoras de los invernaderos y evitar así la huída de los *Hylobius abietis.*

En cualquier caso, aunque las plantas emisoras informasen al ambiente de que están resultando atacadas mediante alteraciones de las emisiones de VOCs, podría ser que no existiese capacidad de percepción por las plantas vecinas, y por lo tanto de respuesta, en pinos. Aunque si sabemos que los pinos modifican las emisiones de VOCs en respuesta a la herbivoría por insectos *(Mumm & Hilker 2006; Sampedro et al. 2010; Sampedro et al. 2011; Moreira et al. 2012)*, hasta hoy, no hay ningún trabajo que tenga explorado la posibilidad de percibir la herbivoría en la vecindad en estas especies. La posibilidad de comunicación entre plantas vecinas es un campo científico en pleno auge, pero hasta ahora, solamente se han encontrado respuestas significativas a la herbivoría en la vecindad en algunas pocas especies *(Takabayashi & Dicke 1996; Agrawal 2000; Farmer 2001)*. Hay muchos experimentos en otras muchas especies en los que los resultados no han sido tan claros y no se ha podido demostrar la “comunicación entre plantas”, aunque la mayoría de estos resultados “negativos”, o mejor dicho, “no positivos” no han sido publicados (Xoaquín Moreira y Richard Karban, comunicación personal).

Como resumen podemos decir que, aunque la metodología debe ser revisada y comprobada para nuevos experimentos, los resultados del presente trabajo, aunque no concluyentes, presentan indicios de que los pinos si pueden percibir cambios bióticos en su entorno. Pero para poder demostrar y cuantificar definitivamente esta

posibilidad, son precisos nuevos experimentos con una metodología depurada. Particularmente, sería interesante estudiar el tiempo necesario de exposición a la herbivoría en las plantas emisoras para medir la respuesta en plantas receptoras; conviene también diseñar un nuevo dispositivo experimental de confinamiento de los insectos en las plantas emisoras que deje pasar más luz y que sea transparente para permitir apreciar los daños desde el exterior; es preciso controlar la variabilidad genética para reducir la variabilidad en las respuestas; y quizás, conviene mejorar el protocolo experimental haciendo un mayor control de los volátiles emitidos y recibidos por las plantas experimentales.

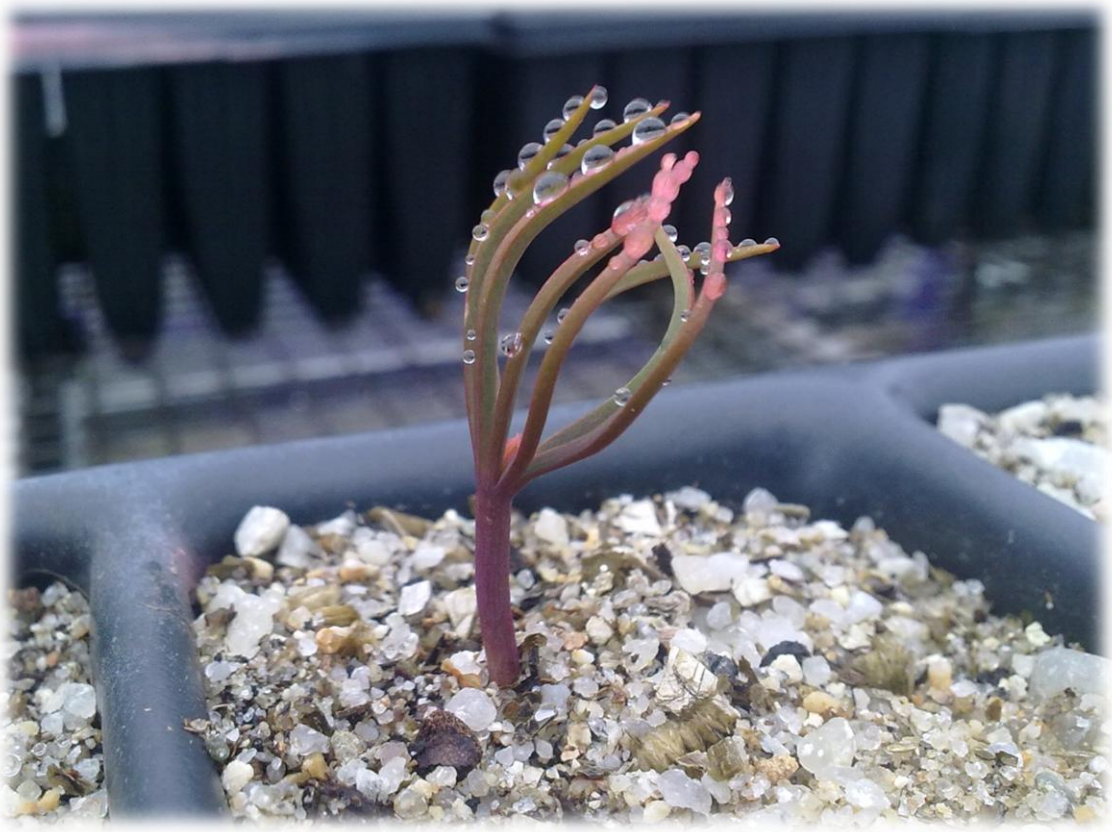
Por otro lado, los caracteres estudiados son cuantificaciones rápidas del contenido total de los compuestos defensivos mayoritarios en las coníferas. Probablemente las respuestas a la herbivoría en la vecindad solamente puedan ser detectadas con análisis mucho más finos del perfil de terpenos y fenoles particulares utilizando cuantificaciones precisas por cromatografía de gases o cromatografía líquida o con análisis de expresión génica de genes relacionados con las respuestas defensivas.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1) La herbivoría en plantas vecinas ha tenido como consecuencia un incremento significativo de un 66% en la concentración constitutiva de resina en la parte superior del tallo de *P. radiata* en relación a plantas que han crecido sin herbivoría en la vecindad. Sin embargo no se ha observado efecto en otros tejidos, en el contenido de polifenoles totales, ni en *P. pinaster.*
2) Las plantas que han crecido en presencia de vecinas atacadas por *H. abietis* han mostrado respuestas significativas o marginalmente significativas de susceptibilidad inducida una vez que han sido expuestas a herbivoría real, en comparación con plantas que han crecido sin herbivoría en la vecindad. En respuesta al ataque por *H. abietis*, la concentración de resina ha disminuido en la parte inferior del tallo de *P. pinaster* y superior de *P. radiata*; y la concentración de polifenois ha descendido en el tallo de *P. radiata*. Esta respuesta es paradójica y contraria a la descrita en trabajos previos.
3) En las plantas emisoras sometidas a herbivoría durante 40 días se ha observado un incremento significativo de las defensas químicas en *P. pinaster*, pero no en *P. radiata*.
4) En las plantas receptoras no se han observado incrementos significativos de la concentración de defensas químicas en respuesta a la herbivoría de *H. abietis,* lo cual no concuerda con resultados anteriores.
5) Las concentraciones de defensas constitutivas son diferentes en la parte superior e inferior del talo de pinos jóvenes, con más resina en la parte superior y más polifenoles en la inferior en las dos especies estudiadas. Estos resultados concuerdan con lo observado en trabajos previos.
6) La concentración constitutiva de resina no volátil en las aciculas ha sido menor que en los tallos, pero la de polifenoles totales ha sido equivalente, o mayor en el caso de *P. radiata*. Este resultado es coherente con lo observado en trabajos previos.
7) De forma conjunta, los resultados sugieren que la herbivoría en plantas vecinas puede modificar de alguna manera el sistema defensivo y la capacidad de respuesta frente a ataques posteriores de los pinos jóvenes. Los pinos podrían percibir los cambios bióticos en su entorno, pero los resultados no permiten concluir ni generalizar sobre el tipo de respuesta. Deben realizarse nuevos experimentos que confirmen o rechacen estas hipótesis.

7. BILIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

Agrawal, A. A. (2000). "Benefits and costs of induced plant defense for *Lepidium virginicum* (Brassicaceae) " Ecology 81(7): 1804-1813.

Alía, R. and S. Martín (2009). Guía técnica para la conservación genética y utilización del pino negral (*Pinus pinaster*), Foresta. Madrid. España.: 6.

Álvarez-González, J. G., A. D. Ruiz-González, R. Rodríguez-Soalleiro and M. Barrio-Anta (2005). "Ecorregional site index models for Pinus pinaster in Galicia (northwestern Spain)." Annals of Forest Science 62: 115-127.

Baldwin, I. T., R. Halitschke, A. Paschold, C. C. von Dahl and C. A. Preston (2006). "Volatile signaling in plant-plant interactions: "Talking trees" in the genomics era." Science 311(5762): 812-815.

Baraza, E., J. Gomez, J. Hodar and R. Zamora (2004). "Herbivory has a greater impact in shade than in sun: response of Quercus pyrenaica seedlings to multifactorial environmental variation." Canadian Journal of Botany 82(3): 357-364.

Bauce, É., M. Crépin and N. Carisey (1994). "Spruce budworm growth, development and food utilization on young and old balsam fir trees " Oecologia 97(4): 499-507.

Bezemer, T. M. and N. M. v. Dam (2005). "Linking aboveground and belowground interactions via induced plant defenses." Trends in Ecology & Evolution 20(11): 617-624.

Bohlmann, J. (2008). Insect-induced terpenoid defenses in spruce. Induced plant resistance to herbivory. A. Schaller. Dordrecht, The Netherlands, Springer Netherlands: 173-187.

Bohlmann, J. and R. Croteau (1999). Terpenoid defenses in conifers. Insect-plant interactions and induced plant defence, Novartis Found Symp Ser 223: 132-149.

Carrillo-Gavilán, A., X. Moreira, R. Zas, M. Vilà and L. Sampedro (2012). "Early resistance of alien and native pines against two native generalist insect herbivores: no support for the natural enemy hypothesis." Functional Ecology 26(1): 283-293.

Creelman, R. A. and J. E. Mullet (1995). "Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(10): 4114-4119.

Dans, F. V., F. A. Fernández and A. G. Romero (1999). Manual de selvicultura del pino radiata en Galicia. Santiago, Universidad de Santiago de Compostela.

de la Mata, R., J. Voltas and R. Zas (2012). "Phenotypic plasticity and climatic adaptation in an Atlantic maritime pine breeding." Annals of Forest Science 69: 477-487.

Dicke, M., A. A. Agrawal and J. Bruin (2003). "Plants talk, but are they deaf?" Trends in Plant Science 8(9): 403-405.

Dicke, M. and J. Bruin (2001). "Chemical information transfer between plants: back to the future." Biochemical Systematics and Ecology 29(10): 981-994.

Dicke, M., P. Vanbaarlen, R. Wessels and H. Dijkman (1993). "HERBIVORY INDUCES SYSTEMIC PRODUCTION OF PLANT VOLATILES THAT ATTRACT PREDATORS OF THE HERBIVORE - EXTRACTION OF ENDOGENOUS ELICITOR." Journal of Chemical Ecology 19(3): 581-599.

Dicke, M., T. A. Vanbeek, M. A. Posthumus, N. Bendom, H. Vanbokhoven and A. E. Degroot (1990). "ISOLATION AND IDENTIFICATION OF VOLATILE KAIROMONE THAT AFFECTS ACARINE PREDATOR-PREY INTERACTIONS - INVOLVEMENT OF HOST PLANT IN ITS PRODUCTION." Journal of Chemical Ecology 16(2): 381-396.

Dolch, R. and T. Tscharntke (2000). "Defoliation of alders (Alnus glutinosa) affects herbivory by leaf beetles on undamaged neighbours." Oecologia 125(4): 504-511.

Farmer, E. E. (2001). "Surface-to-air signals." Nature 411(6839): 854-856.

Farmer, E. E. (2001). "Surface-to-air signals." NATURE 411: 854-856.

Franceschi, V. R., T. Krekling and E. Christiansen (2002). "Application of methyl jasmonate on *Picea abies* (*Pinaceae*) stems induces defense-related responses in phloem and xylem." American Journal of Botany 89(4): 578-586.

Franceschi, V. R., P. Krokene, E. Christiansen and T. Krekling (2005). "Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests." New Phytologist 167: 353–376.

Frost, C. J., M. Appel, J. E. Carlson, C. M. De Moraes, M. C. Mescher and J. C. Schultz (2007). "Within-plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and primes responses against herbivores." Ecology Letters 10(6): 490-498.

Gundlach, H., M. J. Müller, T. M. Kutchan and M. H. Zenk (1992). "Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89(6): 2389-2393.

Heijari, J., J. D. Blande and J. K. Holopainen (2011). "Feeding of large pine weevil on Scots pine stem triggers localised bark and systemic shoot emission of volatile organic compounds." Environmental and Experimental Botany 71: 390–398.

Heijari, J., A.-M. Nerg, P. Kainulainen, H. Viiri, M. Vuorinen and J. K. Holopainen (2005). "Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against Hylobius abietis in Scots pine seedlings." Entomologia Experimentalis et Applicata 115: 117–124.

Heil, M. (2008). "Indirect defence via tritrophic interactions." New Phytologist 178(1): 41-61.

Heil, M. and I. T. Baldwin (2002). "Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept." TRENDS in Plant Science 7(2): 61-67.

Heil, M. and J. C. Silva Bueno (2007). "Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(13): 5467-5472.

Heil, M. and J. Ton (2008). "Long-distance signalling in plant defence." Trends in Plant Science 13(6): 264-272.

Huber, D. P., R. N. Philippe, K. A. Godard, R. N. Sturrock and J. Bohlmann (2005). "Characterization of four terpene synthase cDNAs from methyl jasmonate-induced Douglas-fir, Pseudotsuga menziesii." Phytochemistry 66(12): 1427-1439.

Karban, R., I. T. Baldwin, K. J. Baxter, G. Laue and G. W. Felton (2000). "Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush." Oecologia 125(1): 66-71.

Kessler, A. and I. T. Baldwin (2001). "Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature." Science 291(5511): 2141-2144.

Knudsen, J. T., L. Tollsten and L. G. Bergström (1993). "Floral scents—a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques." Phytochemistry 33(2): 253-280.

Littell, R. C., G. A. Milliken, W. W. Stroup, R. D. Wolfinger and O. Schabenberger (2006). SAS System for mixed models, second edition. Cary, NC, SAS Institute.

Marín-Loaiza, J. and C. Céspedes (2007). "Compuestos volátiles de plantas. origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro." Revista Fitotecnia Mexicana 30(4): 327-351.

Mattiacci, L., M. Dicke and M. A. Posthumus (1995). "BETA-GLUCOSIDASE - AN ELICITOR OF HERBIVORE-INDUCED PLANT ODOR THAT ATTRACTS HOST-SEARCHING PARASITIC WASPS." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(6): 2036-2040.

Moreira, X. (2010). Variación genética y efecto de la disponibilidad de nutrientes en las defensas constitutivas e inducidas de Pinus pinaster Ait, PhD Dissertation. University of Vigo.

Moreira, X., R. Costas, L. Sampedro and R. Zas (2008). "A simple method for trapping Hylobius abietis alive in northern Spain." Investigación Agraria. Serie de Recursos forestales 17(2): 188-192.

Moreira, X., L. Sampedro, A. Solla and R. Zas (2008). "Alterations of the resin canal system of *Pinus pinaster* seedlings after fertilization of a healthy and of a *Hylobius abietis* attacked stand." Trees Structure and Function 22(6): 771-777.

Moreira, X., L. Sampedro and R. Zas (2009). "Defensive responses of *Pinus pinaster* seedlings to exogenous application of methyl jasmonate: Concentration effect and systemic response." Environmental and Experimental Botany 67: 94-100.

Moreira, X., R. Zas and L. Sampedro (2012). "Differential allocation of constitutive and induced chemical defenses in pine tree juveniles: a test of the optimal defense theory." PlosOne: 7(3): e34006.

Moreira, X., R. Zas and L. Sampedro (2012). "Genetic variation and phenotypic plasticity of nutrient re-allocation and increased fine root production as putative tolerance mechanisms inducible by methyl jasmonate in pine trees." Journal of Ecology 100: 810-820.

Moreira, X., R. Zas and L. Sampedro (2012). Methyl jasmonate as chemical elicitor of induced responses and anti-herbivory resistance in young conifer trees. Plant defence: Biological control. Progress in Biological Control. J. M. Merillon and K. G. Ramawat. Netherlands, Springer 12: 345-362.

Moreira, X., R. Zas and L. Sampedro (2012). "Quantitative comparison of chemical, biological and mechanical induction of secondary compounds in *Pinus pinaster* seedlings." Trees Structure and Function 26(2): 677-685.

Moreira, X., R. Zas and L. Sampedro (2013). "Additive genetic variation in resistance traits of an exotic pine species: little evidence for constraints on evolution of resistance against native herbivores." Heredity in press.

Mumm, R. and M. Hilker (2006). "Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects " Trends in Plant Science 11(7): 351-358.

Nordenhem, H. and G. Nordlander (1994). "Olfactory oriented migration through soil by root-living Hylobius abietis (L.) larvae (Col., Curculionidae)." Journal of Applied Entomology 117: 457-462.

Nordlander, G., H. H. Eidmann, U. Jacobsson, H. Nordenhem and K. Sjodin (1986). "Orientation of the pine weevil Hylobius abietis to underground sources of host volatiles." Entomologia Experimentalis et Applicata 41: 91-100.

Nordlander, G., C. Hellqvist, K. Johansson and H. Nordenhem (2011). "Regeneration of European boreal forests: Effectiveness of measures against seedling mortality caused by the pine weevil Hylobius abietis." Forest Ecology and Management 262: 2354-2363.

Núñez-Farfán, J., J. Fornoni and P. L. Valverde (2007). "The evolution of resistance and tolerance to herbivores." Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 38: 541-566.

Örlander, G., U. Nilsson and G. Nordlander (1997). "Pine weevil abundance on clear-cuttings of different ages: a 6-year study using pitfall traps." Scandinavian Journal of Forest Research 12: 225-240.

Örlander, G. and G. Nordlander (2003). "Effects of field vegetation control on pine weevil (*Hylobius abietis*) damage to newly planted Norway spruce seedlings." Annals of Forest Science 60(7): 667-671.

Phillips, M. A. and R. B. Croteau (1999). "Resin-based defenses in conifers." Trends in Plant Science 4(5): 184-190.

Pieterse, C. M. J., D. Van der Does, C. Zamioudis, A. Leon-Reyes and S. C. M. Van Wees (2012). "Hormonal Modulation of Plant Immunity." Ann Rev Cell Develop Biol 28: 489-521.

Richardson, D. M. (1998). Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge, Cambridge University Press.

Rose, U. S. R., A. Manukian, R. R. Heath and J. H. Tumlinson (1996). "Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves - A systemic response of living plants to caterpillar damage." Plant Physiology 111(2): 487-495.

Sampedro, L., X. Moreira, J. Llusia, J. Peñuelas and R. Zas (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: 4437-4447.

Sampedro, L., X. Moreira, P. Martíns and R. Zas (2009). "Growth and nutritional response of *Pinus pinaster* after a large pine weevil (*Hylobius abietis*) attack." Trees Structure and Function 23: 1189-1197.

Sampedro, L., X. Moreira and R. Zas (2011). "Resistance and response of Pinus pinaster seedlings to Hylobius abietis after induction with methyl jasmonate." Plant Ecology 212: 397-401.

Strauss, S. Y. and A. A. Agrawal (1999). "The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory." Trends in Ecology & Evolution 14(5): 179-185.

Takabayashi, J. and M. Dicke (1996). "Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants." Trends in Plant Science 1(4): 109-113.

Thaler, J. S., P. T. Humphrey and N. K. Whiteman (2012). "Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk." Trends in Plant Science 17(5): 260-270.

Thaler, J. S., M. J. Stout, R. Karban and S. S. Duffey (2001). "Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores." Ecological Entomology 26: 312-324.

Tiffin, P. (2000). "Mechanisms of tolerance to herbivore damage:what do we know?" Evolutionary Ecology 14(4-6): 523-536.

Trapp, S. and R. Croteau (2001). "Defensive resin biosynthesis in conifers." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 689-724.

Trumble, J. T., D. M. Kolodny-Hirsch and I. P. Ting (1993). "Plant compensation for arthropod herbivory." Annual Review of Entomology 38 93-119.

Van der Putten, W. H., L. E. M. Vet, J. A. Harvey and F. L. Wackers (2001). "Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists." Trends in Ecology & Evolution 16(10): 547-554.

Wainhouse, D., J. T. Staley, R. Jinks and G. Morgan (2009). "Growth and defence in young pine and spruce and the expression of resistance to a stem-feeding weevil." Oecologia 158(4): 641-650.

Zas, R. and E. Merlo (2008). "El programa de mejora de *Pinus pinaster* en Galicia." Boletin CIDEU 5-6: 5-24.

Zas, R., X. Moreira and L. Sampedro (2011). "Tolerance and induced resistance in a native and an exotic pine species: relevant traits for invasion ecology." Journal of Ecology 99: 1316-1326.

Zas, R., L. Sampedro, X. Moreira and P. Martíns (2008). "Effect of fertilization and genetic variation on susceptibility of *Pinus radiata* seedlings to *Hylobius abietis* damage." Canadian Journal of Forest Research 38(1): 63-72.

Zas, R., L. Sampedro, E. Prada, M. J. Lombardero and J. Fernández-López (2006). "Fertilization increases *Hylobius abietis* L. damage in *Pinus pinaster* Ait. seedlings." Forest Ecology and Management 222(1-3): 137-144.

Zeneli, G., P. Krokene, E. Christiansen, T. Krekling and J. Gershenzon (2006). "Methyl jasmonate treatment of mature Norway spruce (Picea abies) trees increases the accumulation of terpenoid resin components and protects against infection by Ceratocystis polonica, a bark beetle-associated fungus." Tree Physiology 26: 977-988.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mi más ***profundo agradecimiento*** *a los directores de proyecto,* ***Rafa y Luis****, por haberme brindado la oportunidad de haber podido realizar el proyecto de final de carrera con ellos, en donde no solamente me demostraron que valen mucho como profesionales sino que, también, como compañeros son auténticos. Un agradecimiento especial, por supuesto, a* ***Patri****,* ***Manu****,* ***Michel****,* ***Luz****,* ***César*** *y* ***Rocío*** *que de no ser por ellos no lo daría hecho sola.*

Agradecer también el apoyo que me ha brindado mi familia durante este largo y duro camino, en especial a ***mis padres****,* ***mis hermanos****,* ***Alberto****,* ***Manuel****,* ***Lidia y Sonia****, ya que siempre pude contar con ellos en los momentos más difíciles no encontrando nunca un no por respuesta.*

¡GRACIAS!