

DENSIDAD Y ÁREA DE LOS CANALES RESINÍFEROS DE *PINUS PINASTER* ANTE TRATAMIENTOS DE FERTILIZACIÓN, Y SU RELACIÓN CON LA DEFENSA ANTE *HYLOBIUS ABIETIS*

Xoaquín Moreira Tomé¹, Miguel A. Ramos García², Luis Sampedro Pérez¹, Rafael Zas Arregui¹ y Alejandro Solla Hach²

¹ Centro de Investigación e Información Ambiental de Lourizán. Apdo. de correos 127. 36080-PONTEVEDRA (España). Correo electrónico: xmoreira.cifal@siam-cma.org

² Ingeniería Técnica Forestal. Universidad de Extremadura. Avenida Virgen del Puerto 2 10600-PLASENCIA (Cáceres, España). Correo electrónico: asolla@unex.es

Resumen

Las coníferas poseen una estructura de canales resiníferos que actúa como defensa contra el ataque de insectos y patógenos. Varios autores han observado que un aumento en la disponibilidad de nutrientes puede alterar el reparto de energía en las plantas, en detrimento de los sistemas defensivos. El presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto de la fertilización de establecimiento sobre el desarrollo del sistema de canales resiníferos en *Pinus pinaster*. Mediante histología en brinzales de 3 savias sometidos a dos ensayos familia x fertilización se cuantificó la densidad y el área de los canales resiníferos del floema y del xilema tanto en el tallo principal como en ramas laterales en dos ensayos familia x fertilización. Se observó un efecto significativo de la fertilización en el desarrollo de los canales resiníferos del floema ($p < 0,05$), con valores de 0,45 y 0,36 canales.mm² para brinzales no fertilizados y sí fertilizados, respectivamente. Este efecto no se observó en las variables del xilema. La densidad de canales resiníferos en el xilema fue significativamente diferente entre las dos parcelas estudiadas, siendo mayor en la atacada por el curculiónido *Hylobius abietis*. Por último, la relación tallo-rama de las variables cuantificadas no fue lo suficientemente consistente como para utilizar los canales en ramas de *P. pinaster* como indicadores de los canales en el tronco principal.

Palabras clave: *Hylobius abietis*, Mecanismos de defensa, Floema, Xilema, Defensas inducidas, Herbivoría

INTRODUCCIÓN

Pinus pinaster Ait es la especie forestal de mayor importancia en Galicia ocupando casi un 30% de la superficie arbolada gallega. Debido a la importancia de esta especie en el sector productivo forestal, en los años 80 se impulsó un programa de mejora genética donde se seleccionaron 116 árboles plus de la zona costera de

Galicia por su vigor, rectitud del fuste y escasa ramosidad. Dentro del programa de mejora se incluyeron varios ensayos en diversos puntos de la geografía gallega para evaluar la interacción familia x fertilización bajo diferentes condiciones ambientales. El ataque masivo a uno de estos ensayos por parte del curculiónido *Hylobius abietis* L. permitió un primer estudio de los patrones de preferencia de ataque, vulne-

rabilidad y resistencia entre progenies (ZAS et al., 2005) y de cómo la disponibilidad de nutrientes afecta al sistema insecto-planta (ZAS et al., 2006). Los resultados de estos trabajos mostraron una clara preferencia del insecto por las plantas fertilizadas, especialmente con fósforo, y por unos genotipos determinados.

Las plantas poseen mecanismos de defensa constitutivos e inducidos para resistir el ataque de insectos o patógenos. El sistema de defensa constitutivo de mayor importancia en coníferas es la producción de oleoresina en los canales resiníferos del floema y del xilema. Entre las defensas inducidas en coníferas y como respuesta a ataques, destaca la producción de canales de resina traumáticos en el xilema; su finalidad es aumentar el flujo y la acumulación de resina y prevenir o responder más eficazmente a futuros ataques (FRANCESCHI et al., 2005). La eficacia de los mecanismos de defensa varía según la especie, genotipo y edad (KARBAN & BALDWIN, 1997), y podría estar condicionada por factores ambientales como la disponibilidad de nutrientes (VANAKKER et al., 2004).

La fertilización de establecimiento es una herramienta selvícola de gran importancia y es particularmente aconsejada para la plantación de pinos en los suelos arenosos y ácidos de Galicia, donde existe un déficit importante de nutrientes, especialmente de fósforo (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002; ZAS & SERRADA, 2003). Varios autores han observado que la fertilización de especies forestales, asúmase la disponibilidad de nutrientes, afecta en gran medida a la dinámica poblacional de los insectos herbívoros y otras plagas (SELANDER & IMMONEN, 1992; VANAKKER et al., 2004). Se desconoce, sin embargo, cómo afecta la fertilización a la estructura de los canales resiníferos constitutivos e inducidos en *P. pinaster*.

En el presente trabajo se pretende estudiar si el incremento en la disponibilidad de nutrientes provocado por la fertilización de establecimiento de *P. pinaster* produce una alteración en la densidad y el área media de los canales resiníferos. Como segundo objetivo, se pretende estudiar si existe una correlación entre las variables medidas en rama y en tallo, a fin de poder muestrear en un futuro sólo en rama y evitar dañar la planta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

El estudio se realizó en dos ensayos familia x fertilización del plan de mejora de *P. pinaster* en Galicia instalados en Rianxo y Rebordelo. La parcela de Rianxo se ubica al SE de la Sierra del Barbanza, en el límite entre las provincias de A Coruña y Pontevedra. El ensayo fue instalado en marzo de 2003, un año después de la corta de un antiguo monte maduro de *P. pinaster*. La presencia de numerosos tocones recién cortados hizo que en el verano de 2003 apareciese un ataque masivo del curculiónido *H. abietis*. La parcela de Rebordelo está ubicada en el MVMC de Rebordelo a unos 20 km de Pontevedra y pertenece al Ayuntamiento de Cotobade. El ensayo fue instalado también en marzo de 2003 y presentaba antes de la plantación una vegetación de matorral denso. Se muestrearon destructivamente 50 plantas pertenecientes a un testigo comercial (TSER), por ser este material una representación completa de la población de mejora presente en el huerto semillero de Sergude. Se tomaron muestras en 5 bloques y 5 tratamientos de fertilización que representaban una graduación de crecimiento y de susceptibilidad al ataque de *H. abietis* en base a estudios previos de campo. Los tratamientos fueron un control no fertilizado y otros cuatro fertilizados con sulfato potásico (15 g K.planta⁻¹) y sulfato magnésico (5 g Mg.planta⁻¹) pero diferenciados por la presencia o ausencia de superfosfato (10 g P.planta⁻¹) y urea (5 g N.planta⁻¹).

Toma de muestras y procesado

La toma de muestras se hizo en diciembre de 2004, cuando la planta tenía 3 savias. Para el estudio histológico se tomaron segmentos de 15 cm de longitud en el tallo principal, bajo el último verticilo superior (3 savias), y en la base de una rama lateral del último verticilo (1 savia). Las muestras se fijaron en FAA (formaldehído, etanol, ácido acético y glicerol), los cortes transversales se realizaron con un microtomo de deslizamiento con un espesor de corte de 90 μ m y la tinción se realizó en Safranina disuelta en agua (1% w/v) durante 12 h. Posteriormente se procedió al análisis de imagen de todas las muestras mediante IMAGE-PRO PLUS v 6.0. Tanto en

tallos como en ramas, y a partir de dos sectores que representaban aproximadamente el 75% de la superficie transversal, se midió la densidad y el diámetro de los canales resiníferos en el floema y en el xilema. Se analizó el incremento correspondiente a 2004.

Análisis estadístico

El análisis de la varianza para las variables área y densidad se realizó con el programa STATISTICA 5.0 según el modelo $Y = \mu + P + T + B(P) + P \times T + \text{error}$, donde μ = media general, P = parcela, T = tratamiento de fertilización, y B(P) = bloque anidado dentro de la parcela. Cuando los efectos fueron significativos, las diferencias entre las medias fueron analizadas mediante el test de Tukey. Las relaciones entre tallos y ramas se estudiaron mediante regresiones lineales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de imagen de los cortes histológicos mostró que existieron diferencias significativas en la densidad de canales resiníferos del floema entre plantas sometidas a diferentes tratamientos de fertilización (Tabla 1). El control no fertilizado presentó una densidad de canales 30% mayor que las plantas sometidas a los demás tratamientos de fertilización (0,45 vs. 0,36 canales.mm⁻² respectivamente) (Tabla 2). Estos resultados son coherentes con los observados en un estudio realizado por VANAKKER et al. (2004), en el que la densidad de canales de resina en brinzales de *Picea glauca* x *P. engelmannii* fertilizados era significativamente menor

cuando se incrementaba la disponibilidad de nutrientes. Estos resultados concuerdan con las hipótesis ecológicas de adjudicación de recursos en planta, que proponen que la producción de sustancias defensivas y el crecimiento compiten por la misma energía y el carbono asimilado (BRYANT et al., 1983; KYTO et al., 1996). En base a dichas hipótesis se predice que la respuesta de las plantas a un aumento de la fertilización implica un descenso en la síntesis de compuestos carbonados secundarios, tales como fenoles y terpenos, que actúan como repelentes contra los insectos herbívoros.

La fertilización no tuvo efectos significativos sobre la densidad y la superficie transversal de los canales resiníferos en el xilema (Tabla 1). Al analizar diversas variables de los canales resiníferos constitutivos en *Picea abies*, ROSNER & HANNRUP (2004) observaron que el factor genético era significativamente más importante que el factor ambiental, obteniéndose heredabilidades muy altas. En ZAS et al. (2005), la variación debida al factor genético familiar fue responsable de una gran parte de la variación experimental en *P. pinaster* frente al ataque de *H. abietis*. El número de muestras analizadas en este trabajo para cada tratamiento de fertilización (N = 10) quizá haya sido aquí insuficiente para detectar diferencias entre tratamientos y, además, por haber utilizado plantas de un testigo comercial, no se ha podido controlar el factor genético.

La densidad de canales resiníferos en el xilema fue significativamente diferente entre parcelas (Tabla 1), siendo mayor en la de Rianxo, atacada por *H. abietis*. Esta diferencia podría ser atribuible a la inducción de canales resiníferos traumáticos en el xilema después del ataque del

Variable	Parcela (P) F _(1, 31)	Tto fert (T) F _(4, 31)	Bloque(P) F _(9, 31)	P x T F _(4, 31)
Canales del floema				
Densidad (canales mm ⁻²)	0,3	2,8*	3,8**	1,8
Área media (µm ²)	2,0	2,3	0,8	1,1
Canales del xilema				
Densidad (canales mm ⁻²)	29,8***	0,8	0,7	1,7
Área media (µm ²)	1,2	1,5	1,4	0,8

Tabla 1. Valores F-ratio de los análisis de varianza de las variables densidad y área media en el xilema y floema de *P. pinaster* sometidos a diferentes tratamientos de fertilización de establecimiento. Los asteriscos indican significación según $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), y $p < 0,001$ (***)

Variable	control	+N+P	-N+P	+N-P	-N-P
Canales del floema					
Densidad (número.mm ⁻²)	0,45a	0,36ab	0,34b	0,31b	0,32b
Área media (µm ²)	14.299a	13.034a	11.222a	10.555a	20.554a
Canales del xilema					
Densidad (número.mm ⁻²)	2,59a	2,29a	2,75a	2,46a	2,50a
Área media (µm ²)	10.381a	12.462a	12.070a	12.265a	13.266a

Tabla 2. Densidad y área media de canales del xilema y del floema de brinzales de *P. pinaster* sometidos a diferentes tratamientos de fertilización de establecimiento en las dos parcelas objeto de estudio. Para cada variable, letras diferentes entre tratamientos de fertilización para cada variable indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

insecto. Sin embargo, en nuestras preparaciones histológicas no se ha podido distinguir entre canales constitutivos y canales inducidos como en otras especies (VANAKKER et al., 2004). La densidad de canales del floema no varió significativamente entre parcelas, sugiriendo que el intenso ataque registrado en Rianxo no afectó a esta variable.

Se observó una relación lineal positiva entre el área media de los canales del xilema entre tallos y ramas para ambas parcelas, Rianxo ($N = 25$, $r = 0,57$, $p < 0,01$) y Rebordelo ($N = 25$, $r = 0,47$, $p < 0,01$). Esta misma relación también se encontró tomando los datos de las dos parcelas en conjunto ($N = 50$, $r = 0,53$, $p < 0,01$). La densidad de canales en el xilema también presentó una relación lineal y positiva entre tallos y ramas para la parcela de Rebordelo ($N = 25$, $r = 0,60$, $p < 0,01$) y para las dos parcelas en conjunto ($N = 50$, $r = 0,38$, $p < 0,01$). Sin embargo esta relación desapareció en la parcela de Rianxo ($N = 25$, $r = 0,23$, n.s.). En el floema no se observó ninguna relación significativa expresa mejor (Tabla 3), luego para este tejido no es suficiente considerar que el muestreo de canales resiníferos

en ramas laterales sea buen indicador del sistema de los canales en el tallo.

Este es el primer trabajo que estudia el efecto de la fertilización sobre el desarrollo del sistema de canales resiníferos en brinzales de *P. pinaster*. La fertilización, aunque no parece afectar a las dimensiones y densidad de los canales resiníferos del xilema, disminuye la densidad de canales resiníferos en el floema, afectando así negativamente a la capacidad defensiva de la planta. El estudio histológico de los canales resiníferos se muestra como una buena medida para indicar el nivel defensivo de los brinzales de *P. pinaster*, aunque tiene el inconveniente de ser destructivo. En este sentido, en el floema no se han encontrado correlaciones satisfactorias entre los parámetros medidos en los tallos principales y en las ramas laterales que permitan muestrear sin dañar la guía principal de la planta. En posteriores estudios se comprobará si estos resultados son coherentes con la idea propuesta por otros autores (FRANCESCHI et al., 2005) de que en especies como *P. pinaster*, los canales del floema son exclusivamente constitutivos.

Variable	General (N = 50)	Rianxo (N = 25)	Rebordelo (N = 25)
Canales del floema			
Densidad (número.mm ⁻²)	0,03	0,15	0,24
Área media (µm ²)	0,01	0,11	0,06
Canales del xilema			
Densidad (número.mm ⁻²)	0,38**	0,23	0,60**
Área media (µm ²)	0,53***	0,57**	0,47*

Tabla 3. Coeficiente de correlación de Pearson entre cada una de las variables medidas en tallos y ramas para las dos parcelas analizadas en conjunto y para cada una por separado. Los asteriscos indican significación según $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), y $p < 0,001$ (***)

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Francisco Fernández de Ana Magán y a la Dra. Josefa Fernández López el uso del material e instalaciones de sus departamentos. Este trabajo se ha realizado bajo la financiación del proyecto INIA-RTA05-173.

BIBLIOGRAFÍA

- BRYANT, J.P.; CHAPIN, III & KLEIN, D.R.; 1983. Carbon/Nutrient balance of boreal plants in relation with vertebrate herbivory. *Oikos* 40: 357-368.
- FRANCESCHI, V.; KROKENE, P. & KREKLING, T.; 2005. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytol.* 167: 353-376.
- KARBAN, R. & BALDWIN, I.T.; 1997. *Book Review in Ecology: Induced responses to herbivory. Interspecific interactions.* University of Chicago Press. Illinois.
- KYTO, M.; NIEMELA, P. & LARSSON, S.; 1996. Insect on trees: population and individual responses to fertilization. *Oikos* 75: 148-159.
- ROSNER, S. & HANNRUP, B.; 2004. Resin canal traits relevant for constitutive resistance of Norway spruce against bark beetles: environmental and genetic variability. *Forest Ecol. Manage.* 200: 77-87.
- SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, F.; RODRÍGUEZ-SOALLEIRO, R.; ESPAÑOL, E.; LÓPEZ, C.A. & MERINO, A.; 2002. Influence of edaphic factors and tree nutritive status on the productivity of *Pinus radiata* D. Don plantations in northwest Spain. *Forest Ecol. Manage.* 171: 181-189.
- SELANDER, J. & IMMONEN, A.; 1992. Effect of fertilization and watering of Scots pine seedlings on the feeding preference of the pine weevil (*Hylobius abietis* L.). *Silva Fenn.* 26: 75-84.
- VANAKKER, L.; ALFARO, R.I. & BROCKLEY, R.; 2004. Effects of fertilization on resin canal defences and incidence of *Pissodes strobi* attack in interior spruce. *Can. J. For. Res.* 34: 855-862.
- ZAS, R. & SERRADA, R.; 2003. Foliar nutrient status and nutritional relationships of young *Pinus radiata* D. Don plantations in northwest Spain. *Forest Ecol. Manage.* 174: 167-176.
- ZAS, R.; SAMPEDRO, L.; PRADA, E. & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; 2005. Genetic variation of *Pinus pinaster* Ait. seedlings in susceptibility to the pine weevil *Hylobius abietis* L. *Ann. For. Sci.* 62: 681-688.
- ZAS, R.; SAMPEDRO, L.; PRADA, E.; LOMBARDERO, M.J. & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; 2006b. Fertilization increases *Hylobius abietis* L. damage in *Pinus pinaster* Ait. Seedlings. *Forest Ecol. Manage.* 222: 137-144.

