

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE LUGO
INGENIERÍA TÉCNICA FORESTAL



**EFFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO Y
VARIABILIDAD GENÉTICA EN LAS DEFENSAS
CONSTITUTIVAS E INDUCIDAS CON METIL JASMONATO:
CONCENTRACION FOLIAR DE FENOLES TOTALES EN
JUVENILES DE *Pinus pinaster***

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Autora:

BEATRIZ RODRÍGUEZ-MORALES LÓPEZ

Directores:

LUIS SAMPEDRO PÉREZ RAFAEL ZAS ARREGUI

Tutora:

M^a JOSEFA LOMBARDERO DÍAZ

ABRIL 2008

AGRADECIMIENTOS

Quiero decir que estoy muy contenta de haber desarrollado mi PFC en el Centro de Investigaciones Ambientales de Lourizán, junto a gente tan cualificada como mis directores, Luis Sampedro y Rafael Zas, a los que agradezco sinceramente que me diesen la oportunidad de colaborar con ellos, además de todas las indicaciones para hacer un buen trabajo. También quiero dedicarles un agradecimiento especial a Xoaquín Moreira y a Ana Soliño por la ayuda desinteresada que me prestaron a lo largo del proceso. Un guiño a Vicente Rozas, por su empatía. Y no olvido a Sara Varela, pues si no nos hubiésemos encontrado esto probablemente no habría ocurrido. También al Dr. J.A. Hódar, por sus indicaciones con el análisis de fenoles.

Gracias a Belenciña por abrirme las puertas de su casa y hacerme un hueco dentro de su peculiar familia junto a Buda, Miki y la querida Queta, con la que pasamos tan buenos ratos.

Este proyecto, que representa la culminación de un largo esfuerzo, se lo dedico

A MIS PADRES.

Título: Efecto de la disponibilidad de fósforo y variabilidad genética en las defensas constitutivas e inducidas con metil jasmonato: concentración foliar de fenoles totales en juveniles de *Pinus pinaster*.

Autora: Beatriz Rodríguez-Morales López

Directores: Luis Sampedro Pérez y Rafael Zas Arregui

Convocatoria: Abril 2008

Este Proyecto Fin de Carrera se ha realizado en el centro de Investigaciones Ambientales de Lourizán bajo la dirección de los doctores Luis Sampedro Pérez y Rafael Zas Arregui, al amparo de los Proyectos de investigación INIA-RTA 05-173 “Eficiencia del uso del fósforo en coníferas de crecimiento rápido. Variabilidad genética, mejora y repercusiones fitosanitarias” y RTA-100 “Efectos maternos en *Pinus pinaster*: influencia del estado nutricional y sanitario de árboles madre en el vigor y resistencia de sus progenies. Implicaciones en la evaluación temprana dentro de los programas de mejora”.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 <i>Pinus pinaster</i> Ait.: especie de interés forestal en Galicia	6
1.2 Mecanismos de defensa en coníferas	9
1.3 Los compuestos fenólicos como elementos defensivos en coníferas	13
1.4 El metil jasmonato como inductor de respuestas defensivas	18
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS	21
3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo	21
3.2 Diseño experimental	22
3.3 Muestreo y preparación de las muestras	24
3.4 Análisis químicos	25
3.5 Análisis estadístico	29
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSIÓN	43
6. CONCLUSIONES	50
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMEN

Las plantas disponen de recursos limitados para el mantenimiento de sus procesos fisiológicos, tales como crecimiento, reproducción y defensa, y deben, como otros organismos, adjudicarlos de la manera más eficaz posible. El ambiente, y en particular la disponibilidad de nutrientes, juega un importante papel regulador en estos procesos de adjudicación de recursos. Concretamente, en *Pinus pinaster* Ait. resultados previos demuestran un importante papel regulador de la disponibilidad de nutrientes tanto en el crecimiento como en la susceptibilidad a distintas plagas y enfermedades. En esta investigación se ha estudiado la influencia del genotipo y la fertilización fosfórica en las defensas constitutivas e inducidas con metil jasmonato (MeJa) en juveniles de *P. pinaster* pertenecientes a 33 familias de árboles plus y un testigo comercial de la costa gallega (TCOS), cuantificadas como concentración de fenoles totales en las acículas. Se encontró que el MeJa resultó adecuado como agente elicitor de respuestas defensivas, puesto que afectó significativamente al contenido de fenoles totales en las acículas, induciendo una mayor producción de fenoles en aquellas plantas en las que fue aplicado. Asimismo, la fertilización afectó significativamente al contenido de fenoles totales, de modo que cuando el fósforo fue limitante ($<2 \text{ mg P L}^{-1}$) las plantas invirtieron más en defensa (desde un 40 % hasta un 75 % más de polifenoles) que en el resto de situaciones de fertilización (5, 10, 20 mg P L^{-1}). La interacción de los tratamientos de fertilización fosfórica con los de MeJa también resultó significativa, de manera que la respuesta a la aplicación de MeJa fue marcadamente mayor bajo circunstancias de estrés nutricional. El efecto del genotipo no produjo diferencias significativas en las defensas constitutivas ni inducidas de los brinzales. Sin embargo, se encontró una relación inversa, negativa y significativa entre la concentración de fenoles totales constitutivos e inducidos, de modo que las familias con un buen sistema defensivo constitutivo presentaron menor capacidad de respuesta inducida, y viceversa.

Palabras clave:

Pinus pinaster, metabolitos secundarios, fertilización, variación genética, plan de mejora, resistencia.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Pinus pinaster* Ait.: especie de interés forestal en Galicia

Pinus pinaster Ait. es una especie de interés forestal perteneciente al género *Pinus*, el más amplio de la familia Pinaceae, que comprende más de cien especies y muchas subespecies y variedades que se distribuyen principalmente por las regiones de clima templado del hemisferio norte y abarcan un amplio rango de habitat climáticamente diferentes (Mumm & Hilker, 2006). El área de distribución natural de *P. pinaster* se extiende por toda España y Portugal, Sur de Francia, Italia, Marruecos, Argelia y Malta, aunque en estas dos últimas zonas sólo con pequeñas poblaciones y posiblemente introducidas por el hombre. Generalmente podemos encontrarlo entre el nivel del mar y unos 800 metros de altitud. Es una conífera de crecimiento rápido de gran importancia económica por el aprovechamiento de su madera para tablero, carpintería y construcción.

En Galicia, se ha convertido en la especie más importante del sector forestal, siendo la más empleada en repoblaciones, con una tasa de plantación superior a las 3.000 ha anuales (Álvarez-González et al., 2005). Ocupa más de 400.000 ha en masas puras y cerca de 200.000 ha en masas mixtas junto al roble y el eucalipto, lo que supone en total casi un 30% de la superficie forestal gallega. Su incremento anual de volumen se acerca a los 3 millones de m³ por año (Xunta de Galicia, 2001). No obstante, la mayoría de la madera de estas masas de pino marítimo es de mala calidad, por lo que termina siendo empleada en la industria de trituración para producir tableros de fibras o partículas o, a lo sumo, en la industria del aserrado, transformándose en tabla o tablón para encofrados (Sanz et al., 2006).

Debido al enorme potencial productivo y económico y a la fuerte demanda de semilla existente, comenzó a finales de los años 80 un programa de mejora genética de *P. pinaster* impulsado por la Xunta de Galicia sobre la procedencia local de Galicia-Costa, entendida ésta como la franja costera comprendida desde el nivel del mar hasta

los 600 metros de altitud (Vega et al., 1993) (Figura 1.1). La intención perseguida con este programa, que hoy en día sigue vigente, es la de obtener semilla de alta calidad genética para su uso en repoblación. El proceso comenzó con la selección de 128 árboles, denominados *árboles plus*, en función de sus buenas características de crecimiento, rectitud del fuste y baja ramosidad. Se lograron clonar mediante injerto 116 de estos árboles, estableciéndose dos huertos semilleros en la provincia de A Coruña, uno en Sergude en 1991 y el otro en Monfero en 1998, con menor éxito productivo debido a su peor calidad de estación. Paralelamente a la instalación de estos huertos semilleros se establecieron, a partir de semilla de los árboles plus, los correspondientes ensayos de progenie, cuya evaluación permitió estimar diversos parámetros genéticos, cuantificar la relevancia de la interacción dada entre el genotipo y el ambiente y conocer la superioridad de unas familias respecto a otras, parámetros que han servido de ayuda para diseñar la estrategia de mejora y conformar una nueva población de mejora. La superioridad del material de primera generación ha sido ampliamente demostrada en diversos ensayos (Zas et al., 2004; Martins, 2005; López Rodríguez, 2006). Para aumentar la ganancia genética en la nueva población de mejora se están llevando a cabo dos tipos de selección de individuos: *Backward selection*, mediante la que se eliminan los peores genotipos de los huertos semilleros y se selecciona una población élite para cruzar de manera controlada de modo que se obtenga un material élite de segunda generación, y *Forward selection*, en la que son los descendientes de los clones, representados en los ensayos de progenie, los seleccionados para conformar los nuevos huertos semilleros de segunda generación.

Dentro de la colección de ensayos de progenie se instalaron ensayos factoriales familia x fertilización con el fin de evaluar la interacción genotipo x nutrición, pues la nutrición es uno de los factores ambientales con mayor efecto en la productividad de las masas forestales en Galicia (Sanchez-Rodriguez et al., 2002). En el año 2003 uno de estos ensayos familia x fertilización se vio afectado por una plaga de *Hylobius abietis* L., hecho que brindó la oportunidad de estudiar el comportamiento

tanto de los insectos como de los pinos en función del genotipo y de la disponibilidad de nutrientes de estos últimos. Se observó que la preferencia en el ataque estuvo fuertemente influenciada por los tratamientos de fertilización, siendo las plantas fertilizadas, especialmente aquellas con fósforo, las que sufrieron mayor intensidad de daño (Zas et al., 2006), anulando el efecto positivo que la fertilización produce sobre el crecimiento. También se observó un fuerte control genético en la sensibilidad de las plantas ante el ataque, puesto que no todas las familias sometidas a idénticos factores ambientales presentaron el mismo nivel de crecimiento ni el mismo grado de daño (Zas et al., 2005; Zas et al., 2006). Resultados similares fueron obtenidos en individuos de *Pinus radiata* bajo estas mismas circunstancias (Zas et al., 2008).

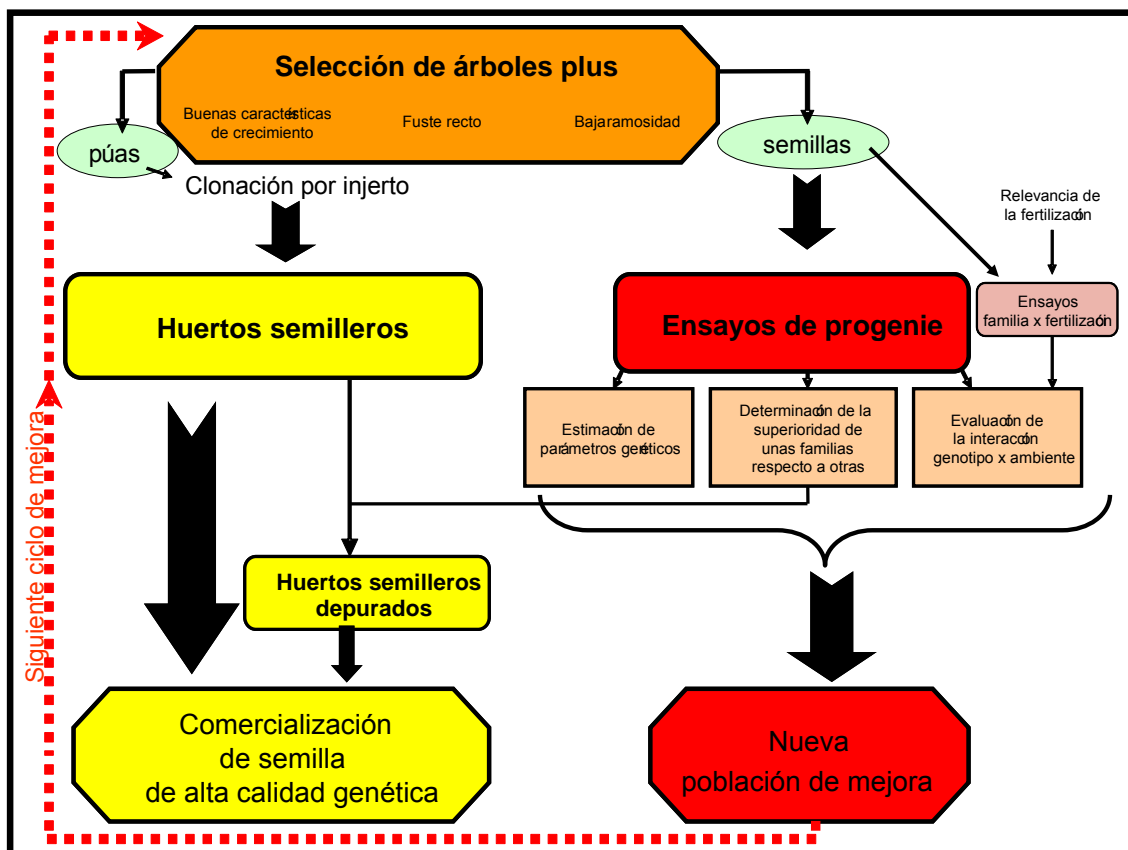


Figura 1.1 Esquema del programa de mejora de *P. Pinaster* en Galicia.

El déficit de fósforo existente en la mayoría de los suelos gallegos condiciona la calidad de estación, limitando la capacidad de crecimiento de los árboles. La fertilización de establecimiento es una técnica selvicultural de gran importancia en los primeros años después de una plantación forestal y está aconsejada particularmente en plantaciones de pino realizadas en suelos pobres, arenosos y ácidos como los existentes en Galicia, que presentan un importante déficit de nutrientes, y en especial de fósforo (Sanchez-Rodriguez et al., 2002). No obstante, es posible que la fertilización conlleve otro tipo de consecuencias que resulten perjudiciales para los brinzales, como ocurrió en el citado ensayo familia x fertilización atacado por *H. abietis*. Diversos autores señalan la posibilidad de que la fertilización en especies de interés forestal afecte en gran medida a la dinámica poblacional de los insectos herbívoros y otras plagas (Selander & Immonen, 1992; Desprez-Loustau & Wagner, 1997; Anglberger & Halmschlager, 2003; vanAkker et al., 2004; Blodgett et al., 2005). Asimismo, diversas hipótesis ecológicas respaldan los resultados obtenidos de estas experiencias, como el balance de crecimiento-diferenciación (Herms & Mattson, 1992), o la hipótesis de la tasa de crecimiento (Coley et al., 1985), que proponen que un aumento en la disponibilidad de recursos para la planta (agua, luz o nutrientes) podría reducir su asignación a las defensas. De este modo, crecimiento y defensas compiten por estos compuestos, por lo que un incremento del crecimiento podría estar asociado con una disminución de las defensas (Lombardero et al., 2000).

1.2 Mecanismos de defensa en coníferas

Las plantas han desarrollado cuatro estrategias básicas para reducir el daño causado por los herbívoros. Una estrategia consiste en escapar o evitar a los fitófagos en el tiempo y en el espacio. Otra en tolerar el ataque, disuadiendo al herbívoro para que se alimente de partes no esenciales para la planta o desarrollando una gran capacidad de recuperación tras el ataque. Otra estrategia consiste en incentivar la presencia de enemigos naturales de sus herbívoros. Además, las plantas cuentan con

la estrategia de la confrontación, es decir, el uso de defensas mecánicas o químicas, que disuaden a los herbívoros o reducen su éxito biológico. Los mecanismos de defensa de confrontación de las coníferas pueden dividirse en **mecánicos**, como la presencia de espinas, pelos, escamas o tejidos impregnados con polímeros como la lignina o la suberina, que proporcionan una mayor resistencia a la penetración, degradación e ingestión por parte de los organismos invasores; y en **químicos**, que están basados en la producción, acumulación y liberación de sustancias repelentes o tóxicas como los terpenos, alcaloides y fenoles (Honkanen et al., 1999) (Figura 1.2). La producción de compuestos fenólicos y oleorresina, compuesta de numerosos terpenos, es el mecanismo de defensa más importante en pinos y otras coníferas contra insectos folívoros (Mumm & Hilker, 2006), y concretamente contra la procesionaria *Thaumetopoea pityocampa* Schiff., importante plaga en pinos de nuestro país. La combinación de ambos tipos de mecanismos, mecánicos y químicos, puede ayudar a las plantas a defenderse ante un rango amplio de organismos herbívoros, puesto que las defensas químicas suelen ser más efectivas contra herbívoros generalistas mientras que las mecánicas parecen proteger mejor a las plantas contra enemigos especializados (Koricheva et al., 2004).

Defensas químicas	Defensas mecánicas	Defensas constitutivas	Defensas inducidas
Sustancias repelentes o tóxicas	Resistencia a la penetración, degradación o ingestión de herbívoros	Presentes en todo momento en la planta	Sólo se invierte en ellas cuando se produce un daño o ataque
<div style="background-color: #add8e6; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">terpenos</div> <div style="background-color: #add8e6; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">fenoles</div> <div style="background-color: #add8e6; padding: 5px;">alcaloides</div>	<div style="background-color: #ffcc00; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">espinas</div> <div style="background-color: #ffcc00; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">pelos</div> <div style="background-color: #ffcc00; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">lignina</div> <div style="background-color: #ffcc00; padding: 5px;">suberina</div>	<div style="background-color: #90ee90; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">oleorresina</div> <div style="background-color: #90ee90; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">alcaloides</div> <div style="background-color: #90ee90; padding: 5px;">fenoles</div>	<div style="background-color: #d8bfd8; padding: 5px; margin-bottom: 10px;">Canales de resina traumáticos</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="text-align: center;">Respuesta a largo plazo</div> <div style="background-color: #d8bfd8; padding: 5px; margin-top: 10px;">Cambios en la concentración de compuestos fenólicos</div> <div style="text-align: center;">Respuesta a corto plazo</div>

Figura 1.3 Clasificación de los mecanismos de defensa de las coníferas

Estos mecanismos de defensa pueden ser clasificados, a su vez, en otros dos grupos: **constitutivos** e **inducidos** (Figura 1.2). Los primeros están siempre presentes en las plantas porque forman parte de su estructura física o química basal, mientras que los mecanismos inducidos son sintetizados o movilizados cuando se produce un daño o agresión. La composición y concentración de las defensas constitutivas varía ampliamente, moviéndose en un rango que va desde las simples barreras mecánicas hasta la síntesis de compuestos químicos secundarios que reducen la palatabilidad y/o digestibilidad, o que resultan tóxicos para los herbívoros. Entre los sistemas de defensa constitutivos más importantes en coníferas, y especialmente en la familia *Pinaceae*, se encuentra la producción de oleorresina, que está formada por una mezcla de ácidos resinosos y monoterpenos que se acumula en los canales resiníferos axiales del floema y del xilema (Phillips & Croteau, 1999). Existen, además, otros canales de tipo radial en el xilema que pueden contribuir al flujo

de resina cuando son conectados a los canales axiales del floema (Franceschi et al., 2005). Otro sistema de defensa constitutivo existente en las coníferas es la producción de fenoles en las acículas y el floema, que constituyen una barrera defensiva de gran importancia contra el ataque de insectos herbívoros y patógenos.

Las defensas inducidas son muy variables, pudiéndose diferenciar en respuestas rápidas, que ocurren durante el ataque, de modo que los depredadores sufren las consecuencias del cambio que ellos mismos provocan, o en respuestas a largo plazo, que se producen después del daño y tienen poco efecto o ninguno en los individuos que atacan, pero sirven para adquirir resistencia de cara al futuro (Karban & Myers, 1989). Entre las respuestas inducidas más importantes en coníferas se encuentra la formación de canales de resina traumáticos en el xilema, donde la resina posee una mayor concentración de ácidos resinosos y terpenos que la resina constitutiva, y la modificación en la concentración de sustancias repelentes como los fenoles (Franceschi et al., 2005). La respuesta inducida más rápida a corto plazo es la síntesis de compuestos fenólicos (Baraza et al., 2004), que no implica la generación de nuevas estructuras, al contrario que la resina, que precisa la producción de canales traumáticos para su conducción, lo cual conlleva un retraso temporal en la respuesta defensiva. 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 es necesario (Clausen et al., 1989), permitiendo una reacción antipatogénica casi inmediata. La síntesis de compuestos fenólicos inducidos puede consistir en aumentar la concentración de los compuestos fenólicos constitutivos, o puede que se produzcan compuestos fenólicos de estructura química diferente a los presentes de forma constitutiva (Ayres et al., 2000).

Las estructuras y compuestos químicos defensivos suponen un coste energético para la planta. Los recursos utilizados en los mecanismos defensivos dejan de estar disponibles para otras posibles utilidades, como la reproducción o el

crecimiento, por lo que la planta debe hacer un reparto óptimo de los recursos disponibles de manera que los adjudicados a los sistemas defensivos estén biológicamente justificados. Asimismo, estos recursos deben ser convenientemente repartidos entre los mecanismos de defensa constitutivos e inducidos. Una importante ventaja que presentan las defensas inducidas frente a las constitutivas es que el coste que éstas 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). La desventaja reside fundamentalmente en el retraso temporal frente a dicha necesidad, al contrario que ocurre en el caso de los mecanismos constitutivos, que resultan eficaces en el momento preciso porque están siempre presentes, pero que suponen un coste muy elevado que podría resultar en vano si nunca se llega a hacer uso de ellos. De todos modos, pueden existir factores que alteren la balanza de ventajas-desventajas entre las dos opciones, como la incidencia de la herbivoría o la fertilidad del suelo. Ambos mecanismos, constitutivos e inducidos, resultan complementarios y deben ser combinados adecuadamente para lograr un sistema defensivo eficiente.

1.3 Los compuestos fenólicos como elementos defensivos en coníferas

Los compuestos fenólicos son un grupo heterogéneo de productos formado por más de 8.000 compuestos cuya característica común es la de contener al menos un grupo fenol en su estructura molecular, es decir, un anillo aromático de 6 carbonos unido a un grupo hidroxilo. Estos compuestos pueden ser biosintetizados por la vía del ácido siquímico, como ocurre en la mayoría de las plantas superiores, o por la vía del ácido malónico. La síntesis de algunos fenoles complejos como los flavonoides precisa la combinación de ambas rutas metabólicas (Figura 1.3). Los compuestos fenólicos son producidos por células rayo especializadas y células parenquimáticas polifenólicas (Mumm & Hilker, 2006).

La clasificación de los compuestos fenólicos se realiza en función de la estructura de su esqueleto químico. Así, pueden distinguirse dos grandes grupos: fenoles simples (con un sólo anillo fenólico), y fenoles complejos. Éstos últimos se subdividen en ligninas (polímeros de fenoles simples), flavonoides (compuestos por dos anillos fenólicos unidos por una cadena de tres carbonos: antocianidinas, flavonoles e isoflavinas) y taninos (condensados e hidrosolubles) (Figura 1.4).

Algunos de estos compuestos son solubles en solventes orgánicos, otros en agua (taninos), y otros son polímeros muy grandes e insolubles (lignina y flavonoides).

Los compuestos fenólicos son productos secundarios del metabolismo de las plantas. Esto quiere decir que no tienen un papel directo en el metabolismo primario, relacionado con el crecimiento y la reproducción. Así, se les atribuye una variedad muy heterogénea de roles en las plantas, como: (I) actuar como filtros de radiación ultravioleta (flavonoides), (II) intervenir en la polinización y en la dispersión de semillas al contribuir en la coloración de flores y frutos (antocianidinas), (III) dar soporte mecánico a la planta (lignina), (IV) actuar como moléculas señalizadoras en la nodulación de las leguminosas (flavonoides), o (V) producir reacciones alelopáticas en plantas vecinas (fenoles simples, ácido salicílico) (Peters & Verma, 1990; Harbone, 1997). No obstante, en las coníferas la función más conocida de los fenoles, y especialmente de los taninos, es la de (VI) proteger a las plantas de la herbivoría actuando como sustancias repelentes o tóxicas (Feeny, 1976; Rhoades & Cates, 1976). Aunque el conocimiento del efecto de los compuestos fenólicos en insectos defoliadores del género *Pinus*, así como sus adaptaciones, es todavía limitado (Mumm & Hillker, 2006), los compuestos fenólicos están considerados como la mayor defensa en coníferas contra patógenos y herbívoros (Beckman, 2002; Franceschi et al., 2005).

El tipo y concentración de los compuestos fenólicos varía entre especies, individuos, órganos, tejidos y estadíos de desarrollo de la planta. Además de los parámetros genéticos, el ambiente ejerce también una importante influencia sobre la composición y concentración de los compuestos fenólicos (Waterman et al., 1989). Se

sabe que las hojas que reciben altas cantidades de radiación visible y ultravioleta sintetizan una mayor cantidad de fenoles que las que están en condiciones de sombra (Covelo & Gallardo, 2001). También la composición y cantidad de los nutrientes disponibles para la planta tiene una importante repercusión en el contenido fenólico, de modo que condiciones de estrés nutricional podrían alterar la distribución de los fotosintatos destinados al crecimiento en favor de las defensas (Kyto et al., 1999; Turtola et al., 2002). Algunas teorías que justifican la influencia de las condiciones nutricionales sobre la concentración de los metabolitos secundarios son la hipótesis del balance de carbono y nutrientes (Bryant et al., 1983), que postula que los niveles de fenoles en las plantas están determinados por el balance entre el carbono y la disponibilidad de nutrientes, o el modelo de competición de las proteínas (Jones & Hartley, 1999), que aboga por una competición entre la síntesis de fenoles y de proteínas por un precursor común, la fenilalanina. La fenilalanina es el intermediario principal de la síntesis de la mayoría de los fenoles (vía del ácido siquímico), mediante la acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL). La PAL puede ser regulada por factores ambientales como la luz o la disponibilidad de nutrientes, por lo que la concentración de los compuestos fenólicos también depende de estos factores (Karban & Myers, 1989).

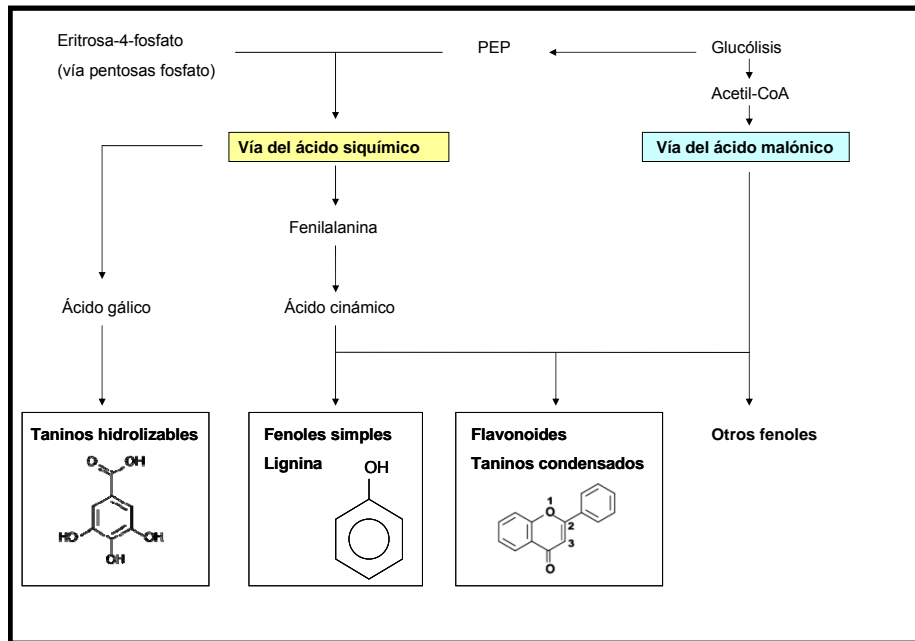
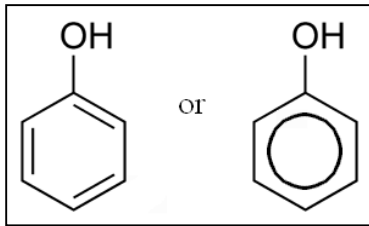


Figura 1.3 Rutas metabólicas de síntesis de los compuestos fenólicos.

Los cambios en la concentración de los compuestos fenólicos constituyen una de las primeras respuestas inducidas ante el ataque o el estrés provocado por la herbivoría (Baraza et al., 2004). 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.

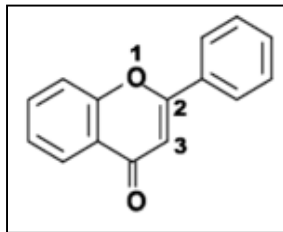
1. **Fenoles simples:** Compuestos de un sólo anillo fenólico.



2. **Fenoles complejos:**

2.1 **Ligninas:** Polímeros de fenoles simples.

2.2 **Flavonoides:** Compuestos de dos anillos fenólicos unidos por una cadena de tres carbonos.



Se subdividen en base al grado de degradación.

2.2.1) **Antocianinas**

2.2.2) **Flavonoles**

2.2.3) **Isoflavina**

2.3. **Taninos:**

2.3.1) **Taninos condensados:** Polímeros de flavonoides.

2.3.2) **Taninos solubles:** Derivados del ácido gálico. →

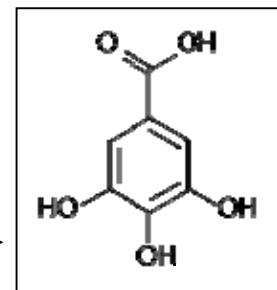


Figura 1.4 Clasificación de los compuestos fenólicos

1.4 El Metil Jasmonato como inductor de respuestas defensivas

A partir de la década de los años 90 comenzaron a esclarecerse los compuestos y las rutas metabólicas implicados en la respuesta y producción de mecanismos defensivos en las plantas, y en particular en coníferas (Franceschi et al., 2002; Erbilgin et al., 2006). Estas investigaciones permitieron descubrir que algunas sustancias implicadas en estos procesos metabólicos, como es el caso del ácido jasmónico, inducen cambios químicos y anatómicos en las plantas cuando se aplican exógenamente (Thaler et al., 2001) similares a los ocasionados por la herbivoría real, como la formación de canales resiníferos traumáticos, la acumulación y síntesis de monoterpenos y diterpenos, la inducción de actividades enzimáticas, o la formación de células parenquimáticas polifenólicas en la zona cambial (Erbilgin et al., 2006; Zeneli et al., 2006). A raíz de estos descubrimientos, aumentó paulatinamente el uso de un derivado del ácido jasmónico, el metil jasmonato (MeJa), como elicitador de respuestas defensivas en sustitución de insectos herbívoros, pues supone un importante ahorro de esfuerzo en la obtención, cultivo y mantenimiento de ejemplares vivos de estos herbívoros. Además, el uso de MeJa como inductor de respuestas defensivas permite controlar con mayor homogeneidad las condiciones de los ensayos.

Se han publicado multitud de artículos relacionados con esta fitohormona, aunque la mayoría hacen referencia a estudios realizados con plantas anuales y angiospermas. Todavía se ha investigado poco sobre este tema en coníferas, pero está demostrado que el tratamiento con MeJa induce resistencia en *Picea abies* a los hongos *Ceratocystis polonica* Siem. (Moreau) (Franceschi et al., 2002; Zeneli et al., 2006) y *Pythium ultimum* Trow (Kozlowski et al., 1999). Dentro del género *Pinus*, la aplicación de MeJa indujo resistencia a *Diplodia pinea* (Desm.) en *Pinus radiata* (Gould et al., 2008) y al coleóptero comedor de corteza *H. abietis* L. en *Pinus sylvestris* L. (Heijari et al., 2005). Gould et al. (2008) publicaron recientemente un estudio en el que encontraron que el MeJa, dos semanas después de su aplicación, indujo una mayor resistencia de *P. radiata* a *D. pinea*, así como una disminución de la tasa de

crecimiento. (Hotter, 1996) observó en otro estudio que el MeJa hacía aumentar en *P. radiata* la actividad de la PAL, enzima precursora de los compuestos fenólicos. Heijari et al. (2005) encontraron en una investigación realizada con individuos de *Pinus sylvestris* L. que los que fueron tratados con MeJa produjeron una mayor cantidad de canales resiníferos y metabolitos secundarios que las plantas en las que no se había aplicado el MeJa o en las que la cantidad aplicada fue inferior. También encontraron que el curculiónido *H. abietis* se alimentó menos de las plantas tratadas con MeJa, y que el crecimiento de éstas y la fotosíntesis disminuyó significativamente.

Respecto al empleo de MeJa en *P. pinaster*, existen dos trabajos de fin de carrera, realizados por Blanco (2007) y Costas (2007), cuyos resultados demuestran la eficacia del MeJa como agente capaz de estimular la producción de compuestos defensivos en esta especie, ya que se observó que la aplicación de MeJa mediante fumigación de la parte aérea aumentaba significativamente el contenido de resina en los tallos de los pinos en edad temprana (Blanco, 2007) y que el consumo de floema por parte de *H. abietis* en bioensayos realizados en laboratorio disminuía de forma significativa en las plantas tratadas con MeJa respecto al control (Costas, 2007).

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La producción de sustancias defensivas en coníferas viene determinada por factores de distinta naturaleza como el genotipo y las condiciones ambientales, entre las que se incluye la disponibilidad de nutrientes (Waterman et al., 1989; Herms & Mattson, 1992). Diversas hipótesis proponen que los factores ambientales podrían modificar las concentraciones de metabolitos secundarios, y algunos de estos modelos predicen que las respuestas de las plantas ante un incremento de fertilización podrían incluir una disminución en los compuestos basados en el carbono, necesarios para producir sustancias defensivas en las plantas. De esta manera, sería predecible que una mayor disponibilidad de nutrientes deficitarios en un determinado ambiente estuviese asociada a una menor inversión en el sistema defensivo constitutivo, pudiendo además modificar la capacidad de generar respuestas inducidas.

En este contexto, se plantea la necesidad de conocer el efecto que produce en la capacidad defensiva de los brinzales de *P. pinaster* la fertilización fosfórica de los suelos de los pinares gallegos, que parece tan necesaria para el correcto desarrollo del repoblado, puesto que el fósforo es un macronutriente deficitario en la Comunidad Autónoma. Además cabe preguntarse si existen individuos de *P. pinaster* genéticamente superiores a otros en relación a su capacidad defensiva que puedan ser utilizados en una eventual mejora genética de la resistencia. En particular, se plantean dos objetivos específicos en el presente estudio:

1. ¿Afecta la disponibilidad de nutrientes, en particular de fósforo (el nutriente limitante en los suelos gallegos) a las defensas constitutivas e inducidas en *P. pinaster*, medidas como concentración de fenoles totales en las acículas?
2. ¿Existe variación genética en los mecanismos de defensa constitutivos e inducidos en *P. pinaster*, medidos como concentración de fenoles totales en las acículas?

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal, condiciones de cultivo y tratamientos experimentales

Para responder a los objetivos de este trabajo, se realizó en febrero de 2006 un experimento en invernadero en el que se sometieron 33 familias de medios hermanos de *P. pinaster* procedentes de polinización abierta de árboles plus de primera generación del huerto semillero de Sergude, y un testigo comercial de material identificado de la costa gallega (TCOS) a cuatro niveles de fertilización fosfórica. Las plantas permanecieron ocho meses en invernadero en condiciones controladas de temperatura, humedad y luminosidad, dispuestas sobre mesas de cultivo en macetas de polietileno de 2 L rellenas con perlita y cubiertas con una capa de arena estéril. La aplicación de los tratamientos de fertilización comenzó dos semanas después de la siembra y se realizó mediante subirrigación de las mesas de cultivo cada 3-5 días. La solución básica de fertilizante contenía 100 mg N L⁻¹, con el resto de nutrientes en las siguientes proporciones en peso 100 N: 70 K: 7 Ca: 9 Mg: 9 S. La solución se suplementó con las cantidades traza necesarias de micronutrientes. Las cantidades correspondientes a cada tratamiento de fósforo fueron de 20, 10, 5 y 2 mg L⁻¹ de P-PO₄, según el nivel de fertilización asignado. El tratamiento de 20 mg L⁻¹ conformó una nutrición equilibrada, y el de 2 mg L⁻¹ supuso una deficiencia fuerte de fósforo, en concordancia con la disponibilidad de fósforo asimilable en suelos forestales gallegos. El resto de los nutrientes se mantuvo en concentración equilibrada.

Dos meses antes de cosechar las plantas se aplicaron dos tratamientos de MeJa: uno para estimular la producción de defensas inducidas, consistente en la pulverización a lo largo de toda la planta de MeJa 22 mM con el dispersante Tween 20 al 0.1% v/v, y un control, consistente en una solución de agua y Tween 20 al 0.1% v/v aplicada igualmente por pulverización a lo largo de toda la planta.

3.2 Diseño experimental

El diseño experimental del ensayo fue un *split-split* replicado en cuatro bloques (cuatro mesas de cultivo). Cada bloque se dividió en cuatro whole-plots, correspondientes a los cuatro tratamientos de fertilización fosfórica, y cada whole-plot estaba subdividido en dos bloques *split* (control y MeJa) cada uno con una planta de cada familia dispuesta al azar.

El número total de plantas en el ensayo fue de:

4 bloques x 4 tratamientos de fertilización x 2 tratamientos de MeJa x 34 familias = 1088 plantas.

Con el fin de responder a los objetivos específicos planteados, este dispositivo experimental se dividió en dos subensayos, llamados *MeJa x G* y *MeJa x P*.

El subensayo *MeJa x P* se planteó para tratar de dar respuesta al primer objetivo, es decir, para determinar la influencia de la disponibilidad de nutrientes en la capacidad defensiva de las plantas. Para ello se analizaron 6 de las 34 familias en los cuatro tratamientos de fertilización (Figura 3.1). Estas 6 familias (1030, 1056, 1059, 2042, 2043, 2064) fueron seleccionadas en función de un gradiente de resistencia a *H. abietis* en ensayos previos de campo, escogiéndose 3 familias que resultaron resistentes al ataque y 3 sensibles. En este subensayo *MeJa x P* el número de plantas resultó ser de:

4 bloques x 4 tratamientos x 2 tratamientos de MeJa x 6 familias = 192 plantas.

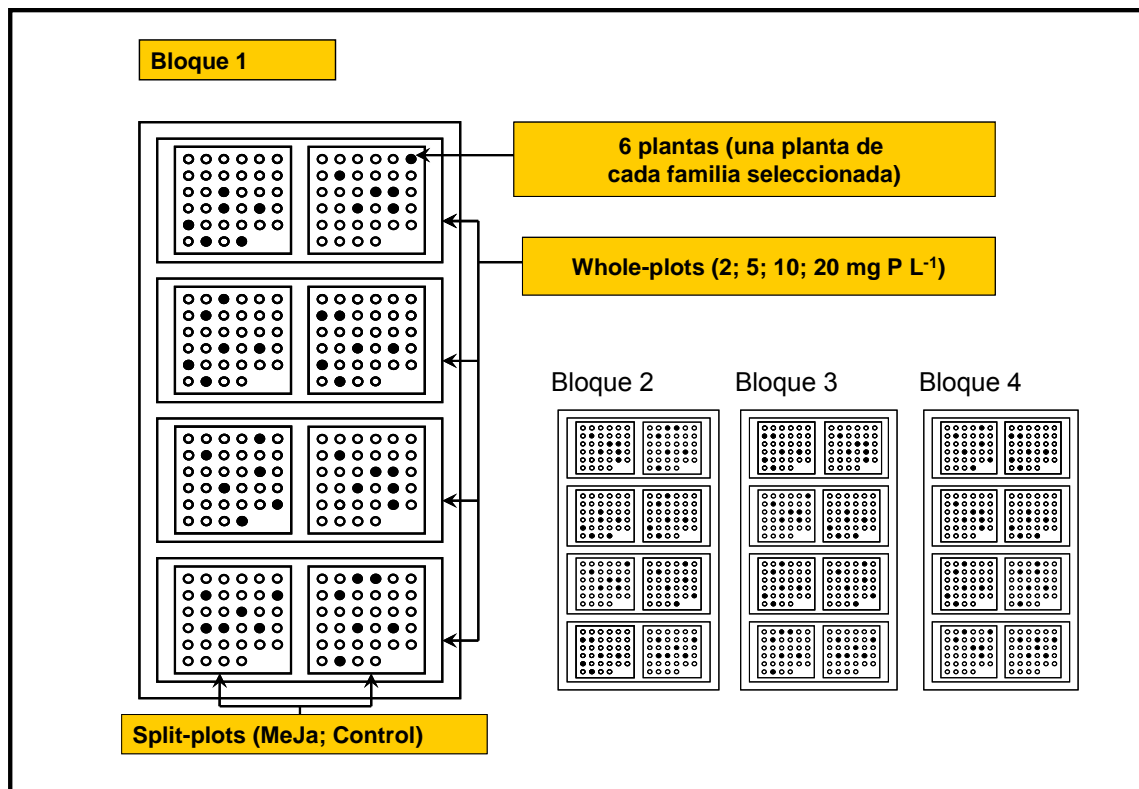


Figura 3.1 Diseño experimental en forma de split-split replicado en cuatro bloques del subensayo *MeJa* x *P*. N = 192 plantas.

El subensayo *MeJa* x *G* fue diseñado para estudiar la influencia del genotipo en los mecanismos defensivos, es decir, para tratar de responder al segundo objetivo. Para ello se analizaron las muestras recogidas de las 34 familias sometidas a los tratamientos de fertilización extremos (2 y 20 mg P L⁻¹) (Figura 3.2).

De este modo, el número de plantas correspondiente al subensayo *MeJa* x *G* fue de:

4 bloques x 2 tratamientos de fertilización x 2 tratamientos de *MeJa* x 34 familias = 544 plantas.

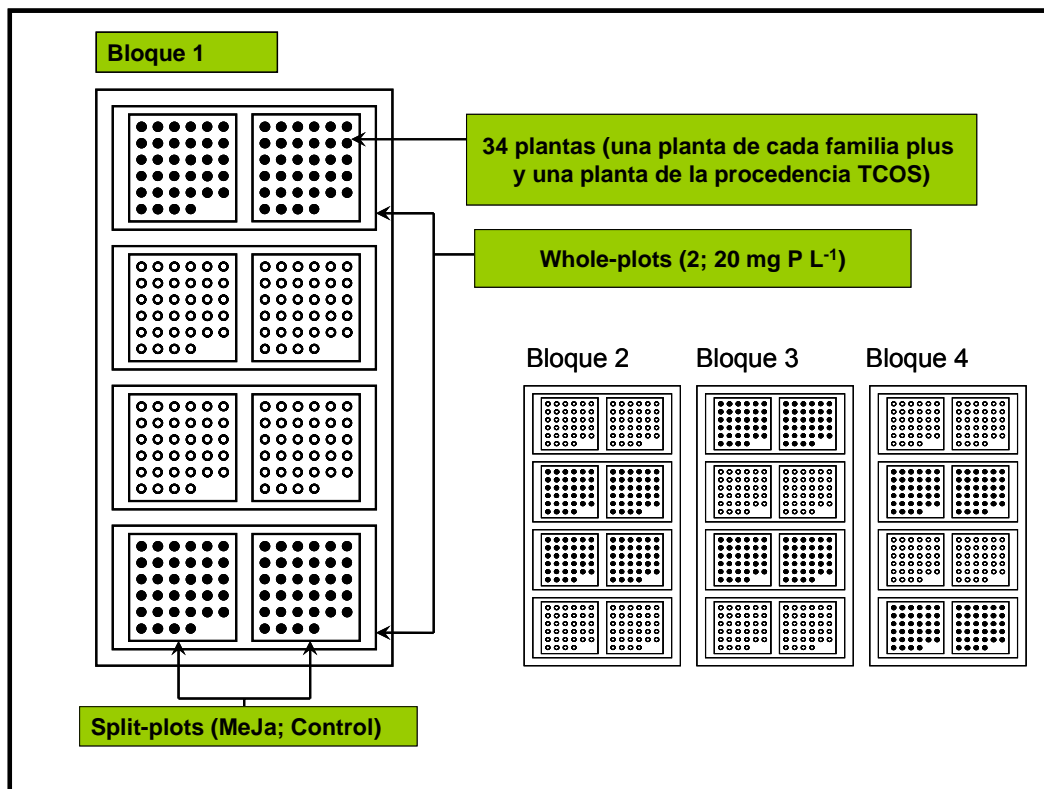


Figura 3.2 Diseño experimental en forma de split-split replicado en cuatro bloques del subensayo *MeJa* x *G*. N = 544 plantas.

3.3 Muestreo y preparación de las muestras

Las plantas se cosecharon a los 8 meses de edad, en septiembre de 2006, dos meses después de realizar la aplicación de *MeJa*. Para el análisis de los fenoles totales, se tomó una alícuota de 2-3 gramos (peso fresco) de acículas juveniles representativa de la generalidad de cada planta, se etiquetó y se secó a 40° C en estufa de aire forzado durante 48 h. Estas muestras se conservaron, después, dentro de bolsas plásticas cerradas.

Previamente a realizar el análisis, todas las muestras fueron sometidas a molienda manual en mortero con ayuda de nitrógeno líquido hasta reducirlas a un polvo fino y homogéneo.

3.4 Análisis químicos

Para evaluar la capacidad de desarrollo de las defensas constitutivas e inducidas de *P. pinaster* se cuantificó el contenido de fenoles totales por unidad de peso seco de las acículas (mg de fenoles g⁻¹ peso seco de las acículas) siguiendo el método propuesto por Baraza et al. (2004) basado en el método del reactivo Folin-Cicalteau (Makar, 2000). Para ello se realizó primeramente la extracción de los fenoles totales con metanol 50% y, a continuación, se cuantificó su contenido mediante valoración colorimétrica en microplacas (Figura 3.3).

Para realizar la extracción de las muestras se añadieron 10 mL de metanol 50% a una alícuota de 0,5 g de acículas molidas de cada muestra, se agitó la mezcla, se sometió durante 15 minutos a un baño de ultrasonidos y, a continuación, a 15 minutos de ultracentrifuga a 2500 rpm. Tras este proceso se obtuvo un extracto de los polifenoles totales en metanol y una fase sólida decantada que se desechó. Para la correcta valoración de la concentración de fenoles en el género *Pinus* se debe diluir este extracto hasta obtener una relación de extracción de entre 1-1,5 mg de acículas molidas (peso seco) mL⁻¹ de agente extractor (metanol). Este proceso se realizó para cada muestra en dos pasos, con ayuda de un diluidor automático. Primero se diluyeron 0,4 mL de extracto en 9,6 mL de agua destilada, con lo que se obtuvo una primera disolución de 2 mg mL⁻¹; de ahí se tomaron 2 mL y se mezclaron con 1 mL de agua destilada, lo que dio lugar a la disolución de concentración deseada.

Una vez preparadas las muestras, se realizó una valoración colorimétrica en microplacas para cuantificar la concentración de fenoles totales. Para ello se prepararon 6 patrones de concentraciones conocidas de ácido tánico partiendo de una disolución madre de 20 mg mL⁻¹, que se obtuvo diluyendo 0,5 g de ácido tánico en 25 mL de agua destilada. Cinco de los seis patrones se prepararon diluyendo la disolución estándar de 20 mg mL⁻¹ hasta 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 y 3,9063 µg mL⁻¹. El sexto patrón fue agua destilada (0 mg g⁻¹). Llegados a este punto, los patrones de ácido tánico y las muestras de extracto estaban listos para ser pipeteados en las

microplacas. En cada microplaca se depositaron 200 μL de cada patrón replicado 6 veces y 200 μL de 19 muestras replicada cada una 3 veces. A continuación se añadió a cada uno de los pocillos 20 μL de reactivo Folin-Ciocalteu y, tras 1-8 minutos, 40 μL de Na_2CO_3 20%, de modo que todos los pocillos contuvieran un volumen final de 260 μL . Después se esperaba un periodo de entre 2-2,5 h de incubación, tiempo durante el que la mezcla iba adquiriendo un color azul con una oscuridad proporcional a la concentración de fenoles presente en la muestra. Transcurrido ese tiempo, se procedía a la lectura de la absorbancia en un lector de microplacas con un filtro de 740 nm.

Conocida la concentración de los 6 patrones y una vez determinada su absorbancia, se pudo deducir la ecuación que relaciona ambas variables mediante una regresión lineal de la recta de los patrones para cada microplaca. Una vez conocidas las ecuaciones de las rectas de los patrones se pudo calcular la concentración expresada en mg equivalentes de ácido tánico de cada muestra, en función de la absorbancia obtenida con el espectrofotómetro.

La ecuación de la recta es: $y = a * x + b$

donde y es la absorbancia y x la concentración de fenoles totales medidos como mg equivalentes de ácido tánico. a y b son parámetros deducidos para cada recta.

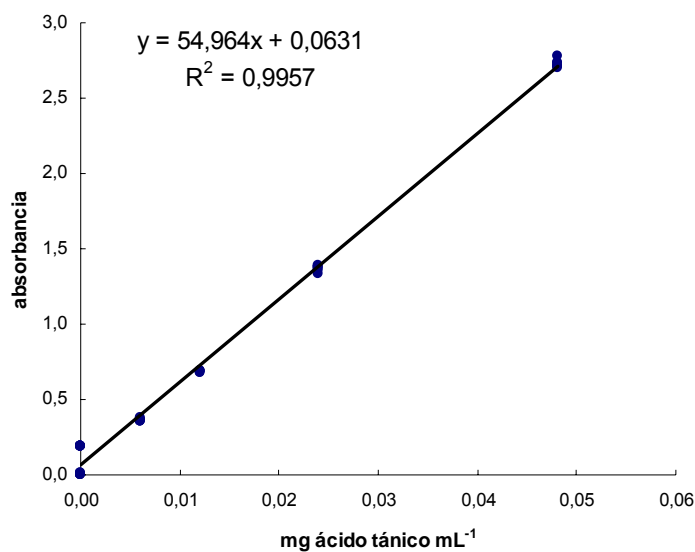


Figura 3.2 Ejemplo de recta patrón de una microplaca. Muestra la relación entre la absorbancia registrada por el espectrofotómetro a 740 nm y la concentración de ácido tánico.

No obstante, las concentraciones obtenidas con este cálculo no pertenecen a los 200 μL de las muestras de los extractos, sino a los 260 μL de muestra y reactivos presentes en el pocillo. Para determinar la concentración correspondiente únicamente a las muestras se empleó la relación $C * V = C' * V'$

Donde C es la concentración en el pocillo (mg mL^{-1}), V es el volumen en el pocillo (260 μL), C' es 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 obtuvo con esta misma fórmula tras corregir los dos pasos de dilución realizados tras la extracción.

Finalmente, para el cálculo de los mg equivalentes de ácido tánico por cada gramo de muestra de acícula seca, se realizó la siguiente operación:

$$C' * 10 \text{ mL}_{\text{CH}_3\text{OH}} / 0,5 \text{ g}_{\text{muestra seca}}$$

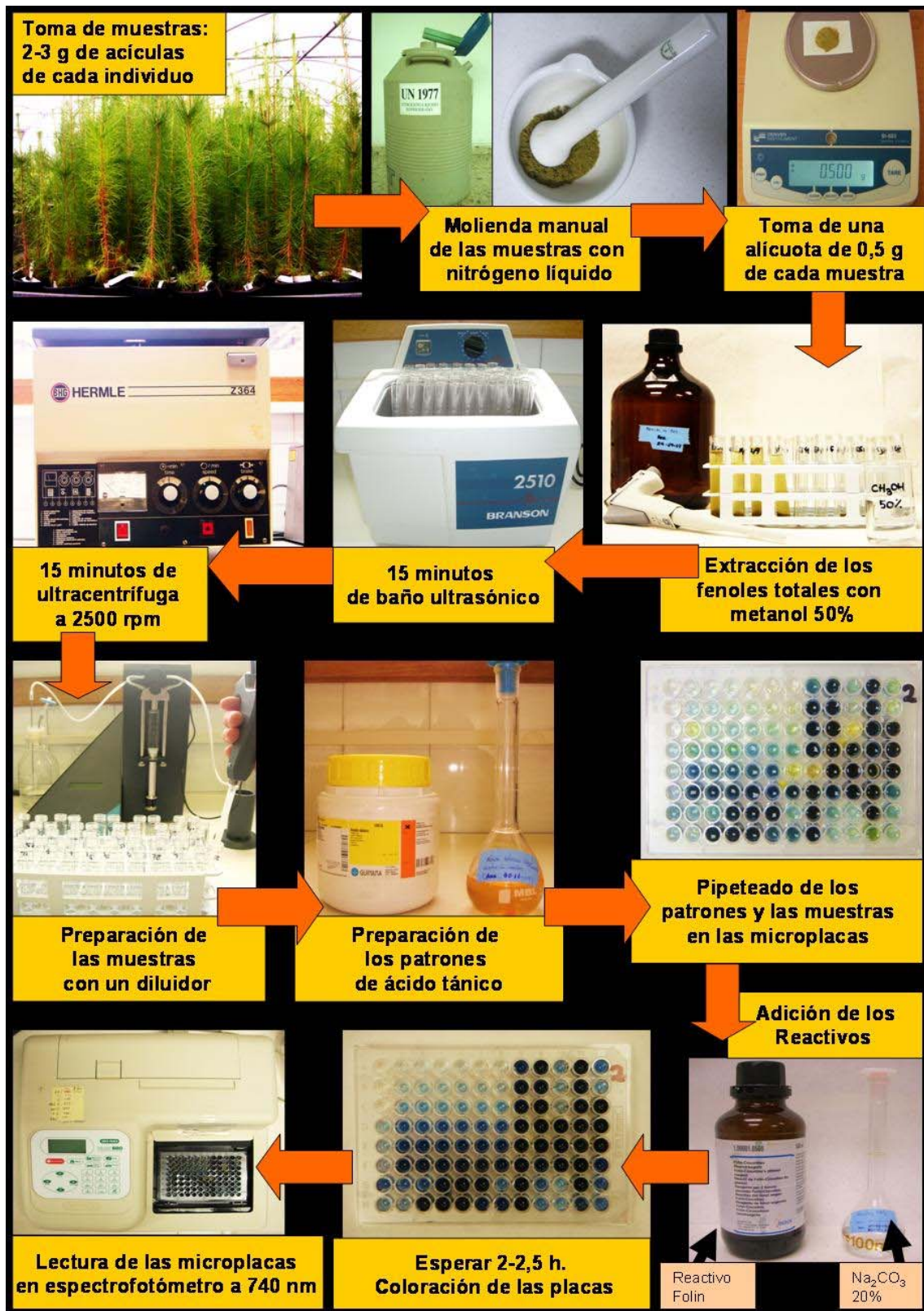


Figura 3.3 Procedimiento operativo del análisis químico realizado para cuantificar el contenido de fenoles totales en acículas de juveniles de *P. pinaster*.

3.5 Análisis estadístico

La evaluación del efecto de los factores de estudio (disponibilidad de fósforo, genotipo y estimulación con MeJa) sobre la expresión de defensas en las plantas se realizó utilizando como variable de medida el contenido de fenoles totales (mg g^{-1} peso seco). El tamaño muestral fue de 544 plantas en el caso del subexperimento MeJa x G y de 192 en el MeJa x P.

El análisis realizado para identificar los efectos consistió en un modelo de análisis de varianza acorde con el diseño split-split, empleando el procedimiento PROC-MIXED del programa SAS System (SAS Institute, 1999) de acuerdo con el modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + P_j + MJ_k + P*MJ_{jk} + G_l + B*P_{ij} + P*G_{jl} + MJ*G_{kl} + B*P*MJ_{ijk} + P*MJ*G_{jkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde μ es la media general, B es el efecto del bloque, P es el efecto del tratamiento de fertilización fosfórica, MJ es el efecto del tratamiento con metil jasmonato, G es el efecto del genotipo (familia), $B*P$ es la interacción entre el bloque y el tratamiento de fertilización fosfórica, $P*MJ$ es la interacción entre los tratamientos de fósforo y MeJa, $P*G$ es la interacción del tratamiento de fósforo con el genotipo, $B*P*MJ$ es la interacción del bloque con los tratamientos (fósforo y MeJa), $P*MJ*G$ es la interacción de los tratamientos (fósforo y MeJa) con el genotipo y ε es el error aleatorio.

El modelo es mixto, pues $B*P_{ij}$ y $B*P*MJ_{ijk}$ son factores aleatorios, como es preceptivo para la resolución del *split-split*.

En los casos en que los efectos principales o las interacciones resultaron significativos, las diferencias entre las medias de los tratamientos fueron examinadas empleando el comando LSMEAN del PROC-MIXED (SAS Institute, 1999). Los términos se mostraron como *media \pm error estándar de la media*. Para realizar los análisis se comprobó que se cumplieren los requisitos del ANOVA, con la homogeneidad de varianzas, normalidad de los residuos e independencia de las observaciones.

4. RESULTADOS

En las tablas 4.1 y 4.2 se muestran los resultados del análisis estadístico de las mediciones realizadas según los factores de diseño en los subensayos *MeJa x P* y *MeJa x G*, respectivamente. En ellas se pueden observar los grados de libertad del numerador (GL Num), los grados de libertad del error en el denominador (GL Denom), el valor del estadístico F y la probabilidad (p) de aceptar la hipótesis nula para el correspondiente valor de F y sus grados de libertad para cada uno de los efectos.

Resultó estadísticamente significativo el efecto de la disponibilidad de fósforo tanto en el subensayo *MeJa x P* como en el *MeJa x G*. También el efecto del tratamiento con MeJa resultó significativo en el subensayo *MeJa x G*. Sin embargo, este efecto no se identificó en el subensayo *MeJa x P*, probablemente debido a que el tamaño muestral fue menor. En cualquier caso, el nivel de probabilidad asociado al factor *MJ* ($p = 0,075$) en este subensayo indicó una significación marginal de este factor ($p < 0,10$). El efecto de la pertenencia a una u otra familia no resultó significativo en ninguno de los dos subensayos. Finalmente, de todas las interacciones sólo la de los tratamientos de fertilización fosfórica con los tratamientos de MeJa resultó significativa en el subensayo *MeJa x G*.

Tabla 4.1 Resumen de los resultados del análisis de varianza según el modelo mixto para el contenido de fenoles totales en acículas de brinzales de familias de medios hermanos de *P. pinaster* del subensayo *MeJa x P*, sometidos a diferentes tratamientos de fertilización fosfórica y de metil jasmonato.

Efecto	GL Num	GL Denom	F	p
Bloque (B)	3	9	1,68	0,240
Fertilización fosfórica (P)	3	9	13,75	0,001
Metil Jasmonato (MJ)	1	12	3,80	0,075
P*MJ	3	12	1,54	0,254
Familia (G)	5	116	0,82	0,539
P*G	15	116	0,92	0,547
MJ*G	5	116	0,81	0,548
P*MJ*G	15	116	0,89	0,575

Tabla 4.2 Resumen de los resultados del análisis de varianza en el subensayo *MeJa x G* según el modelo mixto para el contenido de fenoles totales en acículas de brinzales de *P. pinaster* sometidos a diferentes tratamientos de fertilización fosfórica y de metil jasmonato.

Efecto	GL Num	GL Denom	F	P
Bloque (B)	3	3	5,00	0,110
Fertilización fosfórica (P)	1	3	152,11	0,001
Metil Jasmonato (MJ)	1	6	19,92	0,004
P*MJ	1	6	8,18	0,029
Familia (G)	33	391	1,23	0,182
P*G	33	391	0,76	0,833
MJ*G	33	391	1,00	0,477
P*MJ*G	33	391	1,03	0,421

La disponibilidad de fósforo en las plantas, manipulada experimentalmente, afectó de manera significativa al contenido de fenoles totales en las acículas de los pinos, de manera que, en el subensayo *MeJa x G*, las plantas fertilizadas con la dosis más baja de fósforo (2 mg P L⁻¹), diseñada para generar una deficiencia de este nutriente, presentaron un contenido de polifenoles un 75 % mayor que las plantas fertilizadas con la dosis más elevada (20 mg P L⁻¹) (Figura 4.1). Lo mismo ocurre en los tratamientos extremos (2 y 20 mg P L⁻¹) del subensayo *MeJa x P* (Figura 4.2), con valores absolutos equivalentes a los del *MeJa x G*. La aplicación adicional de dos niveles intermedios de fertilización (5 y 10 mg P L⁻¹) en el subensayo *MeJa x P* permitió estudiar la evolución de la producción de fenoles totales en función de la disponibilidad de fósforo, observándose que no existen diferencias significativas entre

los tres tratamientos de mayores dosis de fósforo (5, 10, 20 mg P L⁻¹), mientras que en el tratamiento de fósforo deficitario (2 mg P L⁻¹) el contenido de polifenoles supera en un 40 % al de los demás tratamientos (5, 10 y 20 mg P L⁻¹).

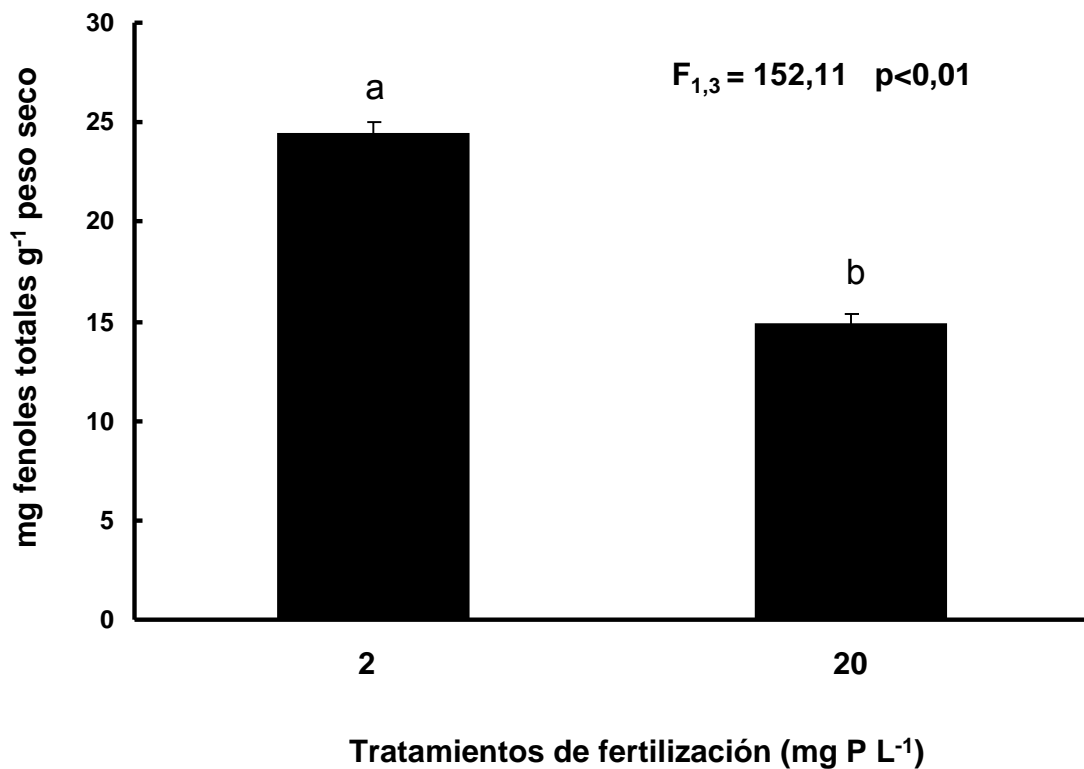


Figura 4.1 Contenido de fenoles totales (mg g⁻¹) en las acículas de brinzales de *P. pinaster* sometidos a dos tratamientos de fertilización (subensayo *MeJa* x *G*) con diferente aporte de fósforo. Los datos mostrados son las lsmeans ± s.e.m. N = 272.

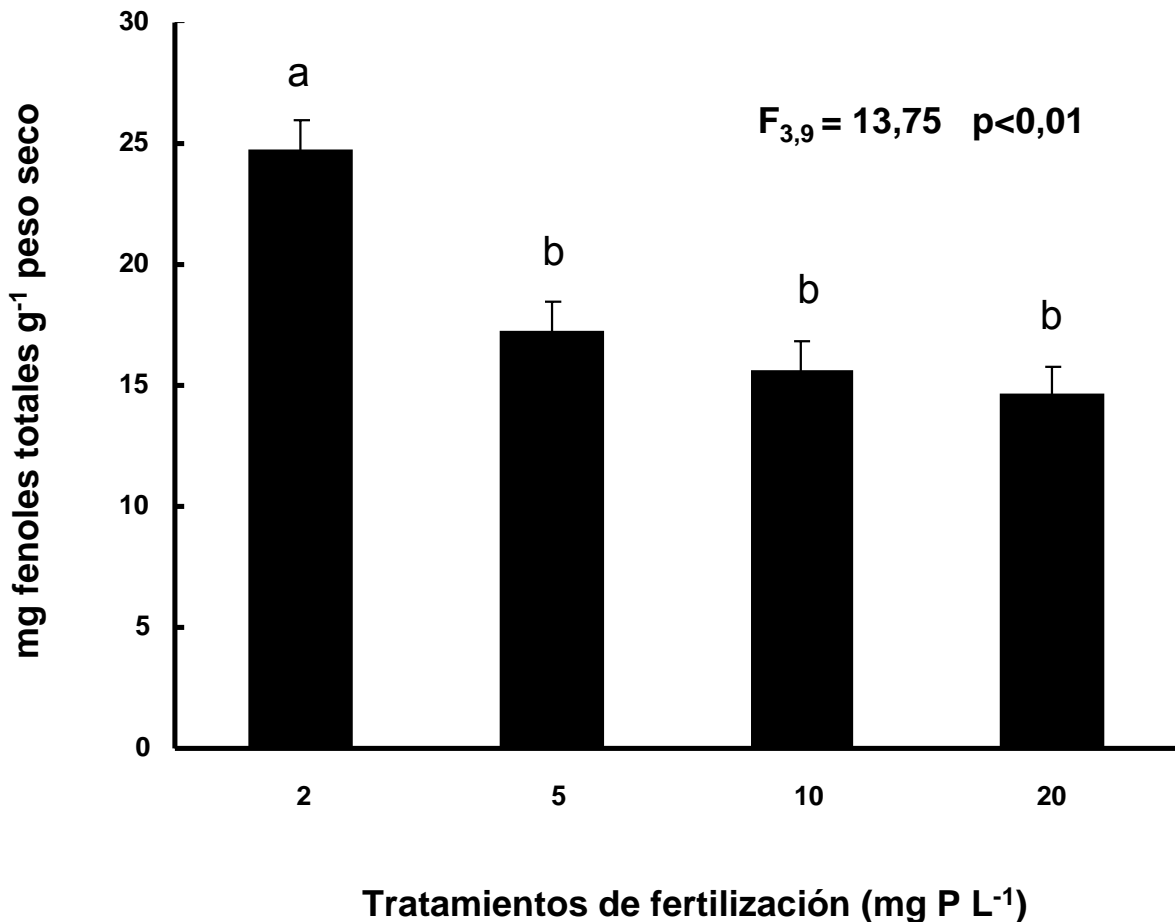


Figura 4.2 Contenido de fenoles totales (mg g⁻¹) en las acículas de brinzales de *P. pinaster* sometidos a cuatro tratamientos de fertilización con diferente aporte fosfórico (2, 5, 10 y 20 mg P L⁻¹) (subensayo *MeJa x P*). Los datos mostrados son las *lsmeans* ± s.e.m. N = 48.

La aplicación exógena de MeJa sobre los juveniles de *P. pinaster* provocó un aumento significativo del contenido de fenoles totales en las acículas en relación con las plantas control, como se puede observar en la Figura 4.3 (subensayo *MeJa x G*). Sin embargo, en el subensayo *MeJa x P*, a pesar de que el MeJa elicó la producción de polifenoles en las plantas que recibieron este tratamiento, el efecto no fue estadísticamente significativo, probablemente debido a que el tamaño muestral fue insuficiente para detectar diferencias significativas (Figura 4.4).

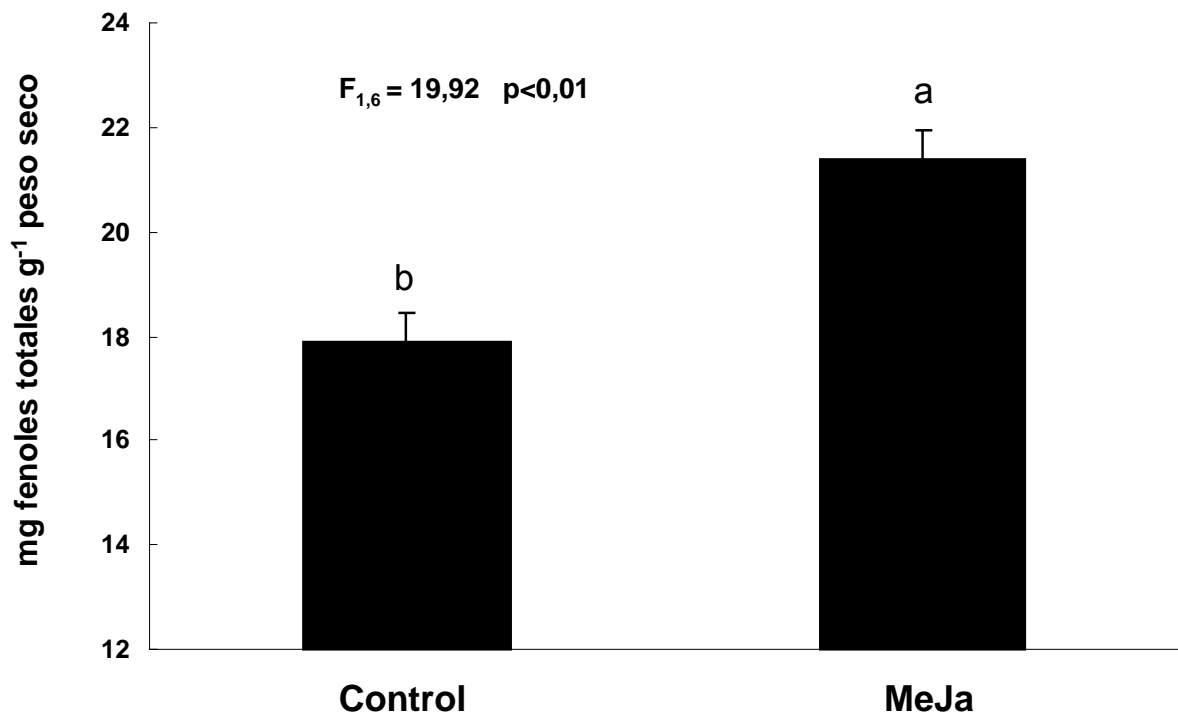


Figura 4.3 Contenido de fenoles totales (mg g⁻¹) en las acículas de brinzales de *P. pinaster* en dos tratamientos de MeJa (control y MeJa 22mM) (subensayo *MeJa* x *G*).

Los datos se muestran como $\text{lsmeans} \pm \text{s.e.m.}$; N = 272.

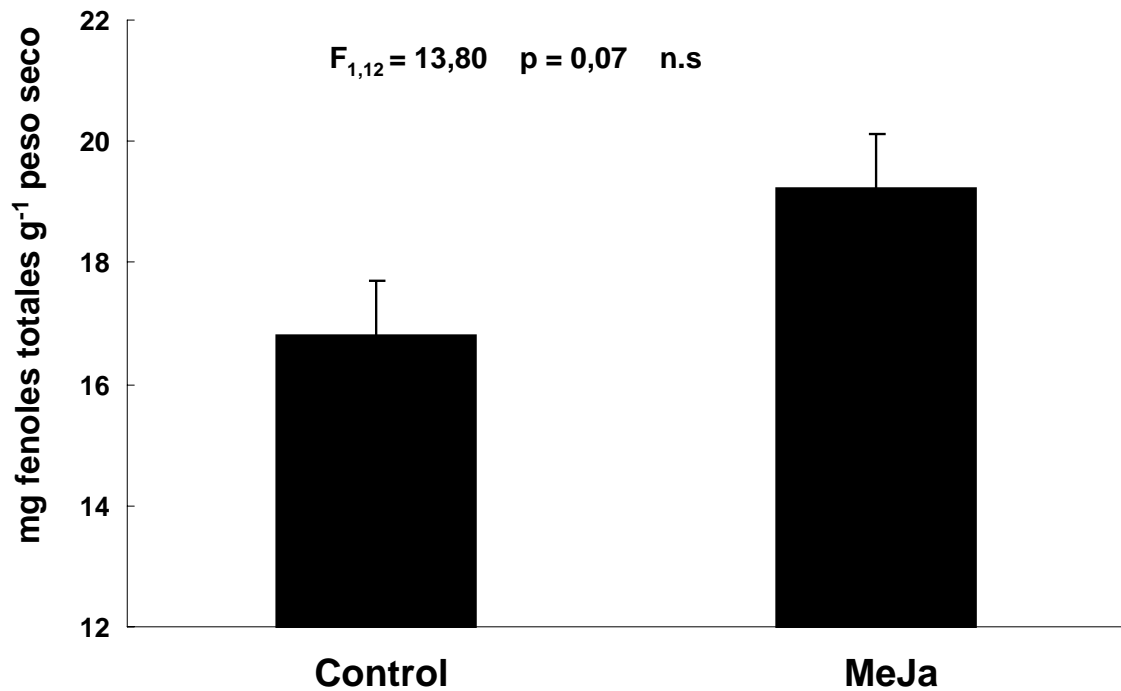


Figura 4.4 Contenido de fenoles totales (mg g⁻¹) en las acículas de brinzales de *P. pinaster* en plantas control y en plantas con las defensas inducidas por la aplicación de MeJa (control y MeJa 22 mM) (subensayo *MeJa* x *P*). Los datos se muestran como lsmeans ± s.e.m.; N = 96.

En las figuras 4.5 y 4.6 se presenta la interacción entre el efecto de la disponibilidad de fósforo y de la inducción de defensas con MeJa en el contenido de polifenoles en las acículas de los pinos de los subensayos *MeJa* x *P* y *MeJa* x *G*, respectivamente. Esta interacción resultó significativa en el caso del subensayo *MeJa* x *G*, pero no en el del *MeJa* x *P*.

Se puede observar en ambas figuras que las plantas del tratamiento con la dosis más baja de fósforo (2 mg P L⁻¹) sintetizaron más cantidad de compuestos fenólicos que las de los demás tratamientos (5, 10 ó 20 mg P L⁻¹), tanto si se comparan las del tratamiento con MeJa como las del control. Sin embargo, el aumento de la producción de fenoles totales como consecuencia de la aplicación de MeJa no

fue similar en los distintos tratamientos de fósforo. En el subensayo *MeJa x G*, donde el efecto de la interacción entre el tratamiento de fósforo y el de MeJa es significativa (Figura 4.5), las plantas fertilizadas con la dosis más baja de fósforo (2 mg P L^{-1}) presentaron una gran diferencia en la concentración de polifenoles tras la inducción con MeJa respecto del control, mientras que en el caso de la fertilización equilibrada (20 mg P L^{-1}) el efecto del MeJa no difiere mucho del control. En el subensayo *MeJa x P* se observa este mismo comportamiento (Figura 4.6), aunque la interacción no es significativa. En el tratamiento de fertilización más bajo (2 mg P L^{-1}) de este subensayo se aprecia claramente la diferencia en el contenido de polifenoles según el tratamiento de MeJa aplicado, mientras que en el resto de tratamientos ($5, 10 \text{ y } 20 \text{ mg P L}^{-1}$) la concentración de fenoles totales encontrada en las plantas sometidas al tratamiento con MeJa es similar a la de las plantas control.

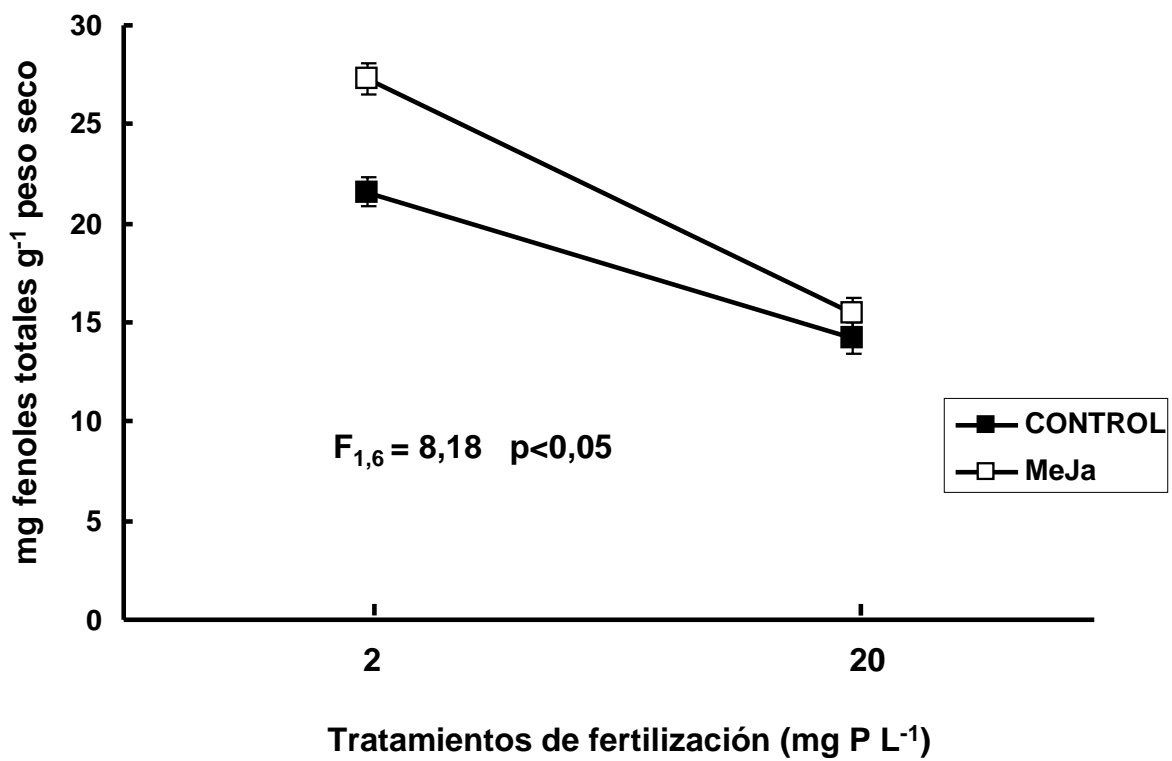


Figura 4.5 Contenido de fenoles totales (mg g^{-1}) en brinsales de *P. pinaster* bajo dos tratamientos de MeJa (Control y MeJa 22mM) en dos niveles de fertilización fosfórica (2 y 20 mg P g^{-1}) (subensayo *MeJa* x *G*). Los datos se muestran como $\text{lsmeans} \pm \text{s.e.m.}$ $N = 136$.

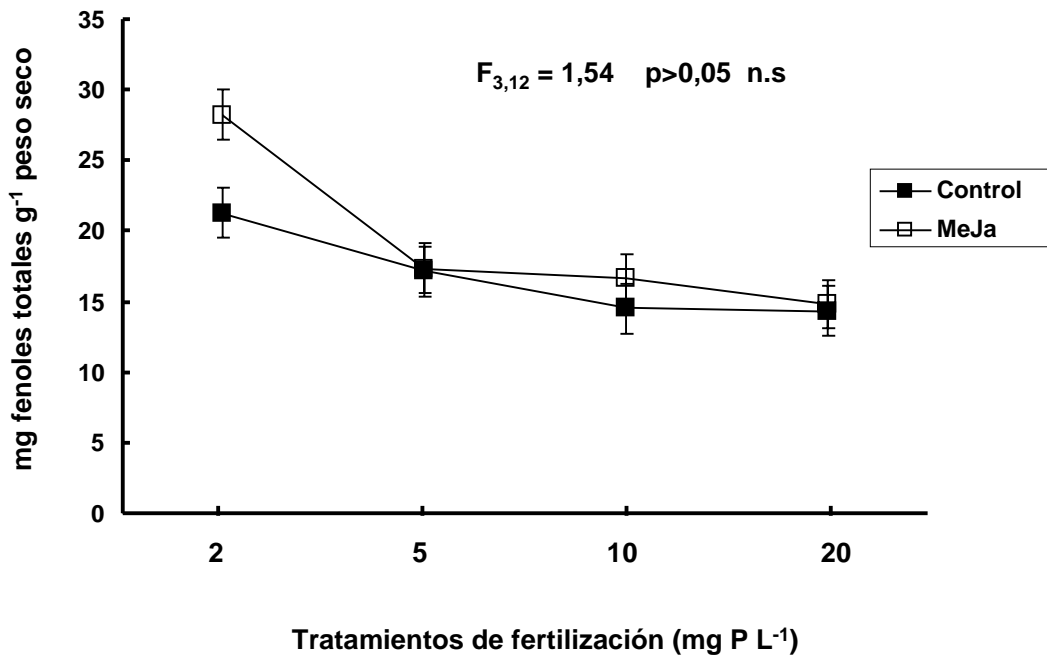


Figura 4.6 Contenido de fenoles totales (mg g⁻¹) en brinzales de *P. pinaster* bajo dos tratamientos de MeJa (Control y MeJa 22mM) en cuatro niveles de fertilización fosfórica (2, 5, 10 y 20 mg P g⁻¹) (subensayo *MeJa* x *P*). Los datos se muestran como lsmeans ± s.e.m. N = 24.

A juzgar por la variación observada en el contenido de fenoles totales entre las diferentes familias, podría parecer que existen diferencias significativas entre los distintos genotipos (Figura 4.7). No obstante, los elevados errores estándar de las medias familiares hacen que estas diferencias no resulten estadísticamente significativas. El testigo comercial, TCOS, procedente de semilla no mejorada de la zona costera de Galicia, tampoco presenta ninguna diferencia significativa en el contenido de compuestos fenólicos con respecto a las familias procedentes de árboles plus, ocupando una situación intermedia.

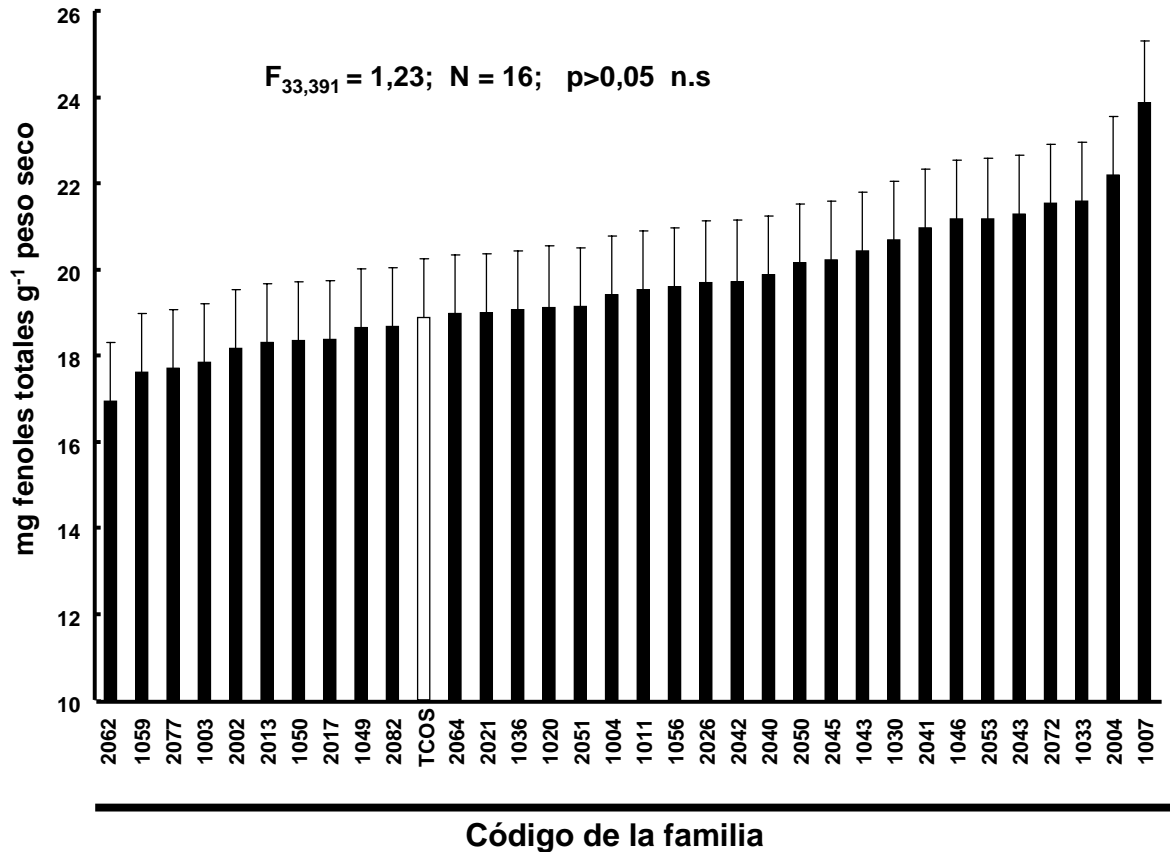


Figura 4.7 Contenido de fenoles totales (mg g⁻¹) en brinzales de *P. pinaster* pertenecientes a 33 familias de polinización abierta de la población de Galicia-Costa (barras negras) y un testigo comercial de la zona costera, TCOS (barra blanca), (subensayo *MeJa* x *G*). Los datos se muestran como $\text{lsmeans} \pm \text{s.e.m.}$ N = 16.

Si se analiza por separado el efecto de la interacción del genotipo con cada tratamiento de *MeJa* aplicado (control y *MeJa* 22 mM), se observa que tampoco existen diferencias significativas (Figura 4.8). A pesar de ello, puede apreciarse que ambos tratamientos de *MeJa* presentan tendencias opuestas según el genotipo, es decir, que las familias que producen menos fenoles bajo el tratamiento control sintetizan más en el tratamiento con *MeJa* 22 mM, mientras que las que produjeron más fenoles bajo el control presentaron menor capacidad de inducción.

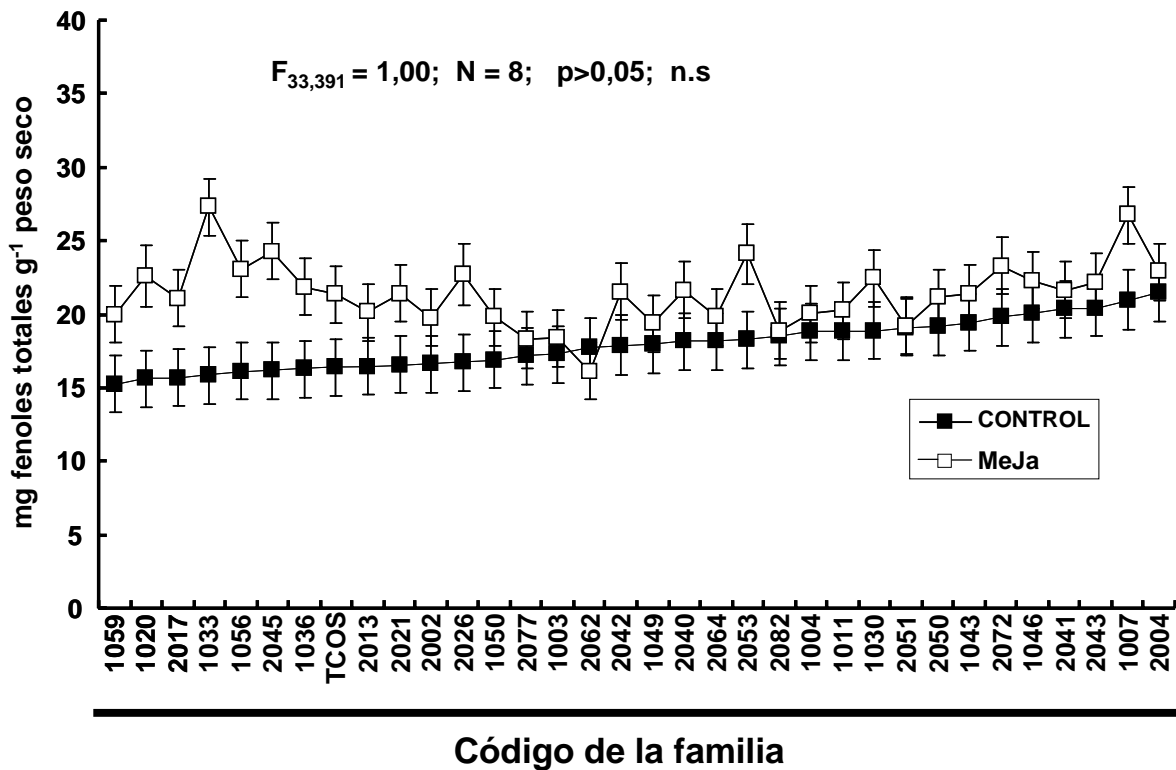


Figura 4.8 Contenido de fenoles foliares totales (mg g⁻¹) en los brinzales de las diferentes familias de *P. pinaster* analizadas (33 familias de polinización abierta de la población de Galicia-Costa y un testigo comercial de la zona costera, TCOS) en función del tratamiento de MeJa aplicado (tratamiento control, cuadros negros; MeJa 22 mM, cuadros blancos), (subensayo *MeJa* x *G*). Los datos se muestran como *lsmeans* ± s.e.m. N = 8. Las familias han sido ordenadas según el contenido de fenoles totales en el tratamiento control.

En la Figura 4.9 se representa la relación entre el contenido de fenoles totales en las plantas control (eje x) y la diferencia de contenido de polifenoles en las plantas tratadas con MeJa respecto de las control (eje y) a nivel familiar.

La primera variable (contenido de fenoles totales en las plantas sometidas al tratamiento control) refleja la cantidad de fenoles constitutivos que posee cada familia, mientras que la segunda cuantifica los fenoles sintetizados de manera inducida, tras la elicitación con MeJa.

La relación observada, aunque no muy estrecha ($R^2 = 0,28$), es significativa y negativa, y muestra que las familias con mayor cantidad de fenoles constitutivos produjeron pocos de manera inducida, mientras que aquellas que disponen de pocos fenoles de manera basal mostraron una capacidad mayor de inducción.

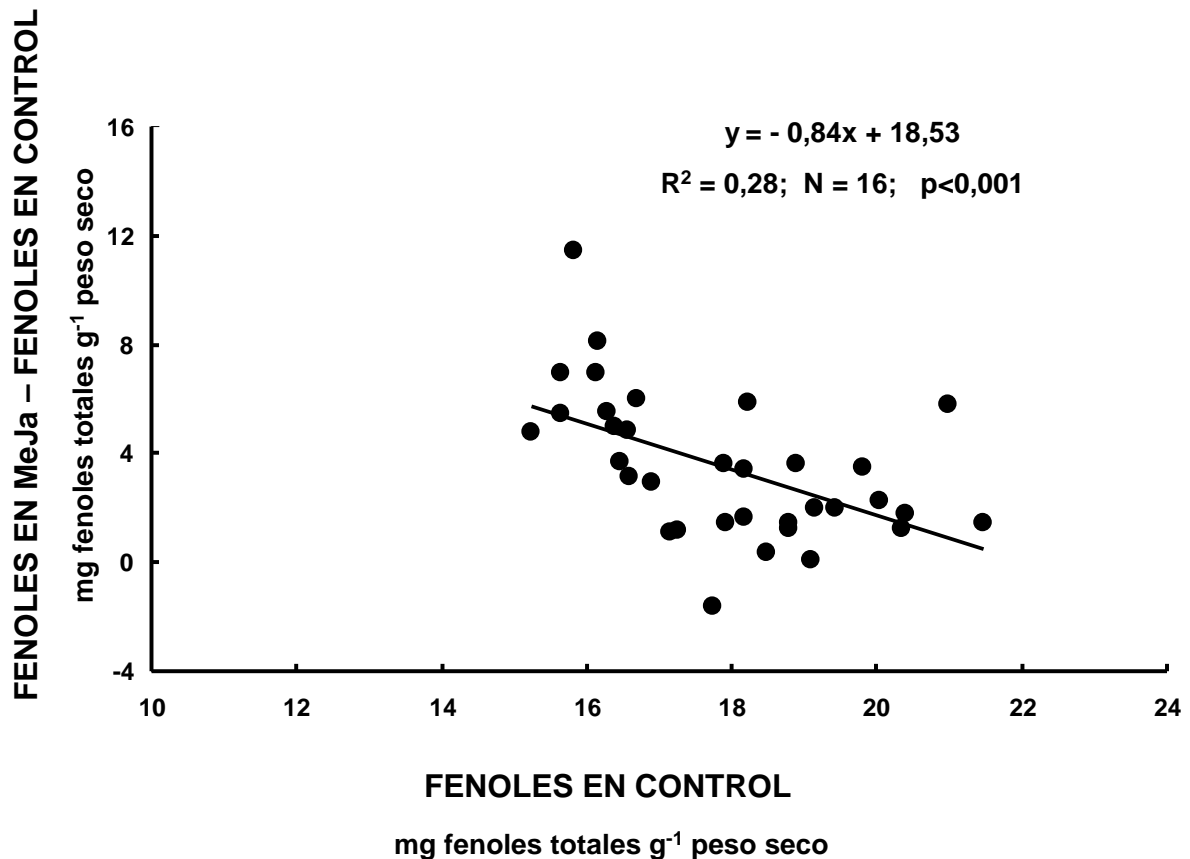


Figura 4.9 Relación entre la concentración de fenoles totales constitutivos e inducidos en brinzales de *P. pinaster* pertenecientes a 33 familias de medios hermanos y un testigo comercial, TCOS (subensayo *MeJa* x *G*). Los datos se muestran como \pm s.e.m. $N = 16$.

5. DISCUSIÓN

Efecto de la fertilización fosfórica sobre la producción de fenoles totales en acículas de juveniles de *P. pinaster*

El aporte de fertilización fosfórica provocó una disminución en el contenido de fenoles totales en las acículas de juveniles de *P. pinaster*. Puesto que los compuestos fenólicos están asociados a funciones defensivas se puede deducir que la fertilización fosfórica mermó la capacidad defensiva de los pinos contra eventuales organismos patógenos y enfermedades. Diversos autores observaron con anterioridad este tipo de comportamiento en otras coníferas, como Turtola et al. (2002), que encontraron que la fertilización con dos tratamientos (nitrógeno y fósforo; calcio y nitrógeno) en ejemplares de 50 años de *P. sylvestris* L. provocaba una disminución de la concentración de fenoles totales. También Blodgett et al. (2005) encontraron una reducción significativa del contenido de fenoles solubles en ejemplares de *Pinus resinosa* Ait. fertilizados con nitrógeno.

Es interesante el comportamiento encontrado ante la inducción defensiva que fue elicitada mediante la aplicación exógena de MeJa en este estudio. Sólo en el tratamiento de deficiencia fosfórica hay una respuesta inducida clara y marcada en el aumento de la concentración fenólica en las acículas de los brinzales. En los casos en que el fósforo se administró en cantidad suficiente para las plantas, éstas no respondieron sintetizando más compuestos fenólicos cuando se les indujo a ello mediante la aplicación de MeJa, es decir, que cuando existió disponibilidad de nutrientes, los pinos no los invirtieron en defensas aun cuando fueron inducidos a ello. Esto podría ser debido a que los nutrientes asimilados fueron invertidos en otro tipo de funciones, como el crecimiento, según propone la hipótesis del balance crecimiento-diferenciación (GDBH) propuesta por Coley et al. (1985) . Se ha encontrado en estudios de campo que la fertilización fosfórica tiene un efecto altamente significativo sobre el crecimiento en altura, de modo que los pinos que recibieron mayores dosis de

fósforo fueron los que más crecieron (Zas et al., 2006). En este estudio de laboratorio también se midieron las alturas de los pinos, encontrándose que el crecimiento aumentó con la disponibilidad de fósforo, inversamente a lo ocurrido con el contenido de fenoles totales (datos no mostrados). Es decir, que la fertilización fosfórica produjo un aumento del crecimiento y una disminución de las defensas, tanto constitutivas como inducidas, basadas en compuestos fenólicos. De este modo, podría esperarse que un aumento del crecimiento como consecuencia de una mayor disponibilidad de nutrientes produjese una disminución de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos, lo que se traduciría en una menor capacidad defensiva. Tomando como cierta la suposición basada en las observaciones anteriores de que las plantas que disfrutaban de ambientes con disponibilidad de nutrientes, ya vengan de un aporte externo en forma de fertilización, los destinan preferentemente al crecimiento, su sistema defensivo parece adoptar un papel secundario en la adjudicación de recursos, de manera que bajo estas circunstancias las plantas podrían resultar más vulnerables a eventuales plagas o enfermedades. Existen diversos estudios en los que se encontró que la fertilización provocó un aumento de la susceptibilidad al ataque de insectos o a la colonización de hongos en coníferas. Así, en un ensayo tratamiento x fertilización del mencionado programa de mejora de *P. pinaster* y *P. radiata* en Galicia, que fue atacado masivamente por *H. abietis*, se observó que las plantas más dañadas fueron las fertilizadas con fósforo (Zas et al., 2008). De la misma manera, un estudio realizado por Blodgett et al. (2005) mostró que la fertilización con NPK en individuos de *Pinus resinosa* inoculados con *Sphaeropsis sapinea* produjo una mayor susceptibilidad a la enfermedad que en los no fertilizados, lo cual contradice la idea intuitiva de que un crecimiento vigoroso está asociado a una baja susceptibilidad a enfermedades. Idénticos resultados fueron encontrados por van Dijk et al. (1992) en individuos de *Pinus nigra* spp. laricio Maire fertilizados con nitrógeno e inoculados con *S. sapinea*.

Existen otras explicaciones alternativas a las hipótesis de adjudicación de recursos que podrían justificar el hecho de que la fertilización provoque un aumento del grado de ataque y/o susceptibilidad a éste, como puede ser el aumento de la calidad nutritiva de las plantas fertilizadas, o la mayor cantidad de alimento ofrecido a los herbívoros debido al aumento de tamaño de las plantas como consecuencia de la fertilización. En cualquier caso, estas posibilidades, las de adjudicación de recursos en las plantas, o una combinación de todas ellas, podrían explicar el comportamiento encontrado en las plantas en relación a la fertilización y susceptibilidad frente al ataque de herbívoros.

Las implicaciones de estas investigaciones en la gestión de las repoblaciones de *P. pinaster* en Galicia son importantes, puesto que la intención de mejorar las condiciones de crecimiento de los brinzales mediante la fertilización de establecimiento de estos suelos tan pobres en fósforo puede acarrear consecuencias nefastas para la repoblación en zonas con riesgo de infestación en los primeros años de vida, dado que las plántulas podrían resultar más susceptibles al ataque de insectos u hongos patógenos. Asimismo, los resultados obtenidos tienen, por motivos similares, implicaciones directas en el desarrollo de programas de fertilización en vivero, puesto que es imprescindible que éstos aseguren, además de la calidad morfológica y fisiológica de las plantas, el desarrollo de una eficiente capacidad defensiva.

Por todos estos motivos, sería interesante que se investigaran las posibles soluciones a la problemática que supone la fertilización de establecimiento en los suelos pobres de los pinares gallegos. Las líneas de investigación podrían ir encaminadas a la aplicación de nuevas prácticas forestales como (I) evitar la fertilización en condiciones de riesgo, (II) modificar el momento de la fertilización, (III) incluir plantas cebo sobrefertilizadas o pertenecientes a familias especialmente vulnerables (Zas et al., 2005), (IV) alterar el momento de la plantación en función del ciclo biológico de los patógenos, o (V) colocar protectores físicos en los brinzales.

Efecto del genotipo sobre la producción de fenoles totales en acículas de juveniles de *P. pinaster*

El efecto familiar no resultó significativo en las 33 familias de *P. pinaster* de la procedencia Galicia-costa analizadas, lo cual sugiere que no existen genotipos superiores en cuanto a capacidad defensiva basada en compuestos fenólicos. Tampoco el testigo comercial, TCOS, no procedente de material seleccionado, mostró diferencias significativas en el contenido de fenoles totales con respecto al resto de familias. En otro estudio relacionado con este proyecto se analizó el contenido de resina (mg resina g⁻¹ tallo seco) en las mismas 34 familias de *P. pinaster*, hallándose que tampoco existieron diferencias significativas entre ellas en cuanto al contenido de resina (Blanco, 2007). Dado que la producción de resina también constituye un mecanismo de defensa en *Pinaceae*, estos resultados refuerzan las conclusiones mencionadas de que no se dan diferencias significativas en función del genotipo. No obstante, pudiera ser que la precisión de cuantificación de los compuestos fenólicos, así como del contenido de resina, no resultase suficiente para encontrar significación, o que fuese necesario un mayor tamaño muestral, es decir, que se analizase un mayor número de familias analizadas y, especialmente, una mayor cantidad de individuos dentro de cada familia (recordemos que cada combinación de factores tuvo cuatro réplicas), puesto que la varianza intrafamiliar resultó tan acusada que es probable que fuese la causa de que el genotipo no tuviese un efecto significativo sobre la producción de fenoles totales. También podría pensarse que la población de mejora no presenta diferencias significativas internas debido a su similitud en términos de vigor, pero el hecho de que el testigo comercial, TCOS, tampoco muestre diferencias significativas, hace descartar a priori esta opción, aunque sería necesario contar con más genotipos no mejorados para contrastar esta suposición.

De todos modos, aunque no se encontraron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales entre las diferentes familias, sí se encontró un patrón de comportamiento diferente entre ellas en relación a la asignación de recursos entre los

distintos tipos de defensas, constitutivas e inducidas. Se encontró que las familias que presentan concentraciones bajas de fenoles totales constitutivos en relación al resto de genotipos, poseen mayor potencial inductivo. Inversamente, las familias que de manera constitutiva cuentan con más cantidad de compuestos fenólicos, mostraron una respuesta inducida menor cuando fueron elicitadas con MeJa. Las familias con valores intermedios en el contenido de fenoles constitutivos también produjeron cantidades intermedias de compuestos fenólicos tras la inducción con MeJa. Esto hace pensar que cada planta posee un condicionante genético en la estrategia defensiva adoptada, pudiendo apostar por una defensa permanente en la que realiza un gasto seguro de recursos (defensa principalmente constitutiva); por una defensa puntual y justificada pero con cierto riesgo, que reside en el retraso de la respuesta frente al ataque (defensa principalmente inducida), o por un reparto equitativo entre ambas. Blanco (2007) encontró también en las mismas familias de *P. pinaster* analizadas en este estudio una relación significativa e inversa entre las defensas constitutivas e inducidas cuantificadas en función del contenido de resina por peso de tallo seco. Otros autores han sugerido con anterioridad la existencia de relaciones negativas entre distintos tipos de defensas (químicas, químicas y mecánicas, inducidas y constitutivas) (Lebreton, 1982; Steward & Keeler, 1988; Karban & Myers, 1989) como consecuencia del coste que supone para las plantas la posesión de varios mecanismos defensivos, aunque Koricheva et al. (2004), en un estudio en el que revisaron 31 publicaciones relacionadas con este tema, concluyeron que sólo encontraron un compromiso negativo evidente entre los mecanismos de defensa constitutivos e inducidos. El concepto de "trade-offs" entre las defensas es asimismo inherente a la mayoría de teorías de defensa de las plantas, como la hipótesis de la defensa óptima (Rhoades, 1979), la hipótesis de la tasa de crecimiento (Coley et al., 1985) y la hipótesis del balance de crecimiento-diferenciación (Herms y Mattson, 1992). Gianoli (2002) justifica estos compromisos entre las defensas constitutivas e inducidas suponiendo que las plantas que poseen potentes sistemas constitutivos de defensa

probablemente no obtengan una ganancia con la inducción que supere el gasto que supone incrementar las defensas tras un daño o ataque herbívoro, mientras que es esperable que las plantas que no han invertido en una buena defensa constitutiva recurran a la alternativa menos costosa de las defensas inducidas.

El hecho de que cada planta esté genéticamente condicionada a seguir una de estas estrategias puede ser consecuencia de una adaptación a determinados factores del ambiente en el que habita. Uno de estos factores podría ser la frecuencia de ataques de herbívoros, o predictibilidad de ataque. Si existe una incidencia de plagas elevada en esa zona es posible que las plantas que habitan en ella dediquen sus recursos a la producción de sistemas defensivos de tipo constitutivo, encontrándose preparadas en todo momento para un esperado ataque, mientras que si la predictibilidad de la herbivoría es baja, podría resultar más económico apostar por una defensa basada en respuestas inducidas, realizando el gasto de recursos sólo en las ocasiones puntuales necesarias. Asimismo, la abundancia de nutrientes del lugar en el que viven las plantas podría determinar la estrategia defensiva adoptada. Si el ambiente es pobre, las plantas tendrán menos disponibilidad de nutrientes para invertir en crecimiento, por lo que los fotosintatos asimilados podrían dedicarse a conformar un buen sistema defensivo constitutivo, mientras que en la situación contraria, las plantas probablemente invertirían los recursos disponibles en el crecimiento, apostando por una defensa de tipo inducido. Los resultados obtenidos en este estudio no soportan este último razonamiento, pues las plantas respondieron claramente mejor al tratamiento de inducción en condiciones nutricionales deficientes. Sin embargo, Lombardero et al. (2000), en un estudio realizado con individuos de *Pinus taeda*, encontraron resultados acordes con estas suposiciones, hallando que el flujo de oleorresina constitutiva de los pinos fue máximo cuando el crecimiento estuvo limitado por condiciones de sequía y mínimo durante el periodo de crecimiento acelerado de los árboles, en que las condiciones ambientales resultaron más favorables.

Inversamente, durante este periodo favorable, el incremento del flujo inducido de oleorresina fue mayor que en condiciones ambientales limitantes.

6. CONCLUSIONES

1. La disponibilidad de fósforo afectó de manera significativa al contenido de fenoles totales en las acículas de juveniles de *P. pinaster*, de manera que en condiciones de deficiencia fosfórica las plantas sintetizaron más cantidad de compuestos fenólicos que cuando dispusieron de este nutriente.

2. El MeJa en concentración 22 mM resultó adecuado como agente elicitador de respuestas defensivas, puesto que afectó significativamente al contenido de fenoles totales en las acículas, induciendo una mayor producción de fenoles.

3. Existe una interacción significativa entre el efecto de los tratamientos de fósforo y la inducción con MeJa. Así, las plantas sometidas a estrés nutricional tuvieron mayor capacidad de defensa que las fertilizadas, tanto si se comparan en situación basal como inducida. Sin embargo, en los tratamientos en los que el fósforo no fue limitante para el crecimiento las plantas invirtieron menos en fenoles, y además no respondieron a la elicitación con MeJa.

4. No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de defensa constitutiva ni inducida entre los distintos genotipos estudiados.

5. Existe una correlación genética inversa, negativa y significativa entre las defensas constitutivas e inducidas de los pinos, lo que parece indicar que cada familia sigue una estrategia defensiva determinada, en la que prioriza la inversión de recursos en un tipo de defensa sobre el otro.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-González, J. G., Ruiz-González, A. D., Rodríguez-Soalleiro, R. y Barrio-Anta, M. (2005). Ecorregional site index models for *Pinus pinaster* in Galicia (northwestern Spain). *Annals of Forest Science* 62: 115-127.
- Anglberger, H. y Halmschlager, E. (2003). The severity of *Sirococcus* shoot blight in mature Norway spruce stands with regard to tree nutrition, topography and stand age. *Forest Ecology and Management* 177(1-3): 221-230.
- Ayres, M. P., Wilkens, R. T., Ruel, J. J., Lombardero, M. J. y Vallery, E. (2000). Nitrogen budgets of phloem-feeding beetles with and without symbiotic fungi. *Ecology* 81(8): 2198-2210.
- Baraza, E., J. Gomez, Hodar, J. y Zamora, R. (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.
- Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general responses in plants? *Physiol. Mol. Plant pathol.* 57: 101-110.
- Blanco, D. (2007). Contido de resina en xuvenís de *Pinus pinaster* Ait. Efecto da dispoñibilidade de fósforo nas defensas constitutivas e inducidas con metil jasmonato. Lugo, Universidade de Santiago de Compostela: 42 pp.
- Blodgett, J. T., Herms, D. A., Daniel A. y Bonello, P. (2005). Effects of fertilization on red pine defense chemistry and resistance to *Sphaeropsis sapinea*. *Forest Ecology and Management* 208: 373–382.
- Bryant, J. P., Chapin III, F.S. y Klein, D. R. (1983). Carbon/Nutrient balance of boreal plants in relation with vertebrate herbivory. *Oikos* 40: 357-368.
- Clausen, T. P., Reichardt P. B., Bryant, J. P., Werner, R. A., Post, K. y Frisby, K. (1989). Chemical model for short-term induction in quaking aspen (*Populus tremuloides*) foliage against herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 15: 2335-2346.

- Coley, P. D., Bryant, J. P. y Chapin III, F. S. (1985). Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* 230:895-899.
- Costas, R. (2007). Preferencia de consumo del curculiónido *Hylobius abietis* sobre *Pinus pinaster* en bioensayos: variación intraespecífica, efecto de la inducción de defensas con metil jasmonato y comparación interespecífica con *P. radiata*, Universidade de Vigo: 50 pp.
- Covelo, F. y Gallardo A. (2001). Temporal variation in total leaf phenolics concentration of *Quercus robur* in forested and harvested stands in northwestern Spain. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 79(11): 1262-1269.
- Desprez-Loustau, M.-L. y Wagner K. (1997). Components of maritime pine susceptibility to twisting rust - A path coefficient analysis. *European Journal of Plant Pathology* 103: 653-665.
- Erbilgin, N., Krokene, P., Christiansen, E., Zeneli, G. y Gershenson, J. (2006). Exogenous application of methyl jasmonate elicits defenses in Norway spruce (*Picea abies*) and reduces host colonization by the bark beetle *Ips typographus*. *Oecologia* 148: 426-436.
- Feeny, P. (1976). Plant apparency and chemical defense. *Recent Advances in Phytochemistry* 10: 1-40.
- Franceschi, V., Krokling, T. y Christiansen, E. (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., Krokene, P. y Krokling, T. (2005). Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist* 167: 353-376.
- Gianoli, E. (2002). A phenotypic trade-off between constitutive defenses and induced responses in wheat seedlings. *Ecoscience* 9: 482-488.
- Gould, N., Reglinski, T., Spiers, M. y Taylor, J. T. (2008). Physiological trade-offs associated with methyl jasmonate - induced resistance in *Pinus radiata* *Canadian Journal of Forest Research* 38: 677-684.

- Harbone, J. B. (1997). Role of phenolic secondary metabolites in plants and their degradation in nature. *Diven by nature: plant litter quality and descomposition*. G. Cadisch y K. E. Giller. Wallingford, U.K., CAB International: 67-74.
- Heijari, J., Nerg, A.-M., Kainulainen, P., Viiri, H., Vuorinen, M. y Holopainen, J. K. (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.
- Harms, D. A. y Mattson W. J. (1992). The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology* 67: 283-335.
- Honkanen, T., Haukioja, E. y Kitunen, V. (1999). Responses of *Pinus sylvestris* branches to simulated herbivory are modified by tree sink/source dynamics and by external resources. *Functional Ecology* 13(1): 126-140.
- Hotter, G. S. (1996). Molecular signalling events in the activation of plant defenses against pathogens. *N.Z.BioScience* August: 7-12.
- Jones, C. G. y Hartley, S. E. (1999). A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos* 86: 27-44.
- Karban, R. y J. H. Myers (1989). Induced plant responses to herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20: 331-348.
- Koricheva, J., Nykonen, H. y Gianoli, E. (2004). Meta-analysis of Trade-offs among Plant Antiherbivore Defenses: Are Plants Jacks-of-All-Trades, Masters of All? *The American Naturalist* 163: 64 -75.
- Kozłowski, G., Buchala, A., y Métraux, J.-P. (1999). Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L) Karst.] seedlings against *Pythium ultimum* Trow. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 53-58.
- Kyto, M., Niemela, P., Annala, E. y Varama, M. (1999). Effects of forest fertilization on the radial growth and resin exudation of insect-defoliated Scots pines. *Journal of Applied Ecology* 36(5): 763-769.

- Lebreton, P. (1982). Tanins ou alkaloïdes: deux tactiques phytochimiques de dissuasion des herbivores. *Revue d'Écologie la Terre et la vie* 36 :539-572.
- Lombardero, M. J., Ayres, M. P., Lorio, P. L. y Ruel, J. J. (2000). Environmental effects on constitutive and inducible resin defences of *Pinus taeda* *Ecology Letters* 3 329 -339.
- López Rodríguez, C. (2006). Evaluación en vivero de familias de polinización abierta de *Pinus pinaster* y correlación con su comportamiento adulto en campo. Lugo, Universidade de Santiago de Compostela: 80 pp.
- Makar, HPS (2000). Quantification of tannins in tree foliage: a laboratory manual. FAO/ IAEA Working Document. Viena.
- Martins, P. (2005). Efecto de la fertilización de establecimiento en el comportamiento de familias de polinización abierta de *Pinus pinaster*. Lugo, Santiago de Compostela: 69 pp.
- Mumm, R. y Hilker, M. (2006). Direct and indirect chemical defense of pine against folivorous insects. *Trends in Plant Science* 11(7): 351-358.
- Peters, N. K. y Verma D. P. S. (1990). Phenolic Compounds as Regulators of Gene Expression in Plant-Microbe Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3(1): 4-8.
- Phillips, M. A. y Croteau R. B. (1999). Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science* 4(5): 184-190.
- Rhoades, D. F. (1979). Evolution of plant chemical defense against herbivores. Pages 3-54 in G. A. Rosenthal y D. H. Janzen, eds. *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, New York.
- Rhoades, D. F. y Cates R. G. (1976). Toward a general theory of plant antiherbivory chemistry. *Recent Advances in Phytochemistry* 10: 168-213.
- Sanchez-Rodriguez, F., Rodriguez-Soalleiro, R., Español, E., Lopez, C. A. y Merino, A. Influence of edaphic factors and tree nutritive status on the productivity of *Pinus radiata* D. Don plantations in northwest Spain. *Forest Ecology and Management* 171: 181-189.

- Sanz, F., Latour, S., Neves, M, Bastet, E., Pischedda, D., Piñeiro, G., Gauthier, T., Lesbats, J., Plantier, C., Marques, A., Lanvin, J. D., Santos, J. A., Touza, M., Pedar, F., Parrot, J., Reuling, D. y Faria, C. (2006). Aplicacións industriais da Madeira de piñeiro pinaster. Rodi Artes Gráficas SL. Ourense.
- SAS Institute (1999). SAS/STAT User's guide, Version 8. Cary, NC., SAS Institute Inc.
- Selyer, J. y Immonen, A. (1992). Effect of fertilization and watering of Scots pine seedlings on the feeding preference of the pine weevil (*Hylobius abietis* L.). *Silva Fennica* 26(2): 75-84.
- Steward, J. L., & Keeler, K. H. (1988). Are there trade-offs among antiherbivore defenses in *Ipomoea* (Convolvulaceae)? *Oikos* 53:79-86.
- Strauss, S. Y. y Agrawal, A. A. (1999). The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* 14(5): 179-185.
- Thaler, J. S., Stout, M. J., Karban, R. y Duffey, S. S. (2001). Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores. *Ecological Entomology* 26: 312-324.
- Turtola, S., Manninen, A. M., Holopainen, J. K., Levula, T., Raitio, H. y Kainulainen, P. et al. (2002). Secondary Metabolite Concentrations and Terpene Emissions of Scots Pine Xylem after Long-Term Forest Fertilization. *Journal of Environmental Quality* 31: 1694-1701.
- vanAkker, L., Alfaro, R. I. y Brockley, R. (2004). Effects of fertilization on resin canal defences and incidence of *Pissodes strobi* attack in interior spruce. *Canadian Journal of Forest Research* 34: 855-862.
- Vega, P., Vega, G., González, M. y Rodríguez, A. (1993). Mejora del *Pinus pinaster* Ait. en Galicia. I Congreso Forestal Español, Lourizán, Pontevedra.
- Waterman, P. G., Mole, S. y Bernays, E. A. (1989). Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plants. *Insect- Plant interaction*. Boca Raton, FL, USA, CRC: 107-134.

- Xunta de Galicia (2001). O monte galego en cifras. Santiago de Compostela, Spain, Xunta de Galicia, Dirección Xeral de Montes e Medio Ambiente Natural.
- Zas, R., Merlo, E. y Fernández-López, J. (2004). Genetic parameter estimates for maritime pine in the Atlantic coast of North-west Spain. *Forest Genetics* 11(1): 45-53.
- Zas, R., Pichel, F., Martins, P. y Fernyez-Lopez, J. (2006). Fertilization x genotype interaction in *Pinus radiata* open pollinated families planted in three locations in Galicia (NW Spain). *New Forest* 32 (3): 253-263.
- Zas, R., Sampedro, L., Moreira, X. y Martíns, P. (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., Sampedro, L., Prada, E. y Fernyez-Lopez, J. (2005). Genetic variation of *Pinus pinaster* Ait. seedlings in susceptibility to the pine weevil *Hylobius abietis* L. *Annals of Forest Science* 62(7): 681-688.
- Zas, R., Sampedro, L., Prada, E., Lombardero, M. J. y Fernández-López, J. (2006). Fertilization increases *Hylobius abietis* L. damage in *Pinus pinaster* Ait. seedlings *Forest Ecology and Management* 222(1-3): 137-144.
- Zeneli, G., Krokene, P., Christiansen, E., Krekling, T. y Gershenzon, J. (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.

FE DE ERRATAS

- Página 8, figura 1.1: donde pone “bajaramosidad” debe poner “baja ramosidad”.
- Página 10, línea 1: donde pone “Figura 1.3” debe poner “Figura 1.2”.
- Página 14, línea 3: donde pone “Éstos últimos” debe poner “Estos últimos”.
- Página 15, línea 15: donde pone “amonioliasa” debe poner “amonio liasa”.
- Página 17, línea 6: donde pone “degradación.” Debe poner “degradación:”.
- Página 17, línea 1: donde pone “(Hotter, 1996)” debe poner “Hotter (1996)”.
- Página 36, línea 7: donde pone “*MeJa x P* y *MeJa x G*, respectivamente” debe poner “*MeJa x G* y *MeJa x P*, respectivamente”.
- Páginas 38 y 39, línea 3: donde pone “mg P g⁻¹” debe poner “mg P L⁻¹”.
- Página 43, línea 25: donde pone “Coley et al. (1985)” debe poner “Herms y Mattson (1992)”.
- Página 46, línea 18: donde pone “que se analizase un mayor número de familias analizadas” debe poner “que se analizase un mayor número de familias”.
- Página 51, línea 6: donde pone “stys” debe poner “stands”.
- Página 51, referencia a Blanco (2007): falta indicar que se trata de un PFC.
- Página 52, referencia a Costas (2007): idem.
- Página 52, referencia a Covelo y Gallardo (2001): donde pone “stys” debe poner “stands”.
- Página 53, referencia a Karban y Myers (1989): donde pone “Ecology y systematics” debe poner “Ecology and systematics”.
- Página 54, referencias a López Rodríguez (2006) y Martins (2005): falta indicar que son PFCs.
- Página 55, referencia a Turtola et al. (2002): no debe figurar “et al.”.
- Página 56, referencias a Zas et al. (2006) y Zas et al. (2005): donde pone “Fernydez” debe poner “Fernández”.