



UNIVERSIDADE
DE VIGO

E. U. I. T. Forestal

PROYECTO FIN DE CARRERA
Mod. Investigación

**PREFERENCIA DE CONSUMO DEL
CURCULIÓNIDO *Hylobius abietis* SOBRE *Pinus
pinaster* EN BIOENSAYOS: VARIACION
INTRAESPECÍFICA, EFECTO DE LA INDUCCIÓN
DE DEFENSAS CON METIL JASMONATO Y
COMPARACIÓN INTERESPECÍFICA CON *P.
radiata***

AUTOR: **Rodrigo Costas Soliño**

DIRECTORES:

Luis Sampedro Pérez y Rafael Zas Arregui.
Centro de Investigación Ambiental de Lourizán - CMA

TUTOR:

Jose Carlos Souto Otero
E. U. I. T. Forestal

Octubre de 2007

UNIVERSIDAD DE VIGO

**ESCOLA UNIVERSITARIA DE INGIENERIA
TECNICA FORESTAL**



UNIVERSIDADE
DE VIGO

**PREFERENCIA DE CONSUMO DEL
CURCULIÓNIDO *Hylobius abietis* SOBRE *Pinus
pinaster* EN BIOENSAYOS: VARIACION
INTRAESPECÍFICA, EFECTO DE LA INDUCCIÓN
DE DEFENSAS CON METIL JASMONATO Y
COMPARACIÓN INTERESPECÍFICA CON *P.
radiata***

Los directores

Luis Sampedro Pérez

Rafael Zas Arregui

VºBº El tutor Convocatoria

Jose Carlos Souto Otero

El alumno

Rodrigo Costas Soliño

Convocatoria
Octubre 2007

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	2
1.1.- El hospedador, <i>Pinus pinaster</i> Ait	2
1.2.- El Herbívoro, <i>Hylobius abietis</i> L.	7
1.3.- Los sistemas defensivos en coníferas	12
1.4.- Evaluación de calidad del material vegetal mediante bioensayos	13
2.- HIPOTESIS, JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	16
3.- METODOLOGIA	18
3.1.- Captura y mantenimiento de <i>Hylobius abietis</i>	19
3.2.- Experimento A.: Variación Interespecifica <i>P. pinaster</i> - <i>P. radiata</i>	21
3.2.1.- Material Vegetal	21
3.2.2.- Unidades experimentales para los Bioensayos <i>in vitro</i>	22
3.2.3.- Bioensayo A1: Bioensayo de Preferencia entre especies	23
3.2.4.- Bioensayo A2: Bioensayo de Tasa de ingestión entre especies	23
3.2.5.- Análisis estadísticos	24
3.3.- Experimento B: Calibración del efecto del Metil Jasmonato como elicitador de respuestas inducidas.	25
3.3.1.- Material Vegetal	25
3.3.2. Diseño experimental	26
3.3.3.- Bioensayo B: Bioensayo de Tasa de ingestión	26
3.3.4.- Resinación	26
3.3.5.- Análisis estadísticos	27
3.4.- Experimento C: Variación familiar en <i>P. pinaster</i> en el sistema defensivo	28
3.4.1.- Material Vegetal	28
3.4.2.- Diseño Experimental en invernadero	28
3.4.3.- Bioensayo C: Bioensayo in vivo de variación familiar en <i>P. pinaster</i> en el sistema defensivo	28
3.3.4.- Resinación	29
3.3.5.- Análisis estadísticos	30
4.- RESULTADOS Y DISCUSION	33
5.- CONCLUSIONES	50
6.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUCCION

1.1. El hospedador, *Pinus pinaster* Ait

Pinus pinaster Ait. (familia Pinaceae) es una conifera natural de la región mediterránea occidental y de la fachada atlántica, y constituye masas forestales explotadas en Francia, España, Portugal, Italia, Marruecos, Argelia y Malta(figura 1.1). Suele encontrarse entre el nivel del mar y 800 metros, aunque en Marruecos puede llegar a verse a 2000 m sobre el nivel del mar. En España se distinguen 19 poblaciones o regiones de procedencia (Alía *et al.*, 1996) que pertenecen a dos de los 3 linajes maternos distinguidos en el area natural de la especie, el eurosiberiano y el mediterráneo (Burban & Petit 2003)



Figura 1.1: Distribución natural del *Pinus pinaster*

La superficie mundial ocupada por *P. pinaster* se estima en torno a los 4,4 millones de hectáreas, de las cuales 4,2 millones se encuentran dentro del área de distribución natural de esta especie. En Galicia *P. pinaster* es la especie forestal de mayor importancia, llegando a ocupar cerca de 400.000 ha en masa pura y otras 200.000 ha en masas mixtas junto principalmente con eucalipto aunque también con roble y

otras coníferas, ocupando así un 36.8% de la superficie arbolada de Galicia (DGCN 2002).

P. pinaster tiene una gran importancia económica por el aprovechamiento de su madera. Su resina ha sido objeto de importante aprovechamiento durante muchos años en nuestro país para la obtención de aceite de trementina. La madera de mejor calidad se destina a carpintería y ebanistería, mientras que la de inferior calidad, debido a la presencia de numerosos nudos, se destina a encofrados y otras utilidades de construcción, y madera de trituración para la industria de tablero. Así se obtienen casi 2 millones de m³ de madera en rollo industrial, haciendo un 37% del total de rollo que se produce en Galicia anualmente (Anuario de Estadística Agraria 2001)(figura 1.2). También se emplea como materia prima papelera para la obtención de papel Kraft y cada vez cobra más relevancia su utilidad de restauración ambiental como fijador de dunas y suelos pobres.

Otro congenero con importancia maderera en el norte de España es *Pinus radiata* D. Don, donde ocupa mas de 300.000 ha de las cuales en torno a las 70.000 ha son pertenecientes a Galicia con una tasa de extracción de madera de 15 m³ ha⁻¹ año⁻¹ (DGCN 2002), convirtiéndose así en la tercera especie forestal con mayor importancia comercial en Galicia, junto *P. pinaster* y *Eucalyptus globulus*.

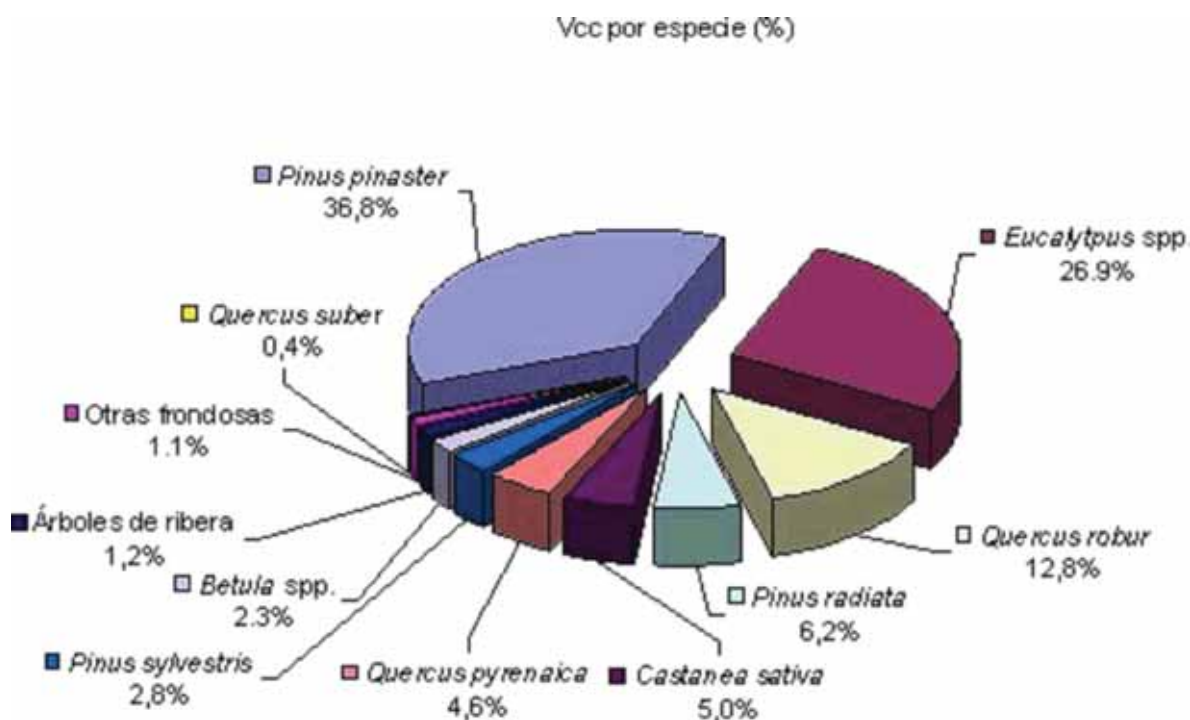


Figura 1.2: Volumen con corteza por especie en Galicia (DGCN 2002)

En los años 80, debido a la gran importancia de *P. pinaster* en el sector productivo forestal en Galicia, se impulsó un programa de mejora genética donde se seleccionaron árboles plus de la zona costera de Galicia por su vigor, forma y ramosidad (Vega *et al.*, 1993). Los árboles plus se clonaron por injerto y se estableció en 1990 un huerto semillero clonal en Sergude y en 1998 otro en Monfero, ambos en la provincia de A Coruña, con el fin de producción de semilla de alta calidad genética para la reforestación de a zona costera de Galicia (Merlo y Fernández-López 2004). Sin embargo, las necesidades de semilla son muy superiores a la producción actual de semilla mejorada procedente de los huertos semilleros (entre ambos solamente cubren el 20% de la demanda actual de semilla), por lo que la mayor parte de las repoblaciones que se realizan en Galicia proceden de material identificado no mejorado, en ocasiones alóctono. Dentro de este programa de mejora de *P. pinaster* en Galicia se incluyeron ensayos factoriales familia x fertilización en varios lugares de Galicia para evaluar la interacción familia x fertilización en diferentes condiciones ambientales. Estos ensayos buscan evaluar el comportamiento de diversos caracteres de crecimiento frente a la disponibilidad de nutrientes ya que se comprobó que las plantaciones forestales gallegas sufren importantes deficiencias nutricionales que repercuten de manera notoria en su productividad (Zas *et al.*, 2006; Zas & Serrada *et al.*, 2003)

El ataque masivo a uno de estos ensayos de *P. pinaster* y *P. radiata* por parte del curculiónido *Hylobius abietis* L. en 2003 permitió un primer estudio de los patrones de preferencia de ataque, vulnerabilidad y resistencia entre progenies y de cómo la disponibilidad de nutrientes afecta al sistema insecto-planta (Zas *et al.*, 2007; Zas *et al.*, 2006; Zas *et al.*, 2005). *H. abietis* es un curculiónido herbívoro que ocasiona daños muy importantes en las regeneraciones de coníferas al alimentarse del floema de juveniles de varias coníferas (Orlander & Nordlander, 2003). En Galicia y el norte de España, dos de sus hospedadores potenciales son *P. pinaster* y *P. radiata*. En trabajos previos se ha comprobado que tanto la fertilización, especialmente fosfórica, como el genotipo afectaron significativamente a la preferencia del insecto, apreciándose diferencias entre diferentes familias de las dos especies de pino presentes en los ensayos (*P. pinaster* y *P. radiata*). Además, se ha constatado una sensibilidad diferencial entre estas dos especies de pino (Sampedro & Zas *et al.*, 2005; Zas *et al.*, 2007) (Cuadro 1).

Cuadro 1. ANTECEDENTES. Fertilización y genotipo afectan a la preferencia de *H. abietis* por *P. pinaster* y *P. radiata*

Material y Metodos

En una parcela del ensayo progenie x fertilización puesto en marcha por el CIFA de Lourizán en 2003 se estudiaron los efectos del genotipo y de los tratamientos de fertilización en los daños causados por *H. abietis*.

En este ensayo se utilizaron 28 familias procedentes de semilla mejorada y 3 testigos comerciales de semilla no mejorada bajo 8 tratamientos de fertilización (más un control no fertilizado, T0). Se midieron variables de crecimiento y daño uno y dos periodos vegetativos después del ataque del insecto.

Resultados

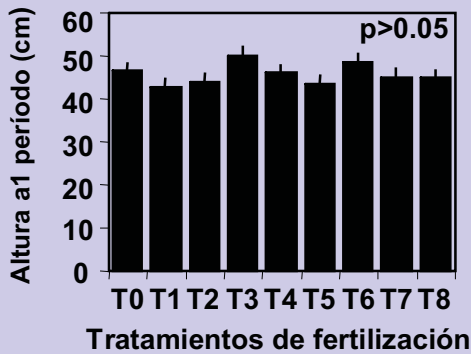


Figura 1. El efecto de la fertilización sobre el crecimiento en altura se perdió debido al ataque de *H. abietis*

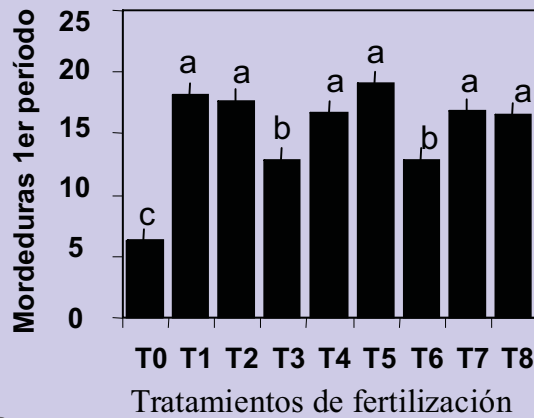


Figura 2. El insecto prefirió las plantas fertilizadas (especialmente con fósforo). Los tratamientos T3 y T6 no contienen fósforo. T0 es el control sin fertilizar

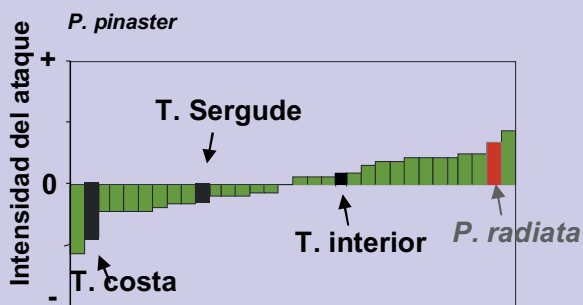


Figura 3. El insecto tuvo preferencia por determinadas familias

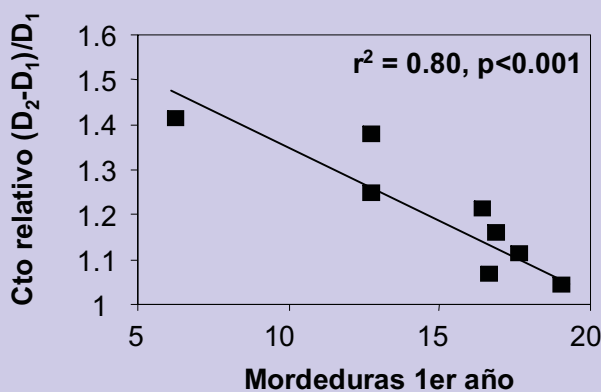


Figura 4. Las plantas más atacadas en el primer periodo son las que menos crecieron en el segundo

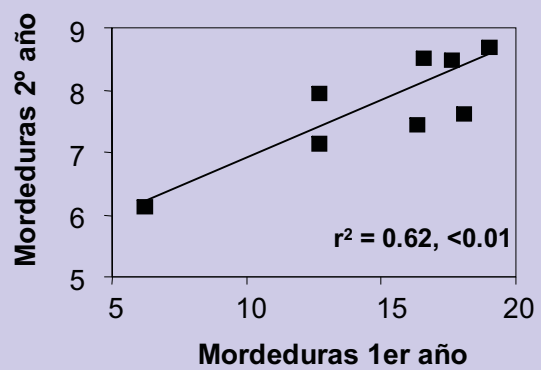


Figura 5. La preferencia del insecto se mantuvo en el segundo periodo sobre las plantas fertilizadas

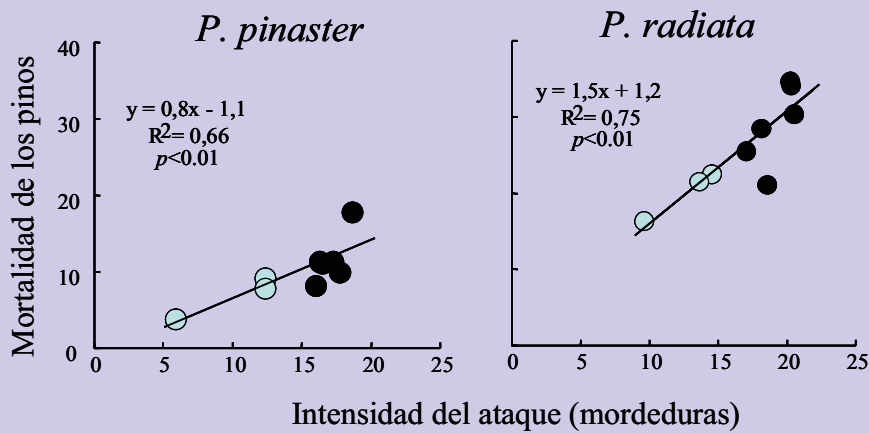


Figura 6. Relación entre la intensidad del ataque de *H. abietis* y la supervivencia de individuos juveniles de *P. pinaster* (4.a) y *P. radiata* (4.b) registrada en la siguiente primavera. Los datos proceden de 27 familias de polinización abierta sometidos a 9 tratamientos de fertilización. Los puntos con fondo claro corresponden a los promedios de los tratamientos sin fósforo. Se puede observar que para el mismo nivel de mordeduras *P. radiata* tiene una mayor tasa de mortalidad que *P. pinaster*

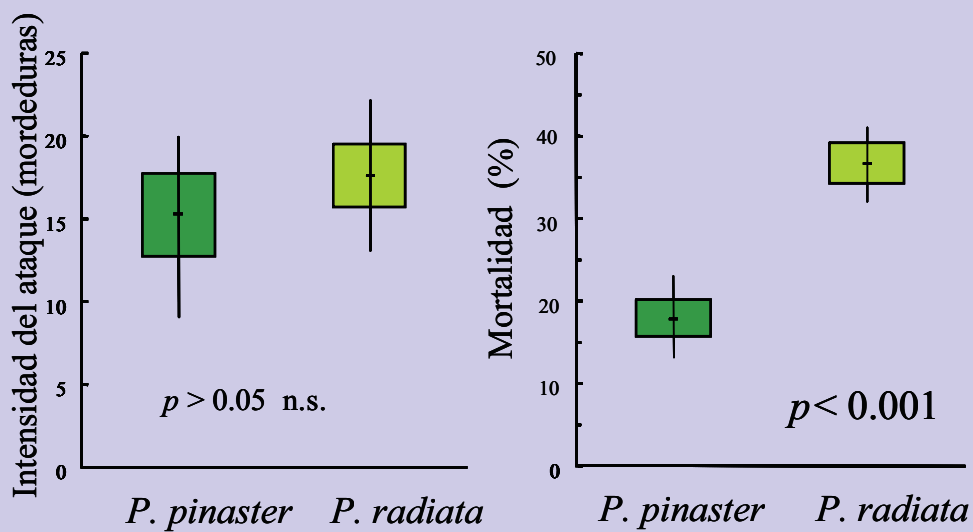


Figura 7: *P. radiata* fue más sensible al ataque: más mortalidad para la misma intensidad de mordeduras

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. *Annals of Forest Science* 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 Ecology and Management* 222, 137-144.

Sampedro, L., Zas, R. (2005) Herbivoría de corteza sobre coníferas de interés forestal, el caso de *Hylobius abietis*. Efecto de la fertilización de establecimiento y posibilidades de selección de progenies resistentes. *Congreso Forestal Español. Zaragoza*.

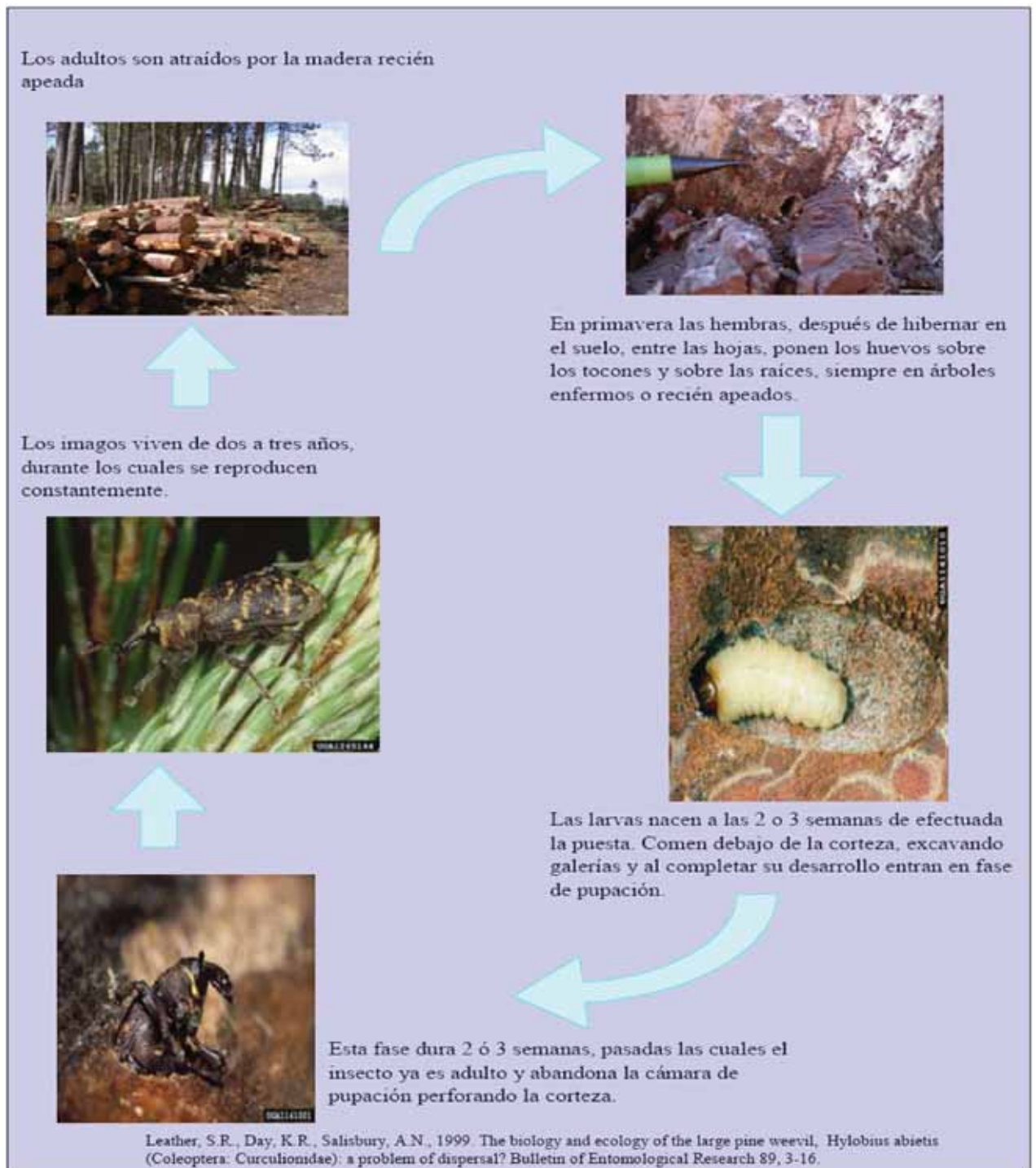
1.2. El Herbívoro, *Hylobius abietis* L.

Hylobius abietis L. es una de las plagas forestales más importante en coníferas jóvenes tanto en el norte como en el sur de Europa. *H. abietis* es un coleóptero de la familia Curculionidae. El imago mide de 7 a 13 mm de longitud y está provisto de una trompa ligeramente arqueada con dos antenas insertadas en su extremo, carácter éste que los diferencia de sus parientes *Pissodes*, también herbívoros de coníferas..

El ciclo de vida es algo complejo (Cuadro 2). Los imagos vuelan a largas distancias (>10 km) en búsqueda de un hábitat adecuado, y cuando sus músculos degeneran después de la etapa voladora permanecen el resto de la estación en el suelo (Langstrom 1982; Orlander et al. 1997; Orlander *et al.*, 2000). En primavera las hembras adultas, después de hibernar en el suelo entre hojas, son atraídas por sustancias químicas volátiles (como α -pineno y etanol) liberadas por los fragmentos de los árboles talados. Las hembras depositan los huevos en los tocones o raíces de árboles enfermos o recién apeados. La hembra pone de uno a cinco huevos en cada agujero practicado en los tocones o raíces, llegando a poner hasta 100 huevos. Las larvas nacen a las 2 o 3 semanas de efectuada la puesta, comen debajo de la corteza excavando galerías y al completar su desarrollo entran en fase de pupación quedando la entrada taponada con serrín. Al cabo de otras 2 o 3 semanas el insecto, considerado ya adulto, abandona la cámara de pupación perforando la corteza, esta emergencia del adulto se puede posponer hasta el verano siguiente, dependiendo del clima local y la calidad de la planta. Los imagos viven durante dos o tres años durante los cuales se reproducen constantemente. Debido a su larga longevidad una población de insectos puede permanecer en el mismo lugar durante 2 a 4 años (Leather *et al.*, 1999).

Este insecto se alimenta de la corteza y del floema de plantas jóvenes (Figuras 1.4 y 1.5), principalmente coníferas, causando pérdidas importantes de crecimiento, deformación del tallo (pérdida de la dominancia apical (Figura 1.7)) y una alta mortalidad (Orlander & Nordlander 2003). El nivel del daño causado por el coleóptero varía dependiendo de la localización, la especie, y la edad del hospedador. Estudios realizados en Suecia han demostrado que aproximadamente el 60% de las plántulas de árboles desprotegidos mueren como resultado de el ataque del coleóptero (Orlander & Nilsson 1999).

Cuadro 2. Ciclo de vida de *Hylobius abietis*



Actualmente existen medidas preventivas para evitar el ataque del coleóptero como son tratar los árboles jóvenes con insecticida (permetrin), lo cual proporciona protección durante la primera etapa de crecimiento para las plantas de vivero. La protección adicional en los años siguientes puede ser rociando insecticida con un vaporizador de mochila (Heritage & Johnsohn, 1997) protegiendo al árbol del ataque del coleóptero. Sin embargo, este método no controla la densidad de la población de estos

insectos durante varios años consecutivos, con lo que solo sería efectiva si se aplicase repetidamente. Desde el año 2003 el uso de estos insecticidas está prohibido por la actual legislación (The European Plant Protection Products Directive 1991) debido a los problemas ambientales y de salud pública que provocan, por lo que se desarrollaron medidas selvícolas alternativas al uso de estos insecticidas (Thackner *et al.*, 2003) como por ejemplo:

1. Realizar una escarificación del suelo, alterando así los lugares de refugio del insecto. Sin embargo, la escarificación solamente es efectiva si se emplea de manera conjunta con otras medidas protectoras.
2. Reservar árboles padre que no se cortan hasta pasados unos años. Varios estudios demostraron que el ataque de *H. abietis* sobre plantas jóvenes es menos severo si se dejan algunos árboles adultos en pie en lugar de realizar cortas a hecho, ya que éstos reducirían la presión ejercida por la plaga sobre el regenerado.
3. Utilizar protectores físicos (Figura 1.3)



Figura 1.3: Protectores físicos para evitar daños por *H. abietis* en *P. pinaster*

4. Retrasar la plantación más de 2 años después de la corta a hecho. Se ha observado que *H. abietis* es más abundante durante los primeros años después de la corta, por lo que retrasando la plantación se reduciría el riesgo de ataque. Sin embargo, este retraso provocaría pérdidas económicas importantes y problemas de competencia de las plantas con la vegetación del suelo (Nilsson & Örlander 1995; Örlander *et al.*, 1996).
5. Utilización de barreras alimenticias. Existe la posibilidad de colocar familias o genotipos muy susceptibles de ser atacadas en los bordes de la parcela para proteger al resto de la plantación. Esta idea todavía está en proceso de estudio.



Figura 1.4: adulto de *H. abietis* alimentándose en juvenil de *P. pinaster*



Figura 1.5: adulto de *H. abietis* alimentándose en juvenil de *P. pinaster* .Pueden observarse los daños en el floema



Figura 1.6: Resinación en las heridas de *P. pinaster* provocadas por *H. abietis*



Figura 1.7: Pérdida de la guía por anillamiento del floema debido a las mordeduras de *H. abietis* en *P. radiata*

1.3. Los sistemas defensivos en coníferas

Las coníferas aparecieron sobre la Tierra hace 280 millones de años, cuando aún no existían los insectos, y han evolucionado desde entonces en su presencia (Phillips & Croteau *et al.*, 1999). Ante el ataque de un insecto o patógeno, las plantas poseen mecanismos de defensa que pueden ser de naturaleza mecánica como presencia de espinas, pelos o escamas, o de tejidos impregnados con polímeros como lignina o suberina que proporcionan una mayor resistencia a la penetración, degradación e ingestión por parte de los organismos invasores; o química, como la producción, acumulación y liberación de sustancias repelentes para los patógenos (fenoles, terpenos, alcaloides...) que son dispersadas por los distintos tejidos de la planta.

Estos sistemas defensivos pueden ser de dos tipos, constitutivos e inducidos. El sistema de defensa constitutivo (o basal) de mayor importancia en coníferas es la producción de oleorresina, una mezcla de ácidos resinosos y monoterpenos, en los canales resiníferos del floema y del xilema (Phillips & Croteau *et al.*, 1999). Esta resina es un método eficaz de defensa ya que los insectos evitan pinchar en los canales resiníferos durante la puesta y alimentación. En el floema aparecen otras defensas constitutivas como son el esclerénquima, cristales de oxalato, cuerpos fenólicos o estructuras más complejas como canales de resina axiales, canales de resina radiales y ampollas de resina (Franceschi *et al.*, 2005). En el xilema existen canales de resina constitutivos axiales que pueden contribuir al flujo de resina cuando son conectados a los canales radiales que atraviesan entre el xilema y el floema (Franceschi *et al.*, 2005).

Además de estas defensas constitutivas, cuando se produce un daño o agresión en la planta, éstas ponen en marcha un sistema de defensas inducidas. Las defensas inducidas son los cambios que se producen en las plantas después de un daño o agresión, y pueden actuar como defensas incrementando la resistencia de las mismas, al reducir la preferencia o el efecto de los herbívoros en la planta dañada. La defensa inducida más importante en coníferas es la formación de canales de resina traumáticos (inducidos) en el xilema, apareciendo en forma de anillo concéntrico en las proximidades del cambium (Krokene *et al.*, 2003; Byun McKay *et al.*, 2003), y cuya finalidad es aumentar el flujo y la acumulación de resina, y prevenir o responder más eficazmente a futuros ataques (Franceschi *et al.*, 2005). Se conoce bastante de la anatomía, fisiología y papel funcional de los canales resiníferos en otras coníferas, sin embargo no existen publicaciones sobre estos temas en *P. pinaster*.

Otra defensa inducida en coníferas sería la modificación en la concentración de metabolitos secundarios (fenoles y taninos) y fitoalexinas que son compuestos repelentes para los patógenos (Honkanen *et al.*, 1999).

1.4. Evaluación de calidad del material vegetal mediante bioensayos

Como complemento a los estudios de campo, diversos autores han empleado bioensayos con insectos u hongos para comprobar o predecir los patrones observados en el campo (Wainhouse *et al.*, 2004; Wainhouse *et al.*, 1998). Un bioensayo es un proceso experimental mediante el cual se determinan las características y la fuerza de determinada sustancia o desecho metabólico, a través del estudio de sus efectos sobre organismos cuidadosamente escogidos y bajo condiciones específicas de laboratorio (Mata & Quevedo 1998). En particular algunos autores han empleado *H. abietis* como Thackner *et al.* (2003) lo utilizaron para ver que el aceite de *Azadirachta indica* podía actuar de impedimento a la alimentación de *H. abietis*; Bratt *et al.* (2001) después de observar que *H. abietis* atacaba mas a *P. sylvestris* que a *P. contorta* aislaron dos sustancias de la corteza de *P. contorta* y realizo diversos bioensayos para ver si podían alterar la alimentación de *H. abietis*. Borg-karlson *et al.* (2006) utilizaron los bioensayos con *H. abietis* para ver que las heces del insecto poseían sustancias que alteraban su alimentación, aunque ninguno de estos autores ha combinado *H. abietis* con *P. pinaster*, pues la mayor parte de los trabajos se han realizado con *Picea abies* o *P. sylvestris*. Además no conocemos antecedentes de la evaluación mediante bioensayos del status defensivo ni *in vitro* ni *in vivo*.

Desde hace no muchos años se están esclareciendo las rutas metabólicas y los compuestos implicados en la respuesta y producción de mecanismos defensivos (Erbilgin *et al.*, 2006). En particular, se ha descubierto recientemente que algunas sustancias implicadas en estas cascadas metabólicas, como es el caso del ácido jasmónico, cuando son aplicadas de forma exógena elicitán en algunas especies de plantas respuestas defensivas equivalentes a las que generan la herbivoría real (Erbilgin *et al.*, 2006; Zeneli *et al.*, 2006). El metil jasmonato es un elicitador potencial de la planta, que induce amplias reacciones de las defensas, tales como la formación de canales resiníferos traumáticos, un aumento del flujo de resina, la acumulación de mono y diterpenos y el incremento en la cantidad de compuestos fenólicos (Franceschi *et al.*,

2002; Martin *et al.*, 2002), que sirven para proteger a la planta contra insectos o patógenos ,según se ha demostrado en otras coníferas (Kozlowski *et al.*, 1999).

A raíz de este descubrimiento, se está extendiendo su empleo como inductores experimentales de respuestas defensivas como sustitutos de la aplicación de herbivoría real, debido a una mayor operatividad en comparación con la aplicación de animales vivos, que requieren una costosa captura, cultivo y mantenimiento.

HIPOTESIS, JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

2. HIPOTESIS, JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Otros autores han propuesto que la resistencia a plagas podría incluirse en los criterios de selección de los programas de mejora (Alfaro *et al.*, 2004). A la luz de los resultados previos encontrados en el campo sobre el ataque de *H. abietis* en *P. pinaster* y *P. radiata*, y de las heredabilidades observadas, este criterio podría ser aplicado también al plan de mejora de ambas especies en Galicia. Los resultados previos en el campo han mostrado diferencias entre especies e intraespecífica (Zas *et al.* 2005; Zas *et al.* 2007; Sampedro & Zas 2005)

La preferencia de un herbívoro por variantes de sus hospedadores es esperable que esté modulada por diferencias inter e intraespecíficas en la cantidad y calidad de las defensas que las plantas presentan. Además de los sistemas defensivos basales o constitutivos, las defensas inducidas como respuesta a los daños sufridos por las plantas también pueden modificar la preferencia de los herbívoros en ataques subsiguientes. Aparte de la cantidad y calidad de los compuestos defensivos, otros factores como la cantidad de nutrientes en los tejidos o la facilidad de acceso, o manejo del recurso, pueden influir en la calidad de los recursos explotados por insectos herbívoros como *H. abietis*. A pesar de la existencia de información sobre el efecto del Metil Jasmonato en otras especies no poseemos información en concreto sobre *P. pinaster* y con ataque de *H. abietis*

En el contexto de los resultados observados en el campo sobre la intensidad de ataque de *H. abietis* en *P. pinaster* y *P. radiata* comentados anteriormente, y de la información adicional que puedan proporcionar bioensayos realizados en laboratorio, como objetivos específicos en este proyecto nos planteamos responder a las siguientes preguntas:

- 1) ¿Muestra *H. abietis* en bioensayos preferencia entre *P. pinaster* y *P. radiata*?
- 2) ¿Es efectiva la inducción experimental de defensas mediante metil jasmonato (MeJa) sobre la preferencia y tasa de ingestión por parte de este insecto?
- 3) ¿Las preferencias de este insecto en bioensayos evidencian variación intraespecífica entre diversas familias de *P. pinaster* en el nivel de defensas constitutivas e inducidas con MeJa?

METODOLOGIA

3. METODOLOGÍA

Para estos objetivos se realizaron diversos bioensayos con *H. abietis* (Tabla 3.1), tanto “*in vivo*” recluyendo a los insectos sobre el tallo de pinos jóvenes en invernadero, como “*in vitro*”, ofreciéndoles en placas Petri secciones de troncos procedentes de plantas experimentales. Los experimentos “*in vitro*” los dividimos en (i) bioensayos de preferencia (o “*choice*”), que consiste en ofrecerle simultáneamente dos segmentos de tallo para evaluar cual prefiere, y (ii) bioensayos de tasa de ingestión, que consiste en ofrecer un solo nivel del factor al tiempo y analizar el total comido en esa placa. De forma general, los factores experimentales en la oferta de alimento fueron la especie, la familia y el tratamiento con diferentes dosis de MeJa. El diámetro y el peso del insecto en el bioensayo se han incluido como covariables dependiendo del experimento. La variable de medida fue en todos los casos la superficie de floema mordida (mm²).

Tabla 3.1: Esquema de los bioensayos realizados

Experimento	Material Vegetal	Bioensayo	Factores de Estudio
Experimento A. Variación Interespecifica <i>P. pinaster</i> - <i>P. radiata</i>	20 plantas de <i>P. pinaster</i> y 20 plantas de <i>P. radiata</i> de 18 meses en vivero	Bioensayo A1. Bioensayo <i>in vitro</i> de preferencia entre especies	Especie Diámetro
		Bioensayo A2. Bioensayo <i>in vitro</i> de tasa de ingestión	Especie Diámetro
Experimento B. Inducción de defensas con MeJa	8 familias de <i>P. pinaster</i> , de 18 meses en invernadero	Bioensayo C. Bioensayo <i>in vitro</i> de tasa de ingestión	Calibración de la inducción de defensas con MeJa
Experimento C Variación intraespecífica en <i>P. pinaster</i>	18 familias de <i>P. pinaster</i> , de 18 meses en invernadero	Bioensayo B. Bioensayo <i>in vivo</i> en invernadero	Variación familiar Inducción de defensas con MeJa

3.1. Captura y mantenimiento de *Hylobius abietis*

Para la captura de insectos se realizó primero un muestreo con 6 tipos diferentes de trampas (i) trampa con segmentos de corteza (Figura 3.1), (ii) trampa con segmentos de corteza y dos grupos de eppendorf, colocados debajo de la corteza, un grupo con α -pinneno y otro con etanol, (iii) trampa con segmentos de corteza y dos grupos de eppendorf, colocados debajo de la corteza, un grupo con trementina y otro con etanol, (iv) trampa con segmentos de corteza y un chorro por encima de trementina y otro de etanol (v) trampa con ramillas de *P. pinaster* juvenil y un chorro por encima de trementina y otro de etanol (Figura 3.2), (vi) trampa con segmentos de corteza y un atrayente comercial de liberación lenta. La trampa mas efectiva resultó la, (iv), trampa con segmentos de corteza y un chorro por encima de trementina y otro de etanol, y utilizándose esta para la obtención de los adultos *H. abietis* utilizados en los bioensayos.



Figura 3.1: Trampa con corteza



Figura 2.2: Trampa con ramillas

El trampeo se realizó semanas antes de cada ensayo en el monte comunal de Cuspedriños (a 20 km de Pontevedra) colocando las trampas en 5 ubicaciones diferentes, 3 en una zona cercana a una tala (Figura 3.3) y 2 en medio de una población adulta de *P. pinaster* (Figura 3.4), de ese mismo monte. La mejor zona para la captura de insectos fue la situada en medio de una corta de *P. pinaster* o en las cercanías a esta.



Figura 3.3: Trampeo en zona talada de *P. pinaster*



Figura 3.4: Trampeo en zona con adultos de *P. pinaster*

Los insectos capturados se mantuvieron en unas cámaras de cultivos (Figura 3.5), siendo alimentados con tallos de *P. pinaster* juvenil de las mismas condiciones que los utilizados en cada uno de los bioensayos. Se registro una mortalidad de aproximadamente un 4% semanal. Los insectos no se sexaron, pero parece que podría no afectar pues otros autores observaron que no había diferencias significativas en el comportamiento de ambos sexos en bioensayos (Bratt *et al.*, 2001). La población total de insectos disponibles para los bioensayos fue de unos 300 ejemplares, con una biomasa media de 125.7 mg (desviación estándar = 35. 63 mg; moda = 123.8 mg). 48 horas antes de cada ensayo se procedió a meter a los insectos capturados en una cámara refrigerada a 10 °C en la que se habituaban a la temperatura.

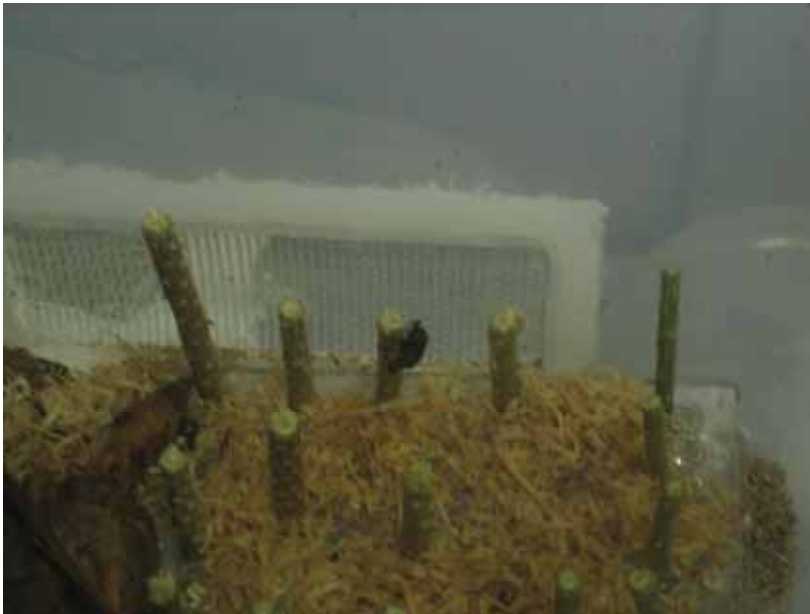


Figura 3.5: Cámara de cultivo de *H. abietis*

3.2. Experimento A.: Variación Interespecifica *P. pinaster* - *P. radiata*

3.2.1. Material Vegetal

El material vegetal constó de 20 plantas de *P. pinaster* y 20 plantas de *P. radiata* de la procedencia Galicia-Costa procedentes del vivero de TRAGSA de Maceda. (42° 15'N, 7° 35'W).

Las semillas fueron sembradas en febrero de 2006 en macetas de 2 l. rellenas con turba y arena y cultivadas en invernadero bajo condiciones controladas de

temperatura, luz, riego y humedad. Las plantas fueron fertilizadas con Multicote 8 (15% N total, 7% pentaóxido de fósforo soluble en citrato amónico neutro y agua, 5.9% pentaóxido de fósforo soluble en agua, 15% óxido de potasio y 2% óxido de magnesio) a los dos meses de su plantación.

3.2.2. Unidades experimentales para los Bioensayos *in vitro*

En los dos bioensayos realizados se ofrecieron al insecto segmentos de tronco de 2,5 cm de largo en placas de Petri plásticas de 10 cm de diámetro, con un papel de filtro en el fondo. Las secciones de tallo fueron fijadas en los bordes de las placas mediante alfileres de colores que identificaban a cada muestra, dispuestas en los cuatro cuadrantes en los experimentos de tasa de ingestión y opuestas en los de preferencia entre dos piezas.

Los experimentos fueron iniciados inmediatamente después de cosechar y trocear las plantas. Durante el tiempo de procesamiento de las plantas, habitualmente unas horas, el material vegetal se mantuvo en una cámara fría a 4 °C. De cada sección de tallo ofrecida como alimento se midió la longitud (en cm) y dos medidas opuestas de los diámetros superior e inferior (en mm) mediante un calibre digital. Una vez establecidas las unidades experimentales, los insectos se pesaron individualmente a la décima de mg y se adjudicaron al azar mediante tablas de números aleatorios a cada una de las unidades experimentales. Se humedeció el papel de filtro y se fijó la tapa a la base de cada placa mediante una tira adhesiva. Las placas se mantuvieron en cajas de cartón a 20 ± 3 °C en oscuridad durante 48 horas hasta finalizar el ensayo.



Figura 3.6: Dispositivos experimentales para el ensayo *in vitro* de preferencia (a) y de tasa de ingestión (b)

De forma general, la variable de medida fue la superficie de floema consumida en mm^2 (“MOR”) en cada sección de tallo ofrecida. Esta variable procede del área relativa mordida en cada tronco, evaluada a partir de cuatro transectos longitudinales en los que se midió en centímetros la superficie de floema consumida. A partir del promedio de esas medidas y de los diámetros superior e inferior de cada fracción de tallo ofrecida (tomados mediante un calibre digital como promedios de dos medidas contrapuestas), se desarrolló el área del tronco de cono de floema consumido para cada fracción de tallo. Esta variable es más informativa que el área relativa, pues incluye una estimación de ingesta absoluta.

3.2.3. Bioensayo A1: Bioensayo de Preferencia entre especies

Las plantas de *P. pinaster* y *P. radiata* se seleccionan y se agrupan en parejas de diámetros basales iguales (medidos con calibre digital). Se cosecharon y de cada planta fueron muestreados segmentos de 2,5 cm de longitud, de la parte inferior, media y superior del tallo. Los segmentos fueron colocados en placas Petri por parejas a las que se le añadió un adulto de *H. abietis*, de peso conocido para que se alimentase durante 48 horas en oscuridad. En cada placa se colocaron 2 segmentos, uno de cada especie de pino y de diámetros equivalentes.

Transcurridas las 48 horas se procedió a evaluar el experimento, midiendo el área mordida por el insecto en cada segmento.

El número total de placas fue:

20 parejas de *P. pinaster* y *P. radiata* x 3 partes del tallo = 60 placas Petri.

3.2.4. Bioensayo A2: Bioensayo de Tasa de ingestión entre especies

Las parejas de *P. pinaster* y *P. radiata* del bioensayo anterior se agruparon en 5 clases diamétricas. Del tallo de cada planta fueron muestreados 5 segmentos de 2,5 cm de longitud. Los segmentos fueron colocados en placas Petri a las que se le añadió un adulto de *H. abietis*, de peso conocido para que se alimentase durante 48 horas en oscuridad. En cada placa se colocaron 4 segmentos, de la misma clase diamétrica, misma especie, diámetros equivalentes y diferente planta.

Transcurridas las 48 horas se procedió a evaluar el experimento, midiendo el área mordida por el insecto en cada segmento.

Las mediciones se realizaron igual que en el experimento A1, explicado en el apartado 3.2.2

El número total de placas fue:

5 clases diamétricas x 5 partes x 2 especies= 50 placas Petri

3.2.5. Análisis estadísticos

Para todos los análisis se empleó el procedimiento GLM del programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, 2000), con los siguientes modelos:

Bioensayo A1 de preferencia entre especies:

Tuvimos en cuenta que las dos medidas de mordeduras dentro de cada placa son dependientes pues el sujeto a estudio es el individuo de *H. abietis* depositado en la placa. Por ello se aplicó un modelo GLM de medidas repetidas, empleando como covariable o predictor continuo la diferencia de diámetros entre los tallos de las dos especies de cada placa, pues en ensayos preliminares habíamos comprobado que el diámetro del tallo ofrecido afecta a la preferencia. La variable de medida fue la superficie de floema consumida. El modelo fue:

$$Y = \mu + \text{Especie}_{\text{RM},2} + \text{Diferencia de diámetros}_{\text{COV}} + \text{Esp} \times \text{Dif Diam} + \text{error.}$$

Asumimos como posible fuente de error que todas las placas que tienen material vegetal con diferentes partes de las mismas plantas son interdependientes, pues no son sino diferentes partes del tallo de las mismas plantas. Pero si incluimos ese factor (Parte) como medida repetida en el diseño no podemos emplear el diámetro como covariable.

Bioensayo A2, de tasa de ingestión entre especies:

En este caso la Especie fue un factor fijo entre sujetos. Como todas las placas que tienen material vegetal con diferentes partes de las mismas plantas son interdependientes, pues no son sino diferentes partes del tallo de los mismos sujetos

experimentales, este factor constituyó una medida repetida, con 5 niveles (desde más basal a más apical). El modelo fue:

$$Y = \mu + \text{Especie} + \text{Parte de la planta}_{\text{RM},5} + \text{error}$$

Para incluir la variación debida cada insecto en la placa, empleamos como variable de medida la superficie total de floema consumida en la placa (la suma del consumo en cada una de las cuatro piezas ofrecidas) dividida entre la biomasa del insecto, puesto que asumimos que covaría con su actividad y no se puede incluir como covariable en este caso debido al diseño de medidas repetidas.

En todos los casos se comprobó la normalidad de las variables mediante el test de Kolmogorov Smirnov y la homogeneidad de varianzas (Test de Levene). En los modelos GLM con tres o más medidas repetidas (RM-ANOVA) se comprobó asimismo el requisito de esfericidad mediante Mauchly test, que se cumplió en todos los casos. Cuando los efectos fueron significativos, las diferencias entre los niveles de un tratamiento se obtuvieron mediante el test HSD de Tukey para las medias.

3.3. Experimento B: Calibración del efecto del Metil Jasmonato como elicitador de respuestas inducidas.

3.3.1. Material Vegetal

El material vegetal constó de 8 familias de polinización abierta de *P. pinaster* procedentes del huerto semillero de Sergude (42.82° N, 8.45° W), con 4 híbridos por familia.

Las semillas fueron sembradas en febrero de 2006 en macetas de 2 l. rellenas con arena y perlita y cultivadas en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura, luz, riego y humedad. Las plantas fueron fertilizadas con Multicote 8 (15% N total, 7% pentaóxido de fósforo soluble en citrato amónico neutro y agua, 5.9% pentaóxido de fósforo soluble en agua, 15% óxido de potasio y 2% óxido de magnesio) a los dos meses de su plantación.

Un año después de la plantación se aplicaron sobre las plantas por pulverización 4 concentraciones distintas de metil jasmonato (MeJa). Las concentraciones de metil

jasmonato fueron 0, 5, 50 y 100 mM (estas concentraciones de MeJa están disueltas en 0,1 % de Tween 20), siendo utilizado como control la concentración 0 mM.

3.3.2. Diseño experimental

Las plantas fueron colocadas al azar en una mesa del invernadero bajo condiciones controladas de temperatura, luz, riego y humedad, siendo el número total de plantas de:

8 familias x 4 tratamientos de MeJa = 32 plantas

3.3.3. Bioensayo B: Bioensayo de Tasa de ingestión

Las plantas fueron cosechadas un mes después de la aplicación de los tratamientos de MeJa. De cada planta fueron muestreados segmentos de 2,5 cm de longitud. También se tomaron, de cada planta, 4 segmentos de 0,5 cm de longitud para calcular la humedad de la planta. Los segmentos fueron colocados en placas Petri, a las que se le añadieron 2 adultos de *H. abietis* para que se alimentasen durante 48 horas en oscuridad. En cada placa se colocaron 8 segmentos, uno de cada familia y todos con el mismo tratamiento de MeJa. Transcurridas las 48 horas se procedió a evaluar el experimento, midiendo el área mordida por el insecto en cada uno de los segmentos.

Las mediciones se realizaron igual que en el experimento A1, explicado en el apartado 3.2.2

El número total de placas fue:

4 tratamientos de MeJa x 5 réplicas = 20 placas Petri

3.3.4. Resinación

El contenido de resina en el tallo se realizó gravimétricamente empleando el protocolo de Wainhouse modificado (Wainhouse et al 2000). Una vez cosechada la planta se tomó una muestra de tallo de unos 8 cm de longitud la cual se cortó en pequeños segmentos. Se colocaron los segmentos de cada muestra en un tubo de ensayo pesado y se recubrió la muestra de madera con Hexano. Después de agitar un poco el tubo de ensayo se colocó en un baño de agua a 40-45 °C durante 15-20 minutos. Mediante un filtrado se extrajeron los segmentos de tallo dejando solo el hexano y la

resina en los tubos de ensayo. Los segmentos de tallo se secaron a 80 °C durante 24 horas obteniendo así el peso del tronco seco. Una vez evaporado el hexano fue pesado nuevamente el tubo de ensayo para obtener el peso de la resina. Con el peso de la muestra seca y el peso de la resina en esa muestra se pudo establecer una relación de peso de resina por peso de tronco seco

El número total de tubos de ensayo:

8 familias x 4 tratamientos = 32 tubos de ensayo

3.3.5. Análisis estadísticos

Para todos los análisis se empleó el procedimiento GLM del programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, 2000), con el siguiente modelo

En este experimento tuvimos serios problemas pues sufrimos un fallo en el dispositivo experimental y se perdió la identificación del factor familia de cada uno de las 8 secciones de tallo que se ofrecieron como alimento en cada placa. Además también perdimos el peso del insecto. Por otra parte, las placas dentro de cada tratamiento son interdependientes por contener diferentes partes de las mismas plantas, y debería ser analizado como medidas repetidas. Debido a las limitaciones del diseño experimental y a los problemas sufridos, para poder analizar los resultados asumimos que incurrimos en pseudoreplicación y consideraremos como independientes las 5 placas con diferentes partes de cada planta. Además, para poder incluir el diámetro de *cada* tronquito, analizamos los valores individuales de cada pieza dentro de la placa, puesto que asumimos que la preferencia de consumo del insecto covaría con el diámetro de cada tallo ofrecido, no con el promedio del diámetro de los tallos incluidos en una placa. Por ello adoptamos como compromiso un modelo GLM con la placa (que incluye información de la actividad de cada insecto) anidada en el factor concentración de Metil jasmonato del tipo

$$Y = \mu + \text{Concentración de MeJa} + \text{Placa}_{\text{ANIDADO}}(\text{MJ}) + \text{Diámetro de cada tronco}_{\text{COV}} + \text{error}$$

Previamente al análisis se comprobó la normalidad de las variables y la homogeneidad de varianzas de la manera explicada en el apartado 3.2.5.

3.4. Experimento C: Variación familiar en *P. pinaster* en el sistema defensivo

3.4.1. Material Vegetal

El material vegetal constó de 18 familias de polinización abierta de *P. pinaster* procedentes del huerto semillero de Sergude. (42.82° N, 8.45° W), con 6 individuos de cada familia.

Las semillas fueron sembradas en febrero de 2006 en macetas de 2 l. rellenas con arena y perlita y cultivadas en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura, luz, riego y humedad. Las plantas fueron fertilizadas con Multicote 8 (15% N total, 7% pentaóxido de fósforo soluble en citrato amónico neutro y agua, 5.9% pentaóxido de fósforo soluble en agua, 15% óxido de potasio y 2% óxido de magnesio) a los dos meses de su plantación.

En junio de 2007 se aplicaron sobre las plantas por pulverización 2 concentraciones distintas de metil jasmonato (MeJa). Las concentraciones de metil jasmonato fueron 0 y 100 mM (estas concentraciones de MeJa están disueltas en 0,1 % de Tween 20), siendo utilizado como control la concentración 0 mM

3.4.2. Diseño experimental en invernadero

Las plantas fueron colocadas al azar en una mesa del invernadero bajo condiciones controladas de temperatura, luz, riego y humedad, siendo el número total de plantas:

18 familias x 6 réplicas = 108 plantas

3.4.3. Bioensayo C: Bioensayo *in vivo* de variación familiar en *P. pinaster* en el sistema defensivo

Dos meses después de la aplicación de los tratamientos se colocaron 2 adultos de *H. abietis*, con peso conocido y escogido al azar, sobre un segmento de 25 cm de tallo. Para poder colocar el insecto directamente sobre la planta y recluirlo en una zona determinada se utilizó una media, para no dañar a la planta, se cortó la parte superior de vasos de litro de plástico y se pusieron en la parte superior e inferior de la zona experimental colocándole la media por encima, para evitar que la media oprimiese las

acículas, después la media se fijo mediante unas presillas en la zona inferior y superior al tallo de la planta (Figuras 3.7 y 3.8). Dejamos que los insecto se alimentaran durante 48 horas en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura, luz, riego y humedad.

Las mediciones se realizaron igual que en los experimentos anteriores, explicado en el apartado 3.2.2. Además para medir el área mordida se utilizo plantilla flexible con cuadrados de 1 mm^2 con la que se contaron los cuadrados comidos en cada segmento, sabiendo que cada cuadrado equivalía a 1 mm^2 .

Transcurridas las 48 horas se procedió a evaluar el experimento, cortando la zona recluida en la media y midiendo el área mordida por el insecto en cada segmento.

3.4.4. Resinación

El contenido de resina en el tallo se realizó gravimetricamente empleando el protocolo de Wainhouse modificado (Wainhouse et al 2000). Una vez cosechada la planta se tomó una muestra de 8 cm de longitud, de la parte inferior del tallo por debajo de la zona experimental, y se analizó el contenido en resina tal como se describe en el apartado 3.3.4

El número total de tubos de ensayo fue de:

18 familias x 3 bloques x 2 tratamientos de MeJa x 2 muestras = 216 tubos de ensayo



Figura 3.7: Reclusión de *H. abietis* en *P. pinaster*



Figura 3.8: Grupo de plantas para el ensayo *in vivo*

3.4.5. Análisis estadísticos

Para todos los análisis se empleó el procedimiento GLM del programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, 2000), con el siguiente modelo

Como los bloques (cada uno con una planta de cada una de las 18 familias consideradas) sobre los que se aplicaron los tratamientos de metil jasmonato se distribuyeron al azar en la mesa del invernadero sin un diseño subyacente, el modelo empleado en el análisis fue un modelo GLM factorial sencillo en el que se incluyó la biomasa de los insectos depositados en cada planta como covariable:

$$Y = \mu + \text{Aplicación de MeJa} + \text{Familia} + \text{MeJa} \times \text{Fam} + \text{Biomasa insecto}_{\text{COV}} + \text{error}$$

La variable de medida fue la superficie de floema consumido.

Este mismo modelo, sin la covariable, se empleó para el análisis del contenido gravimétrico de resina, medido en las plantas una vez cosechadas, en la zona expuesta al insecto y en la zona no expuesta.

Previamente al análisis se comprobó la normalidad de las variables y la homogeneidad de varianzas de la manera explicada en el apartado 3.2.5

RESULTADOS Y DISCUSION

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Objetivo 1. Preferencia interespecífica de *H. abietis* entre *P. pinaster* y *P. radiata*

Para el estudio de la preferencia interespecífica de *H. abietis* entre *P. pinaster* y *P. radiata* se realizaron dos bioensayos, uno de preferencia (*choice test*) donde a cada individuo de *H. abietis* se le ofrece las dos especies, y otro de tasa de ingestión, en la que a cada individuo se le ofrece una de las dos especies.

En ambos tipos de experimentos los resultados del análisis de varianza indican una diferencia significativa entre especies en el área comida por el insecto (Tabla 4.1, Tabla 4.2), revelando una clara variación interespecífica en la preferencia del insecto. En los dos experimentos, *H. abietis* prefirió claramente a *P. pinaster* que a *P. radiata*, consumiendo 1,5 y 1,25 veces más de la primera que de la segunda en el ensayo de preferencia (Figura 4.1) y de la tasa de ingestión (Figura 4.2), respectivamente.

Tabla 4.1. Resultados del GLM aplicado a preferencia interpecífica de *H. abietis*, medida como superficie de floema de cada especie consumido (mm²), ofrecidas simultáneamente al mismo individuo en un bioensayo de alternativa (“*choice test*”).

Efecto	G. L.	MS	F	<i>p</i>
<i>Entre sujetos</i>				
Diferencia de diámetros	1	5.80	0.24	0.628
Error	58	24.55		
<i>Intrasujetos</i>				
Especie	1	397.2	6.57	0.013
Especie * Dif. Diam.	1	209.3	3.46	0.068
Error	58	60.4		

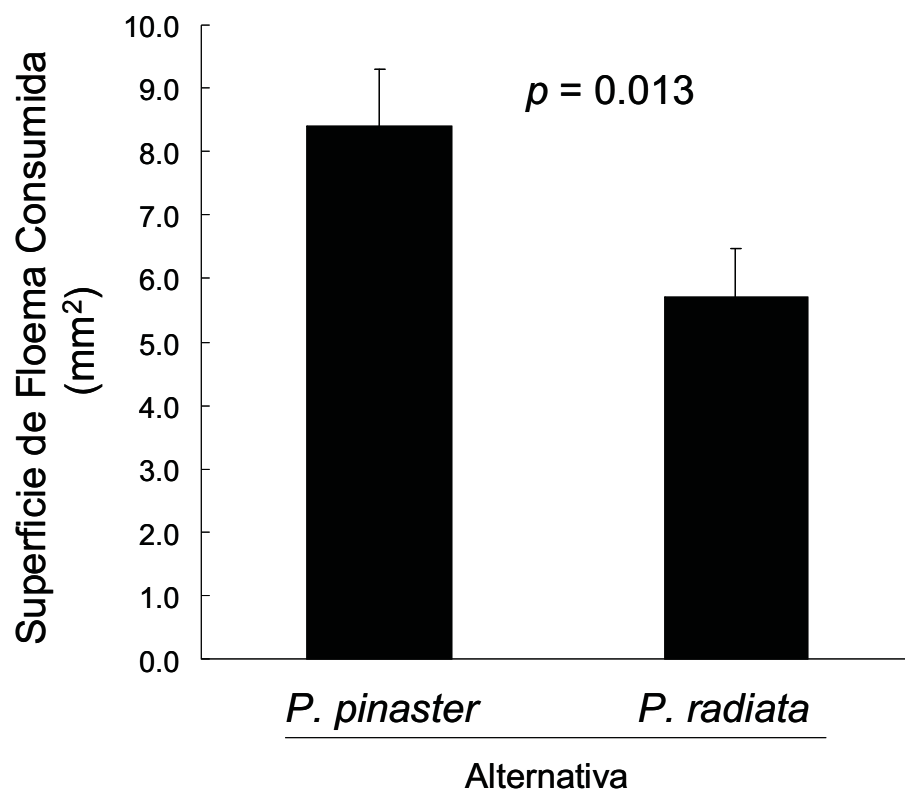


Figura 4.1. Preferencia de consumo del curculiónido *H. abietis* entre *P. pinaster* y *P. radiata* cuando se ofrecen las dos especies simultáneamente a cada insecto en un ensayo de alternativa (*choice test*). LS means \pm s.e.m.; N = 60.

Tabla 4.2. Resultados del GLM aplicado a preferencia interpecífica de *H. abietis*, medida como la superficie total de floema consumido en cada unidad experimental corregida por el peso del insecto (mm² mg⁻¹), en un bioensayo de tasa de consumo, donde a cada individuo solo se le ofrece una especie.

Efecto	G. L.	MS	F	<i>p</i>
<i>Entre sujetos</i>				
Especie	1	0.045	7.9	0.022
Error	8	0.006		
<i>Intrasujetos</i>				
Parte de la planta	4	0.004	0.638	0.639
Especie * Parte	4	0.005	0.793	0.538
Error	32	0.006		

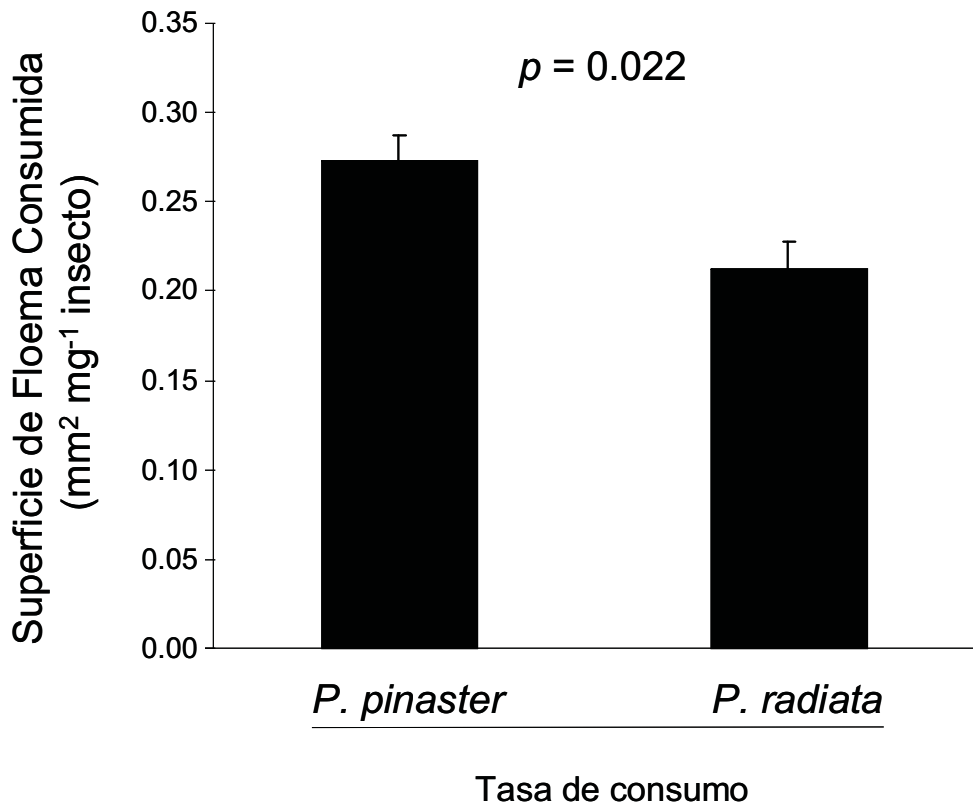


Figura 4.2. Preferencia en la tasa de consumo del curculiónido *H. abietis* entre *P. pinaster* y *P. radiata* cuando se ofrece una sola especie a cada insecto. LS means \pm s.e.m.; N = 5.

Nuestros resultados indican que la especie autóctona (*P. pinaster*) fue más atacada que la alóctona (*P. radiata*). Este resultado es coherente con la hipótesis *Enemy Release Hypothesis* (ERH) que predice que las especies forestales al sacarlas de su rango natural sufren una menor presión por parte de los insectos plaga, ya que éstas son alejadas de sus enemigos naturales (Lombardero and Vázquez, 2007). En los bioensayos realizados en este estudio, las diferencias en la preferencia del curculiónido *H. abietis* entre *P. pinaster* y *P. radiata* pueden deberse a una variación en la atracción, en la palatabilidad, en la calidad nutritiva de los tejidos o en las defensas constitutivas e inducidas. En el caso de los sistemas defensivos, la coevolución entre los insectos y las plantas determinaría, de manera notoria, la preferencia entre diferentes especies. Las respuestas inducidas, previsiblemente más eficaces en la especie autóctona que ha convivido con el insecto durante cientos de años (*P. pinaster*), modificarían la susceptibilidad de las plantas. En este sentido, Sampedro y Zas (2005) en un ensayo de campo con varias familias de *P. pinaster* y *P. radiata*, observaron que *H. abietis* atacó significativamente más a *P. radiata*, sugiriendo que existe una mayor eficacia del sistema inducido como respuesta adaptativa a la presión del insecto en la especie que ha

convivido con él. Estos resultados aparentemente contradictorios podrían explicarse por un distinto papel adaptativo de las defensas constitutivas e inducidas. En posteriores estudios convendría comprobar si la preferencia observada se altera tras la inducción de defensas.

4.2. Objetivo 2. Calibración mediante bioensayos con *H. abietis* de la efectividad del Metil Jasmonato como elicitador de respuestas inducidas en *P. pinaster*

La aplicación exógena de metil jasmonato (MeJa) sobre juveniles de *P. pinaster* modificó de forma clara y significativa ($p < 0.0001$) el contenido de resina en los tallos (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Efecto de la concentración de metil jasmonato en aplicación foliar disuelto en Tween20® sobre la inducción de respuestas defensivas en juveniles de *P. pinaster*, medidas como el contenido gravimétrico de resina en el tallo (mg resina g⁻¹ peso seco).

Efecto	G. L.	MS	F	<i>p</i>
Concentración de MeJa	3	78.11	12.79	0.00002
Error	28	6.11		

La comparación entre las distintas concentraciones de MeJa aplicadas se refleja en la Figura 4.3. La aplicación de MeJa incrementó significativamente el contenido en resina, siendo este incremento proporcional a la concentración de MeJa en la solución aplicada. El contenido de resina de las plantas tratadas con MeJa fue hasta más del doble que las plantas control.

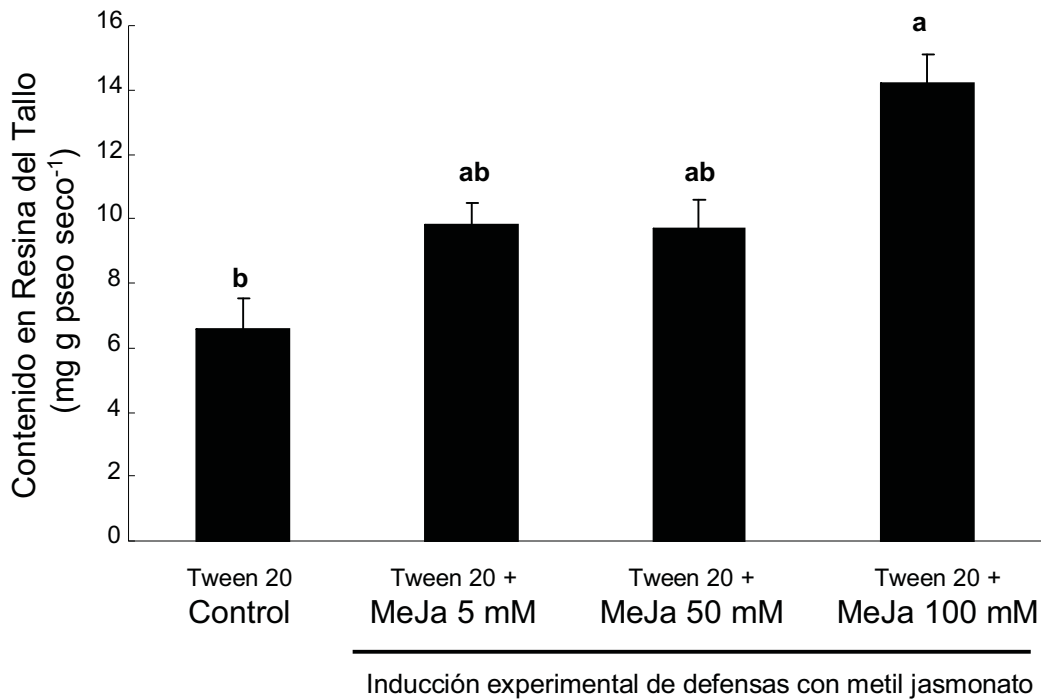


Figura 4.3. Efecto de la concentración de metil jasmonato en aplicación foliar disuelto en Tween20® sobre la inducción de respuestas defensivas en juveniles de *P. pinaster*. Media \pm s.e.m.; N = 8. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, Test de Tukey, $p < 0.05$.

El efecto de la aplicación de MeJa sobre las plantas de *P. pinaster* también afectó de forma significativa ($p < 0,05$) al consumo de individuos de *H. abietis* en el bioensayo realizado (Tabla 4.4). El insecto comió significativamente más sobre las plantas control y redujo hasta un 70% su alimentación en las plantas con respuestas inducidas por MeJa (Figura 4.4).

Tabla 4.4. Efecto de la concentración de metil jasmonato en aplicación foliar disuelto en Tween20® sobre la efectividad de la inducción de respuestas defensivas en juveniles de *P. pinaster*, medida como la tasa de consumo de *H. abietis* en bioensayos.

Efecto	G. L.	MS	F	<i>p</i>
Concentración de MeJa	3	88.7	3.16	0.026
Placa(MeJa)	16	41.6	1.48	0.1142
Diámetro	1	2959.6	105.59	0.000
Error	139	28.03		

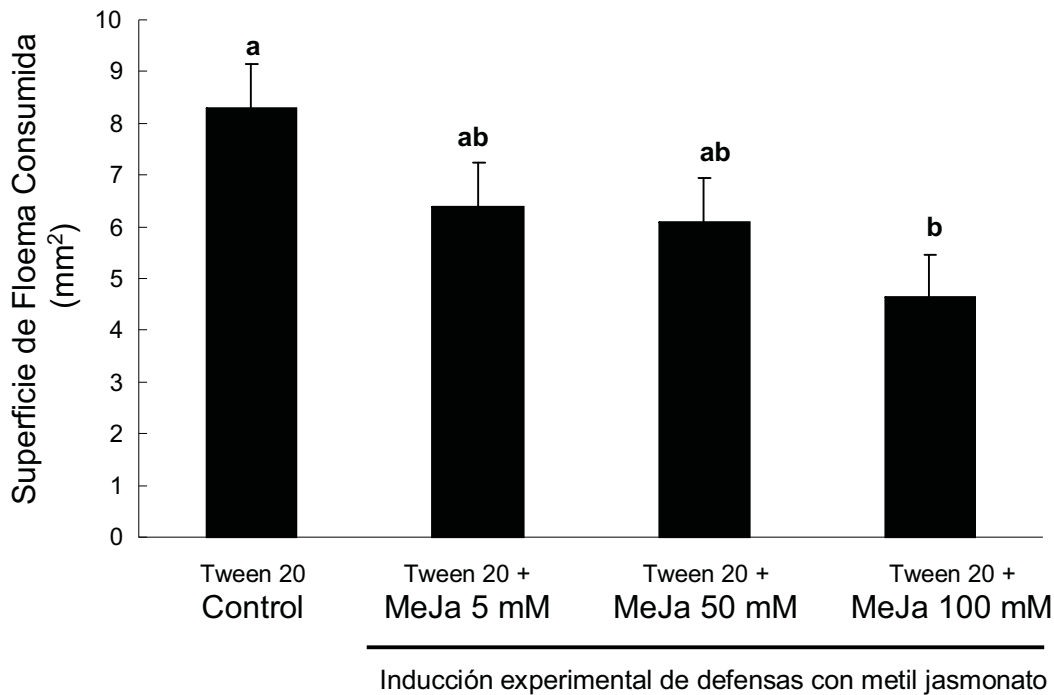


Figura 4.4. Efecto de la concentración de metil jasmonato en aplicación foliar disuelto en Tween20® sobre la efectividad de la inducción de respuestas defensivas en juveniles de *P. pinaster*, medida como la tasa de consumo de *H. abietis* en bioensayos. LS means \pm s.e.m.; N = 40. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, Test de Tukey, $p < 0.05$.

La inducción de la síntesis y acumulación de resina tras la aplicación de MeJa también se observó en el bioensayo factorial MeJa x Familia (Tabla 4.5). Las plantas tratadas con MeJa mostraron concentraciones de resina significativamente superiores a las plantas control, con un aumento de aproximadamente el 40% (Figura 4.5). Conviene señalar que los valores absolutos del contenido en resina en ambas colecciones de plantas fueron equivalentes, pasando del orden de 6-9 mg g⁻¹ en las plantas control a 14-15 mg g⁻¹ en las plantas tratadas con MeJa a una concentración 100 mM.

Tabla 4.5. Efecto de la aplicación de metil jasmonato 100 mM (en aplicación foliar disuelto en Tween20®) en juveniles de *P. pinaster* sobre el contenido gravimétrico de resina en el tallo (mg resina g⁻¹ peso seco de tallo).

Efecto	G. L.	MS	F	<i>p</i>
Aplicación de MeJa	1	455.7	17.197	0.0001
Familia	17	20.0	0.754	0.737
MeJa x Familia	17	39.7	1.498	0.120
Error	72	26.5		

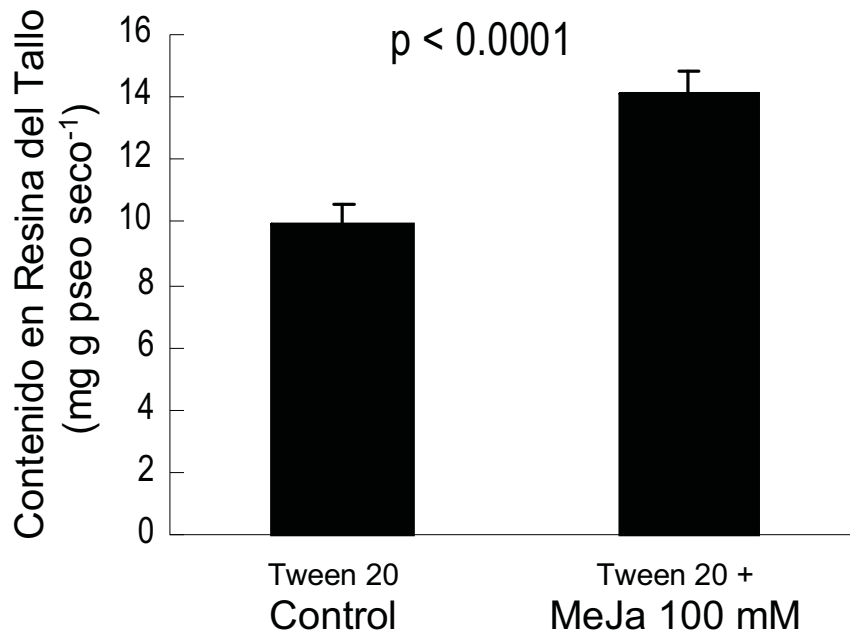


Figura 4.5. Efecto de la concentración de metil jasmonato 100 mM en aplicación foliar disuelto en Tween20® sobre la inducción de respuestas defensivas en juveniles de *P. pinaster*. LS means \pm s.e.m.; N = 54.

Al igual que lo descrito en el bioensayo A1, en el ensayo factorial MeJa x Familia, la respuesta a la aplicación exógena de MeJa se plasmó en la tasa de consumo de *H. abietis* en el bioensayo realizado *in vivo*, donde se evalúa la superficie comida por el insecto sobre un tramo de tallo aislado de la planta viva (Tabla 4.6). Como en el caso anterior, *H. abietis* comió más a las plantas control que a las plantas con respuestas inducidas por MeJa (Figura 4.6).

Tabla 4.6. Efecto de la inducción de respuestas defensivas en juveniles de *P. pinaster* mediante la aplicación de metil jasmonato 100 mM (en aplicación foliar disuelto en Tween20®) sobre la tasa de consumo de *H. abietis* en un bioensayo en planta viva en invernadero.

Efecto	G. L.	MS	F	<i>p</i>
Aplicación de MeJa	1	4119	4.12	0.045
Familia	17	784	0.78	0.704
MeJa x Familia	17	578	0.58	0.897
Peso Insecto	1	1274	1.27	0.263
Error	71	999		

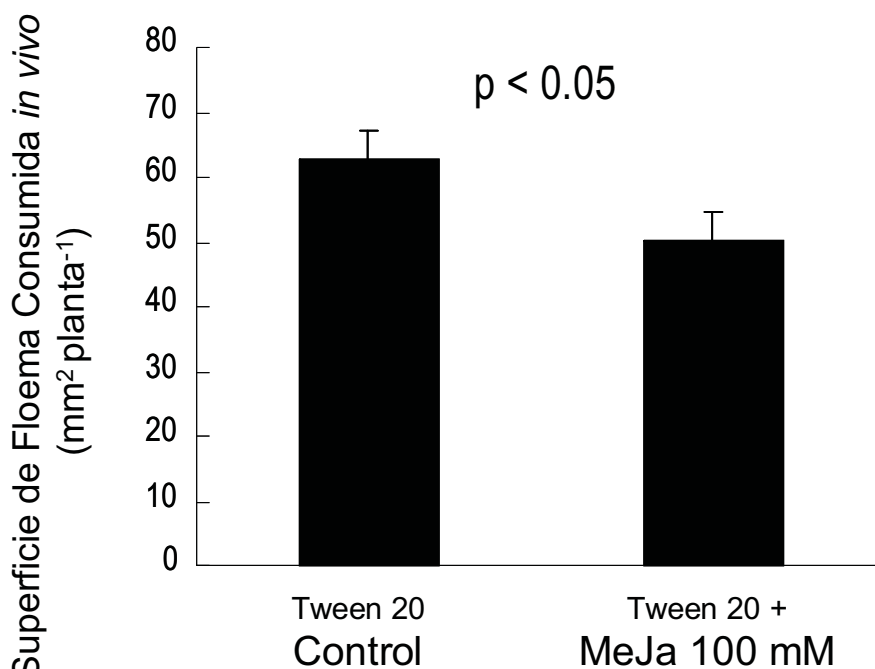


Figura 4.6. Efecto de la inducción de respuestas defensivas en juveniles de *P. pinaster* mediante la aplicación de metil jasmonato 100 mM (en aplicación foliar disuelto en Tween20®) sobre la tasa de consumo de *H. abietis* en un bioensayo en planta viva en invernadero. LS means \pm s.e.m.; N = 54.

Estos resultados son coherentes con los obtenidos por otros autores. Martin et al. (2002) observaron un aumento en la síntesis y acumulación de resina después de la aplicación de MeJa en abetos. La respuesta de estas plantas fue la formación de canales de resina traumáticos en el xilema (inducidos) que aumentaban el flujo de resina ayudando de este modo a responder más eficazmente al ataque de insectos y patógenos. En este mismo sentido, Hudgins et al. (2004) observaron que aplicando metil jasmonato en varias especies de coníferas aumentaba significativamente la concentración de resina, fenoles y otros sistemas defensivos. Por otro lado la elicitación de respuestas defensivas provocada por MeJa afecta a la dinámica poblacional de insectos y patógenos. Heijari et al. (2005) observaron que aplicando diferentes concentraciones de MeJa (0, 10 y 100 mM) a *Pinus sylvestris* de dos años de edad se reducía significativamente el área de corteza comida por *H. abietis*, siendo menor el daño a medida que se aumentaba la concentración de MeJa. Sin embargo, y a pesar de que existen varias referencias sobre estos efectos en otras coníferas, este es el primer trabajo que estudia el efecto de la aplicación de MeJa en juveniles de *P. pinaster*.

4.3. Objetivo 3. Evaluación de la variación intraespecífica (familiar) en el sistema defensivo constitutivo e inducido de *P. pinaster* mediante bioensayos con *H. abietis*

El análisis de varianza del bioensayo *in vivo* MeJa x familia (Bioensayo C) no detectó diferencias significativas entre las familias de *P. pinaster* en su sistema defensivo, evaluado éste según la tasa de ingestión del insecto (Tabla 6). La inducción de defensas tras la aplicación de MeJa, que se reflejó significativamente en el consumo del herbívoro (Tabla 4.6), generó una fuente de variación extra que dificultó la detección de variación familiar. Probablemente el número de individuos de cada familia (n=6) es insuficiente para detectar diferencias. Además, esta inducción de defensas pudo variar entre las distintas familias y, aunque la interacción MeJa x familia no resultó significativa (Tabla 4.6), cuando representamos la superficie comida por el insecto en las plantas control (Figura 4.7a) y en las plantas tratadas con MeJa (Figura 4.7b) se observa cierta variación entre las distintas familias. En estas gráficas, cada familia está representada por tan sólo 3 individuos, probablemente insuficientes para detectar variación genética.

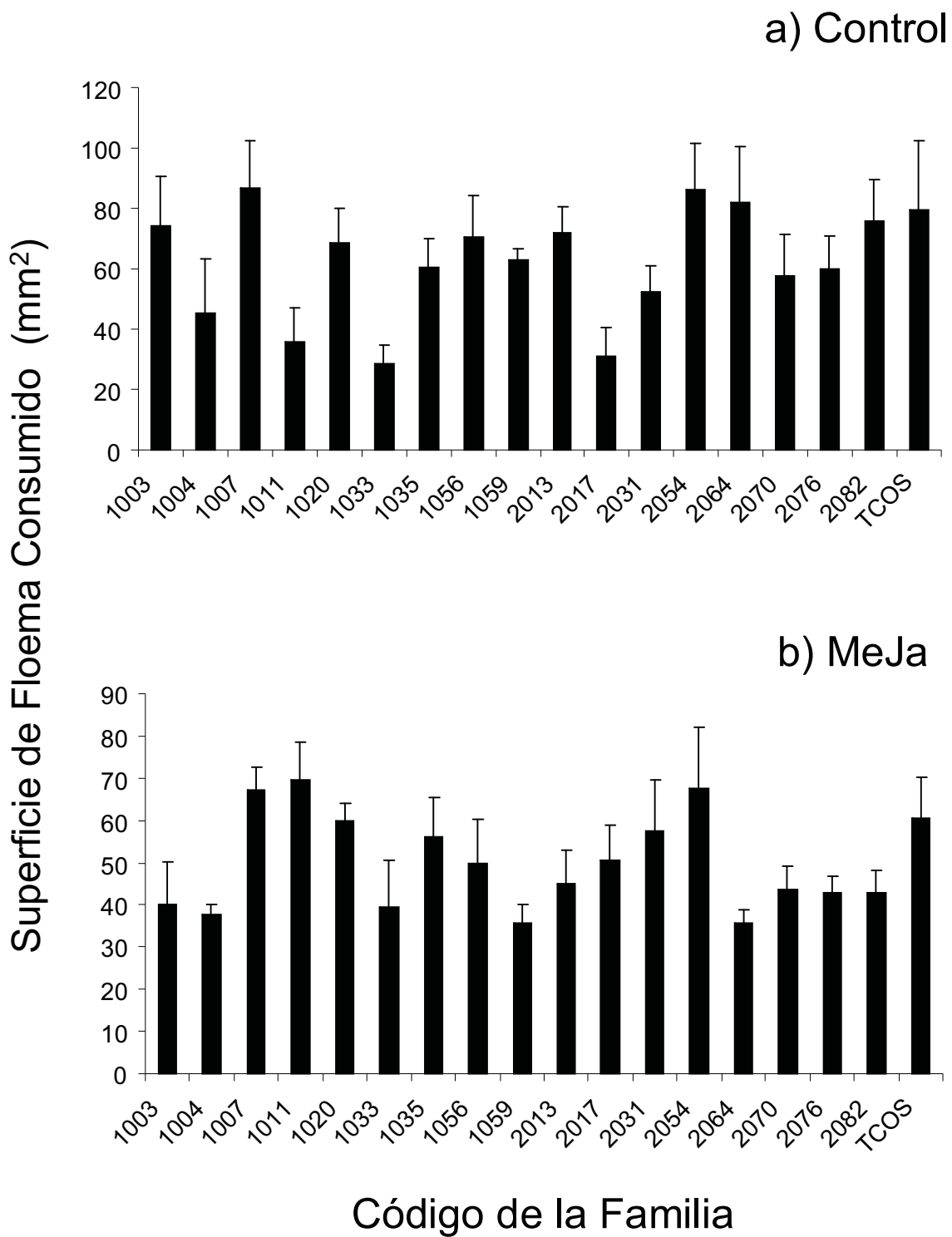


Figura 4.7. Superficie de floema consumida por *H. abietis* en juveniles de *P. pinaster* pertenecientes a 18 familias de polinización abierta. El consumo fue mayor en las plantas que no expresaron defensas inducidas por el metil jasmonato (a) control; $F_{1,71} = 4.12$; $p = 0.045$), pero no hubo diferencias significativas entre familias ($F_{17,71} = 0.78$; $p > 0.05$).

Aunque en este trabajo no encontramos diferencias familiares significativas en el ataque del insecto, Zas et al (2005) observaron una importante variación genética en el ataque del curculiónido *H. abietis*, obteniendo heredabilidades individuales de 0,2 y heredabilidades familiares de 0,8 para *P. pinaster* y *P. radiata*. La variación genética en el ataque de insectos en plantas ha sido comúnmente observada durante décadas por varios autores como King et al. (1997) en abetos atacados por el curculiónido *P. strobi*, Rapley et al. (2004) en eucaliptos atacados por *Chrysophtharia agrícicola* o Yanchuk et al. (2007) en pinos atacados por el coleóptero *Dendroctonus ponderosae*.

A pesar de que no se detectaron diferencias significativas en el consumo de *H. abietis* entre las distintas familias, cuando representamos conjuntamente la superficie comida en las plantas control y en las plantas con defensas inducidas, se observa un patrón especialmente llamativo (Figura 4.8). En primer lugar se observa, como ya se comentó, que el insecto comió más en las plantas control que en las tratadas con MeJa, aunque estas diferencias no se observaron en todas las familias. En segundo lugar la diferencia, a nivel familiar, entre el área comida en las plantas control y en las plantas tratadas con MeJa parece covariar con el área comida en el primer tipo de plantas. En la Figura 9 las familias se han ordenado en el eje x según estas diferencias, observándose una tendencia a menor área consumida en las plantas control hacia la derecha. Esto puede verse de forma más clara en la Figura 10 donde se representa la relación entre el área comida en las plantas control y las diferencias en el área comida entre las plantas control y las tratadas con MeJa. La primera variable (eje x) refleja la capacidad defensiva constitutiva de cada familia mientras que la diferencia entre las plantas control y las tratadas (eje y) indica la eficacia de la expresión de las defensas inducidas en cada familia. Se observa una relación altamente significativa y negativa entre ambas estrategias defensivas. Las familias con mayor capacidad defensiva constitutiva tienen menor capacidad de respuesta, mientras que las más susceptibles a priori son más capaces de desencadenar defensas inducidas efectivas ante la aplicación de MeJa.

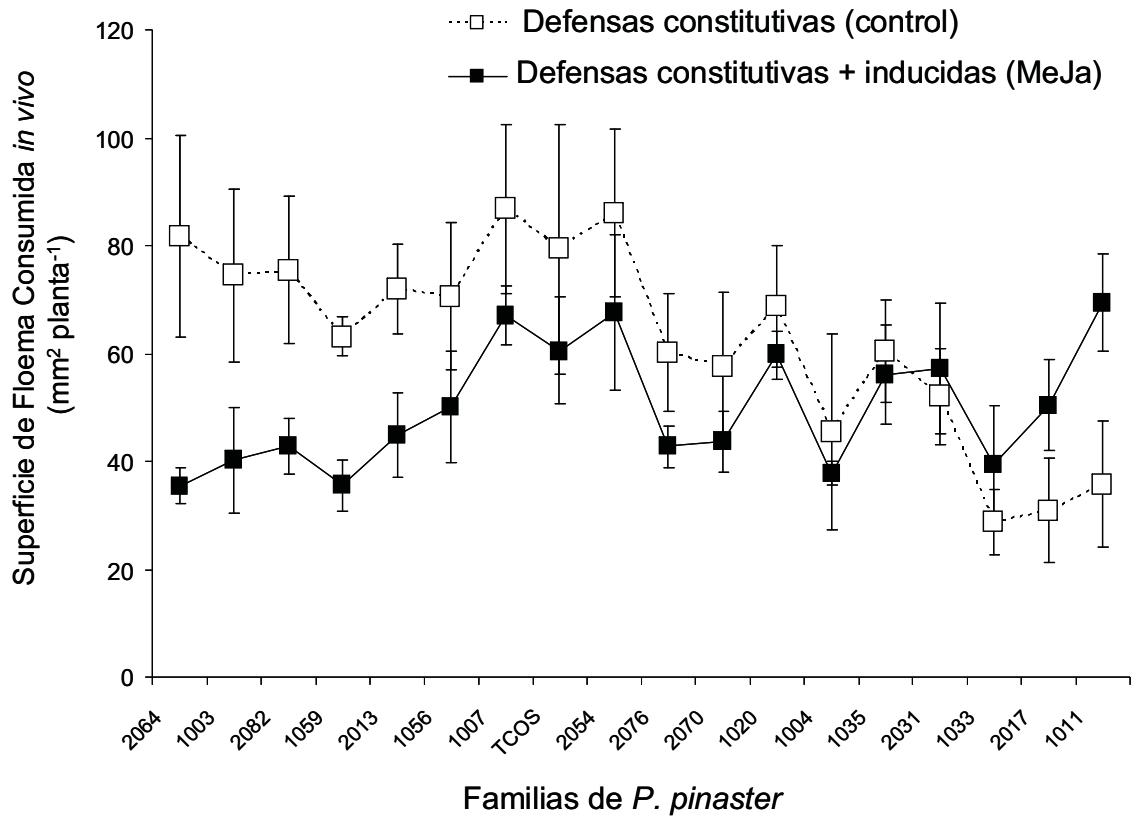


Figura 4.8. Superficie de floema consumida por *H. abietis* en juveniles de *P. pinaster* pertenecientes a 18 familias de polinización abierta. El consumo fue mayor en las plantas que no expresaron defensas inducidas por el metil jasmonato (cuadros blancos; $F_{1,71} = 4.12$; $p = 0.045$), pero no hubo diferencias significativas entre familias ($F_{17,71} = 0.78$; $p > 0.05$).

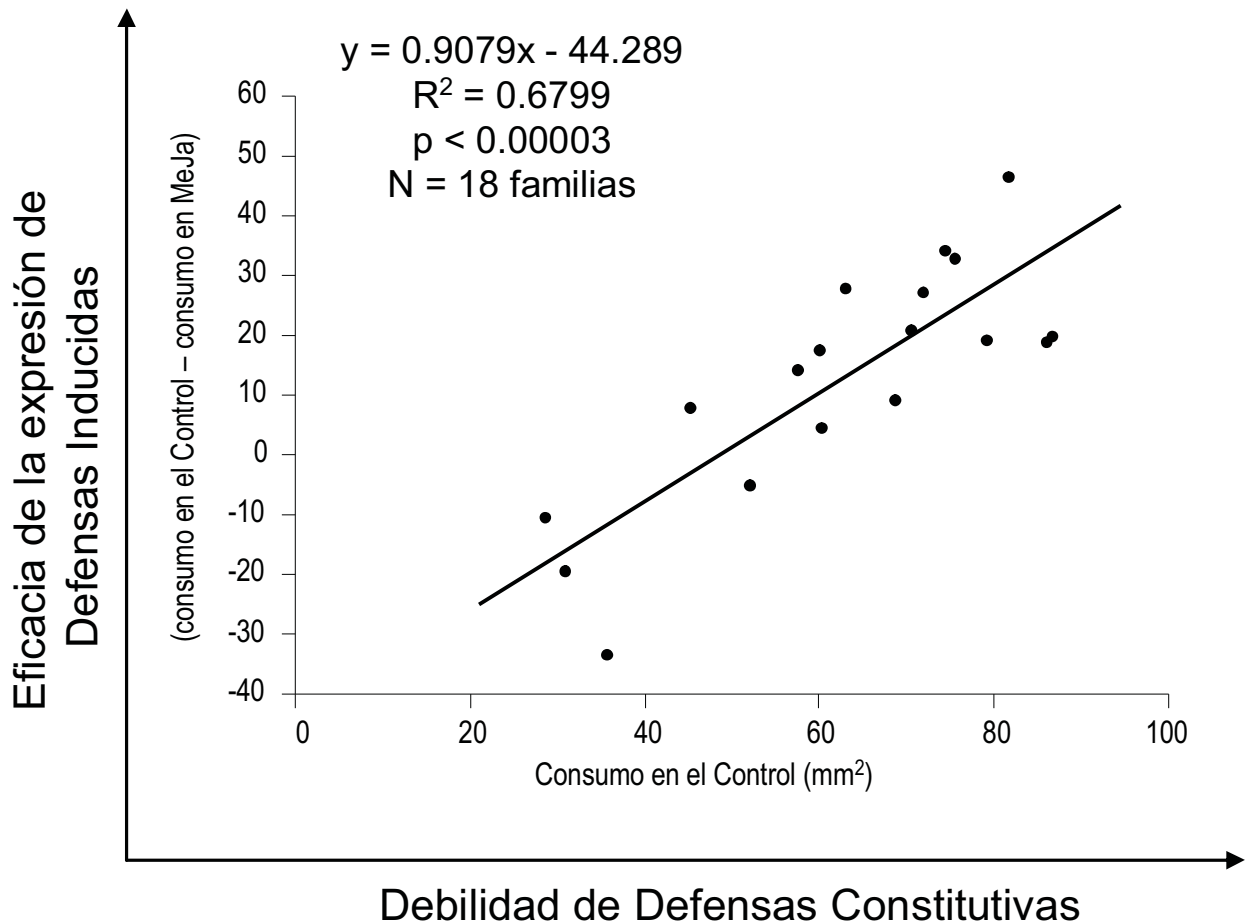


Figura 4.9. Relación entre la intensidad de la expresión de defensas inducidas en juveniles de *P. pinaster*, medida como la reducción del consumo en plantas con defensas inducidas por metil jasmonato, y la expresión de defensas constitutivas, medida como sensibilidad al consumo por *H. abietis*. La relación es fuerte y positiva, evidenciando un compromiso entre estas dos estrategias defensivas.

Estos resultados son acordes con los compromisos evolutivos entre distintos mecanismos defensivos que predicen múltiples teorías ecológicas (Koricheva et al, 2004). Cualquier sistema defensivo es costoso para la planta. Las plantas han de equilibrar el reparto de los escasos recursos disponibles entre crecer, reproducirse y defenderse. Un reparto excesivo hacia los sistemas defensivos puede resultar en una disminución de la eficacia biológica en ausencia de agresores, y por ello se asume que los sistemas de defensa tienen un coste (Koricheva et al., 2002). Por el mismo motivo se ha postulado que los distintos mecanismos de defensa compiten entre sí por los mismos recursos y, en la medida que éstos resulten redundantes, se producirá un compromiso evolutivo entre ellos. Sin embargo, la redundancia de los distintos mecanismos de una planta no está clara, y en general, el desarrollo de múltiples mecanismos solapados

puede ser imprescindible para una correcta defensa, en especial si se considera el amplio espectro de agresores a los que están expuestas las plantas, y en particular las coníferas, por su gran tamaño y largo ciclo de vida. Además, los distintos mecanismos de defensa pueden tener otros beneficios para la planta en ausencia de un agresor, como son la protección de la radiación ultravioleta, la resistencia al frío, etc. (Strauss & Zangerl 2002). Por todo ello, los resultados sobre las relaciones (genéticas) entre distintos mecanismos de defensa son contradictorias y los compromisos evolutivos entre ellos no se pueden generalizar (Koricheva et al, 2004). Sin embargo, en un reciente meta-análisis, sí se demuestra un compromiso entre los sistemas de defensa constitutivos e inducidos en las plantas (Koricheva et al, 2004). Aunque la relación entre defensas constitutivas e inducidas resultó significativa y negativa, la variación en los sistemas de defensa constitutivos explica, en promedio, sólo un 20,5% de la variación en los sistemas de defensa inducidos, por lo que Koricheva et al (2004) sugieren que otros factores (e.g. la variación ambiental) pueden ser más determinantes de la capacidad de defensa inducida. En nuestro caso, la relación fue mucho más estrecha, con un coeficiente de determinación (r^2) próximo al 70%, sugiriendo que, en el caso de *P. pinaster*, y bajo un ambiente homogéneo y controlado, el compromiso entre ambas estrategias es mucho más evidente que lo observado hasta ahora.

4.4. Discusión de problemas metodológicos

La realización de bioensayos con *H. abietis* resulta factible gracias a la facilidad de captura del insecto, a su bajo coste de mantenimiento y su gran voracidad.

En los trampeos previos realizados se concluyó que el método de captura de insectos con corteza mojada en trementina y etanol resultó ser el más efectivo, y con una mayor probabilidad de éxito si es realizado en una zona cercana a una corta o tala de *P. pinaster*. Debido a la alta cantidad y probabilidad de captura de insectos al día estos bioensayos pueden llevarse a cabo sin tener demasiadas complicaciones en la obtención del insecto, ni necesidad de realizar grandes trampeos para obtener los individuos necesarios.

El mantenimiento de los insectos tampoco fue ningún impedimento pues tuvieron una alta tasa de supervivencia en las cámaras de cultivo, pudiendo alimentarlos tanto de planta recién cosechada como de planta proveniente del congelador. A pesar de

esto los insectos llegaron a sufrir un cierto nivel de estrés al no tener un sitio adecuado para realizar la hibernación y la puesta. Por lo que se puede mantener un cultivo de insectos durante cierto tiempo para la realización de varios bioensayos.

Además el insecto resultó ser fácil de manipular, muy activo y voraz. En las pruebas previas constatamos que no resultaba muy estresable si se manipulaba con cuidado, pues comenzaba a alimentarse en la primera hora después de la oferta de alimento. Esto nos facilita el tiempo de los bioensayos, pudiendo llegar a evaluarlo tras solo 48 horas experimentales.

Sin embargo para futuros experimentos se debería tener en cuenta la posibilidad de sexar los insectos, aunque otros autores en estudios previos no observaran diferencias significativas (Bratt *et al.*, 2001), para controlar mejor la variabilidad entre individuos.

Por otra parte, los dispositivos experimentales utilizados en los bioensayos resultaron también operativos, fáciles de implementar y muy eficaces.

El dispositivo utilizado para recluir a los insectos en el bioensayo *in vivo* fue efectivo, y fácil de implementar por su sencillez de realización, posibilitando realizar bioensayos directamente sobre planta viva, aunque debe ser mejorado porque las medias acabaron siendo perforadas y permitiendo escapar a varios insectos.

Además el sistema de identificación de los segmentos de tallo mediante alfileres de colores resultó ser fácil de utilizar y con una gran utilidad, permitiendo distinguir cada uno de los segmentos sin dificultad. Ofreciendo una posición fija de cada segmento, pero permitiendo al insecto manipular igualmente el alimento y poder atacar a toda la superficie del segmento de tallo ofrecido.

La evaluación del daño realizado por el insecto mediante los cuatro transectos resultó ser precisa y relativamente sencilla de llevar a la práctica, pero con el problema de que al carecer de información del grosor del floema consumido podría conducir a diferentes consumos para una misma superficie de corteza, por poder ser diferente la profundidad de la herida ocasionada.

A pesar de que los dispositivos utilizados para realizar los bioensayos fueron un éxito nos encontramos con ciertas dificultades en la elaboración de los diseños experimentales, resultando difícil al tener que optar por compromisos entre el número de replicas (normalmente limitado por la disponibilidad de insectos y de material vegetal), la variación genética y ambiental entre los insectos y la variación dentro y entre cada planta ofrecida. Además en una placa Petri en la que un insecto se alimenta de dos o más trozos de tallo se superponen dos niveles de información: uno informa de

la palatabilidad relativa entre las dos o más plantas ofrecidas, y otro informa de la ingesta absoluta en esa determinada placa.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1.- La captura de *H. abietis* con las trampas de trementina resultó ser sencilla, capturando un elevado número de individuos al día sin necesidad de realizar grandes trampeos.

2.- Los bioensayos *in vitro* e *in vivo* con *H. abietis* pueden ponerse en práctica por la facilidad de captura del insecto, por su bajo coste de mantenimiento y su gran voracidad.

3.- El curculiónido *H. abietis* muestra una clara preferencia interespecífica de entre *P. pinaster* y *P. radiata* en los bioensayos *in vitro*

4.- El efecto del Metil jasmonato resulta efectivo al inducir defensas en *P. pinaster*, aumentando la cantidad de resina en los árboles tratados, reduciendo el ataque de *H. abietis*

5.- No existió una variación genética significativa en las defensas constitutivas ni inducidas en *P. pinaster*, pero se pudo observar un compromiso entre ambas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alfaro, R. I., L. vanAkker, B. Jaquish & J. King, 2004. Weevil resistance of progeny derived from putatively resistant and susceptible interior spruce parents. *Forest Ecology and Management* 202, 369–377.
- Alía, R., S. Martín, J. De Miguel, R. Galera, D. Agúndez, J. Gordo, G. Catalán & L. Gil, 1996. Las regiones de procedencia de *Pinus pinaster* Ait. OA de Parques Nacionales. *DGCONA*, 75.
- Borg-karlson, A.-k., G. Nordlander, A. Mudalige, H. Norfenhem & C. R. Unelius, 2006. Antifeedants in the Feces of the Pine Weevil *Hylobius abietis*: Identification and Biological Activity. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 943-957.
- Bratt, K., K. Sunnerheim, H. Nordenhem, G. Nordlander & B. Langstrom, 2001. Pine weevil (*Hylobius abietis*) antifeedants from lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Journal of Chemical Ecology*, 27, 2253-2262.
- Burban, C. & R. J. Petit, 2003. Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers having contrasted inheritance. *Molecular Ecology*, 12, 1487-1495.
- Byun McKay, S. A., W. L. Hunter, K.-A. Godard, S. X. Wang, D. M. Martin, J. Bohlmann & A. L. Plant, 2003. Insect Attack and Wounding Induce Traumatic Resin Duct Development and Gene Expression of (-)-Pinene Synthase in Sitka Spruce. *Plant Physiology*, 133, 368–378.
- Day, K.R., Leather, S.R., 1997. Threats to forestry by insect pests in Europe. In: Watt, A.D., Stork, N.E., Hunter, M.D. (Eds.), *Forests and Insects*. Chapman & Hall in Conjunction with the RES, London, pP. 177–205.
- DGCN 2002. Tercer Inventario Forestal Nacional 1997–2006: Galicia. Ministerio de Medio Ambiente, Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid, Spain.
- Erbilgin, N., P. Krokene, E. Christiansen, G. Zeneli & J. Gershenzon, 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.
- Franceschi, V., T. Krekling & E. Christiansen, 2002. Application of methyl jasmonate on *Picea abies* (Pinaceae) stems induces defense-related responses in phloem and xylem *American Journal of Botany*, 89, 578-586.

- Franceschi, V., P. Krokene & T. Krekling, 2005. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist*, 167, 353–376.
- Heijari, J., A.-M. Nerg, P. Kainulainen, H. Viiri, M. Vuorinen & J. K. Holopainen, 2005. Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against *Hylobius abietis* in Scots pine seedlings. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115, 117–124.
- Heritage, S., Johnson, D., 1997. The use of post planting sprays to improve the protection of plants from damage by *Hylobius abietis*. *Forestry Commission Research Information Note 272*. Forestry Commission, Edinburgh, UK
- Honkanen, T., E. Haukioja & V. Kitunen, 1999. Responses of *Pinus sylvestris* branches to simulated herbivory are modified by tree sink/source dynamics and by external resources. *Functional Ecology*, 13, 126-140.
- Hudgins, J. W., E. Christiansen & V. R. Franceschi, 2004. Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. *Tree Planters' Notes*, 24.
- Kennedy, S., A. Cameron, V. Thoss & M. Wilson, 2006. Role of monoterpenes in *Hylobius abietis* damage levels between cuttings and seedlings of *Picea sitchensis*. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 21, 340-344
- King, J., A. Yanchuk, G. Kiss & R. I. Alfaro, 1997. Genetic and phenotypic relationships between weevil (*Pissodes strobi*) resistance and height growth in spruce populations of british Columbia. *canadian journal of forest research*, 27 732 -739.
- Koricheva, J., H. Nyk.,nen & E. Gianoli, 2004. Meta-analysis of Trade-offs among Plant Antiherbivore Defenses: Are Plants Jacks-of-All-Trades, Masters of All? . *The American Naturalist*, 163 E64 - E75.
- Krokene, P., H. Solheim, T. Krekling & E. Christiansen, 2003. Inducible anatomical defense responses in Norway spruce stems and their possible role in induced resistance. *Tree Physiology* 23, 191-197.
- Langstrom, B., 1982. Abundance and seasonal activity of adult *Hylobius*-weevils in reforestation areas during first years following final felling. *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae*, 23 pp.

- Leather, S. R., K. R. Day & A. N. Salisbury, 1999. The biology and ecology of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae): a problem of dispersal? *Bulletin of Entomological Research*, 89, 3-16.
- Martin, D., D. Tholl, J. Gershenzon & J. Bohlmann, 2002. Methyl Jasmonate Induces Traumatic Resin Ducts, Terpenoid Resin Biosynthesis, and Terpenoid Accumulation in Developing Xylem of Norway Spruce Stems. *Plant Physiology*, 129, 1003-1018.
- Merlo, E. y Fernández-López, J. 2004. Análisis del balance parental reproductivo en un huerto semillero de *Pinus pinaster*. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 13: 387-398
- Nilsson, U. y Örlander, G. 1995. Effects of regeneration methods on drought damage to newly planted Norway spruce seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 25: 790-802
- Orlander, G. & U. Nilsson, 1999. Effect of Reforestation Methods on Pine Weevil (*Hylobius abietis*) Damage and Seedling Survival. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 14, 341-354.
- Orlander, G., U. Nilsson & G. Nordlander, 1997. Pine weevil abundance on clearcuts of different ages: a 6-year study using pitfall traps. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 12, 225-240.
- Örlander, G., Nilsson, U. y Hällgren, J.E. 1996. Competition for water and nutrients between ground vegetation and planted *Picea abies*. *New Zealand Journal Forestry Science* 26: 99-117.
- Orlander, G. & G. Nordlander, 2003. Effects of field vegetation control on pine weevil (*Hylobius abietis*) damage to newly planted Norway spruce seedlings. *Annals of Forest Science*, 60, 667-673.
- Orlander, G., G. Nordlander, K. Wallertz & H. Nordenhem, 2000. Feeding in the crowns of Scots pine trees by the pine weevil *Hylobius abietis* *Scandinavian Journal of Forest Research*, 15, 194-201.
- Phillips, M. A. and R. B. Croteau, 1999. Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science* 4: 184-190.
- Rapley, L., G. Allen & B. Potts, 2004. Genetic variation in *Eucalyptus globules* in relation to susceptibility from attack by the southern eucalypt leaf beetle, *Chrysophtharta agricola*. *Aust J Bot*, 52, 747-756.

- Sampedro, L., Zas, R. (2005) Herbivoria de corteza sobre coníferas de interés forestal, el caso de *Hylobius abietis*. Efecto de la fertilización de establecimiento y posibilidades de selección de progenies resistentes. *Congreso Forestal Español. Zaragoza*.
- Sibul, I., Luik, A., Voolma, K., 2001. Possibilities to influence maturation feeding of the large pine weevil, *Hylobius abietis* L., with plant extracts and neem preparations. In: Metspalu, L., Mitt, S. (Eds.), Proceedings of the International Workshop entitled Practice Orientated Results on the use of Plant Extracts and Pheromones in Pest Control. *Institute of Plant Protection. Estonian Agricultural University, Tartu, Estonia*, pP. 112–119.
- Strauss, S. Y. & A. R. Zangerl, (2002). Plant-insect interactions in terrestrial ecosystems, in *Plant-animal interactions, an evolutionary approach*, eds. C. M. Herrera & O. Pellmyr Oxford (UK): Blackwell publishing, 132-154.
- Thackner, J. R. M., W. J. Bryant, C. McGinley, S. Heritage & R. H. C. Strang, 2003. Field and laboratory studies on the effects of neem (*azadirachta indica*) oil on the feeding activity of the large pine weevil (*Hylobius abietis* L.) and implications for pest control in commercial conifer plantations *Crop Protection*, 22, 753-760.
- Vega, P., Vega, G., González, M. y Rodríguez, A. 1993. Mejora del *Pinus pinaster* Ait. en Galicia. *En Proc. of the I Congreso Forestal Español. Pontevedra, Spain*. Eds: J. Silva-Pando y G. Vega. *Xunta de Galicia*. p. 129-134
- Wainhouse, D., R. Ashburner, G. Forrest & R. Boswell, 2000. The effect of variation in light and nitrogen on the composition of resin in young Sitka spruce. *Silvae Genetica*, 49, 45-49.
- Yanchuk, A., J. Murphy & K. Wallin, 2007. Evaluation of genetic variation of attack and resistance in lodgepole pine in the early stages of a mountain pine beetle outbreak. *Tree Genetics & Genomes*.
- Zas, R., Sampedro, L., Moreira, X., and Martíns, P. (2007). Effect of fertilization and genetic variation on susceptibility of *Pinus radiata* seedlings to *Hylobius abietis* damage. *Canadian Journal of Forest Research* **in press**.
- Zas, R., L. Sampedro, E. Prada & J. Fernandez-Lopez, 2005. Genetic variation of *Pinus pinaster* Ait. seedlings in susceptibility to the pine weevil *Hylobius abietis* L. *Annals of Forest Science*, 62, 681-688.

- Zas, R., L. Sampedro, E. Prada, M. J. Lombardero & J. Fernández-López, 2006. Fertilization increases *Hylobius abietis* L. damage in *Pinus pinaster* Ait. seedlings *Forest Ecology and Management*, 222, 137-144.
- Zas, R. & R. Serrada, 2003. Foliar nutrient status and nutritional relationships of young *Pinus radiata* D. Don plantations in north-west Spain. *Forest Ecology and Management*, 174, 167-176.
- Zas, R., F. Pichel, P. Martins & J. Fernandez-Lopez, 2006. Fertilization x genotype interaction in *Pinus radiata* open pollinated families planted in three locations in Galicia (NW Spain). *New Forest*, 32, 253-263.
- Zeneli, G., P. Krokene, E. Christiansen, T. Krekling & J. Gershenson, 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.