

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE LUGO
INGENIERÍA DE MONTES**

**CONSECUENCIAS DEL ATAQUE DE *Hylobius
abietis* SOBRE EL DESARROLLO Y EL
ESTADO NUTRICIONAL DE UNA
PLANTACIÓN DE *Pinus pinaster***

PROYECTO FIN DE CARRERA

Alumno:

XOAQUÍN MOREIRA TOMÉ

Directores:

LUIS SAMPEDRO PÉREZ

RAFAEL ZAS ARREGUI

JUNIO 2005

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE LUGO
INGENIERÍA DE MONTES



**CONSECUENCIAS DEL ATAQUE DE *Hylobius abietis* SOBRE EL
DESARROLLO Y EL ESTADO NUTRICIONAL DE UNA
PLANTACIÓN DE *Pinus pinaster***

Los directores

Luis Sampedro Pérez

Rafael Zas Arregui

El alumno

Xoaquín Moreira Tomé

VºBº El tutor

Francisco Javier Silva Pando

Convocatoria

JUNIO 2005

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores de proyecto el Dr. Luis Sampedro Pérez y el Dr. Rafael Zas Arregui por su constante ayuda a la hora de realizar este trabajo, sin ellos sería imposible su finalización.

También quisiera hacer constar mi agradecimiento a las siguientes personas:

A todos los miembros del CIFA de Lourizán por su inestimable ayuda para la realización de todas las tareas propias de este trabajo. Con mención especial quisiera agradecer al Dr. José Antonio Vega y a la Dra. Margarita Alonso el dejarme hacer uso del laboratorio donde se realizó la mayor parte de los análisis y a Francis por acogerme en dicho laboratorio, por sus consejos y su ayuda.

A todas las personas que han colaborado en las mediciones de campo: Diego Pereira, Carlos López, Patricia Martins, Francisco Pichel, Iván Junquera, Julianne y Alex.

Y finalmente, a otras personas que directa o indirectamente me han ayudado a la realización de este proyecto.

ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 La especie arbórea y los ensayos de progenies x fertilización en Galicia	4
1.2 El insecto	5
1.3 Efectos de la herbivoría sobre la fisiología de las plantas	9
1.4 Mecanismos de defensa	10
1.5 Mecanismos que gobiernan la preferencia de los herbívoros	13
1.6 Métodos de control propuestos	15
1.7 Resultados previos	18
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	21
2.1 Hipótesis de trabajo	21
2.2 Objetivos	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Descripción del ensayo factorial progenie x fertilización	23
3.1.1. Diseño general del ensayo	23
3.1.2. Material de estudio	23
3.1.3. Tratamientos de fertilización de establecimiento en el ensayo de progenies	23
3.1.4. Ubicación y descripción de las parcelas	24
3.2. Toma de muestras y mediciones	25
3.2.1. Variables de crecimiento (en todas las plantas de la parcela)	25
3.2.2 Variables de daño (en todas las plantas de la parcela)	25
3.2.3. Muestreo de floema para análisis de nutrientes	25
3.2.4. Muestreo de acículas para análisis de nutrientes foliares	26
3.3 Análisis químicos	26
3.3.1 Procedimiento de digestión	27
3.3.2 Valoración colorimétrica	27
3.3.3 Cálculo de la recta patrón	28

3.4. Diseño experimental y análisis estadísticos	29
3.4.1. Evaluación del crecimiento y de los daños provocados por el ataque de H. abietis tras dos periodos vegetativos en la parcela de Rianxo.	30
3.4.2. Evaluación de la concentración foliar de fósforo y su relación con el ataque por H. abietis en la parcela de Rianxo.	30
3.4.3. Relación entre la concentración de fósforo en acículas y floema en árboles atacados y árboles sanos.	31
4. RESULTADOS	33
4.1 Evaluación del crecimiento en todos los individuos de la parcela	33
4.2 Evaluación de la concentración de fósforo foliar y de su distribución en la planta	37
4.3. Daños provocados por H. abietis y papel del fósforo en la preferencia del insecto	40
5. DISCUSIÓN	45
6. CONCLUSIONES	49
7. REFERENCIAS	50

RESUMEN

En los años 80 se impulsó en Galicia un programa de mejora genética de *Pinus pinaster* en el que se seleccionaron árboles plus de la zona costera gallega y se incluyeron en ensayos factoriales familia x fertilización en diferentes condiciones ambientales. El ataque por parte del curculiónido *Hylobius abietis* a uno de estos ensayos (Rianxo, NW España) permitió el 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. En este estudio se propone como objetivo determinar las consecuencias del ataque de este insecto sobre el desarrollo y el estado nutricional de una plantación de pinos jóvenes situada en Rianxo. Para ello se han evaluado variables de crecimiento y de daño para todas las plantas de la parcela en el segundo período vegetativo después del ataque del insecto. También se ha analizado la concentración de fósforo foliar en 200 plantas pertenecientes a 8 familias bajo 5 tratamientos de fertilización representativas de una graduación de crecimiento y de susceptibilidad al ataque de *H. abietis*. Asimismo, hemos determinado la concentración de fósforo en las hojas y el floema de plantas de un testigo comercial bajo los mismos tratamientos de fertilización en la parcela atacada por el insecto (Rianxo) y en otra análoga sana (Rebordelo). Los resultados mostraron que el efecto de la fertilización de establecimiento sobre el desarrollo se perdió en el segundo período, a pesar de haber sido significativo en el primero, es decir, las plantas fertilizadas no difieren ni en altura ni en diámetro de las no fertilizadas. Además, la concentración foliar de fósforo en las familias estudiadas tampoco se vio afectada por la fertilización. Sin embargo, el insecto atacó con más intensidad a las plantas fertilizadas, siguiendo el mismo patrón del primer período. En cuanto a la relación entre el fósforo en las acículas y en el floema de los testigos fue lineal, positiva y muy fuerte en la parcela sana, pero no fue significativa en la parcela atacada. Esta alteración tanto de la adjudicación de fósforo a las distintas partes de la planta, como de la capacidad de asimilar este nutriente de acuerdo con su disponibilidad en el suelo, sea probablemente una consecuencia del ataque del insecto. De este estudio concluimos que la fertilización de establecimiento aumentó la intensidad del ataque del insecto y no tuvo ningún beneficio en el crecimiento de las plantas a la edad estudiada.

Palabras clave: *Pinus pinaster*, *Hylobius abietis*, interacciones planta-insecto, fertilización, herbivoría, fósforo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La especie arbórea y los ensayos de progenies x fertilización en Galicia

Pinus pinaster Ait. es una especie forestal perteneciente a la familia *Pinaceae*, género *Pinus*. Ocupa un área bastante extensa en los países mediterráneos y de la parte atlántica de Francia, España y Portugal. En Galicia es una de las especies más importantes ocupando cerca de 400.000 ha, casi un 20 % de la superficie arbolada, y es plantada a un ritmo de 6.000 ha anuales (Álvarez *et al.* 2001). Esta especie tiene una gran importancia económica por el aprovechamiento de su madera que, aunque no es de mucha calidad (debido a la existencia de numerosos nudos y bolsas de resina), se emplea para trituración (tableros), carpintería, embalaje y cajerío. En otras épocas tuvo gran importancia como productor de resina, si bien en la actualidad hay casi total retracción en la demanda de este producto.

En los años 80, debido a la gran importancia de esta especie en el sector productivo forestal, 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). En la actualidad, existen 116 clones de árboles superiores que están representados en dos huertos semilleros clonales de primera generación (Merlo y Fernández-López 2004). 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 (Martins 2005).

El ataque masivo de uno de estos ensayos por parte del curculiónido *Hylobius abietis* L. permitió un primer estudio de los patrones de preferencia de ataque, vulnerabilidad y resistencia entre progenies (Zas *et al.* 2005a) y de cómo la disponibilidad de nutrientes afecta al sistema insecto-planta (Zas *et al.* 2005b, Prada 2005). La finalidad última de todo ello sería la inclusión de la resistencia a este insecto como criterio de selección en dicho programa de mejora (Zas *et al.* 2005a; Zas *et al.* 2005b).

1.2 El insecto

H. abietis es un coleóptero de la familia *Curculionidae* que provoca daños muy importantes en las regeneraciones de coníferas tanto en el norte (Petersson y Orlander 2003) como en el sur de Europa (Frayse y Saintonge 1996). El ciclo biológico de este insecto es bastante complejo (Figura 1). 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). Para la búsqueda de este hábitat (normalmente plantaciones de coníferas) emplea estímulos visuales y olfativos (Björklund 2004). En primavera las hembras, después de hibernar en el suelo, entre las hojas, ponen los huevos sobre los tocones y sobre las raíces de árboles enfermos o recién apeados (Nordenhem y Nordlander 1994). Existen otras teorías que aseguran que los huevos son depositados en la tierra cercana a los árboles. Una hembra puede llegar a poner hasta 100 huevos. Las larvas nacen a las 2 o 3 semanas de efectuada la puesta, y se alimentan del floema bajo la corteza, excavando galerías (Figura 3) y al completar su desarrollo entran en fase de pupación, quedando la entrada taponada por serrín. Esta fase dura 2 ó 3 semanas, pasadas las cuales el insecto ya es adulto y abandona la cámara de pupación perforando la corteza (Figura 4). Dependiendo del clima local y de la calidad de la planta colonizada, la emergencia del adulto puede posponerse hasta el final del verano del año siguiente. Debido a la longevidad de este insecto y las nuevas generaciones que se forman, una masa de dichos insectos puede permanecer en un mismo lugar de 2 a 4 años (Orlander *et al.* 1997). Durante los primeros años después de la corta de rodales maduros de coníferas los adultos se alimentan de la corteza y del floema de plantas jóvenes (Fig. 5) causando pérdidas importantes de crecimiento, deformación del tallo (producen la muerte de la guía principal lo que provoca pérdida de la dominancia apical (Fig.6 y 7)) y una alta mortalidad (Orlander y Nordlander 2003). Un daño adicional descubierto recientemente es que este insecto actúa como un vector del hongo *Leptographium procerum* Kendr (Ophiostomatales:Ophiostomataceae) (Piou 1993). En segundas rotaciones en el norte de Europa la mortalidad del regenerado, tanto natural como artificial, puede alcanzar el 60-80 % sino se aplican medidas preventivas adecuadas (Orlander y Nordlander 2003).

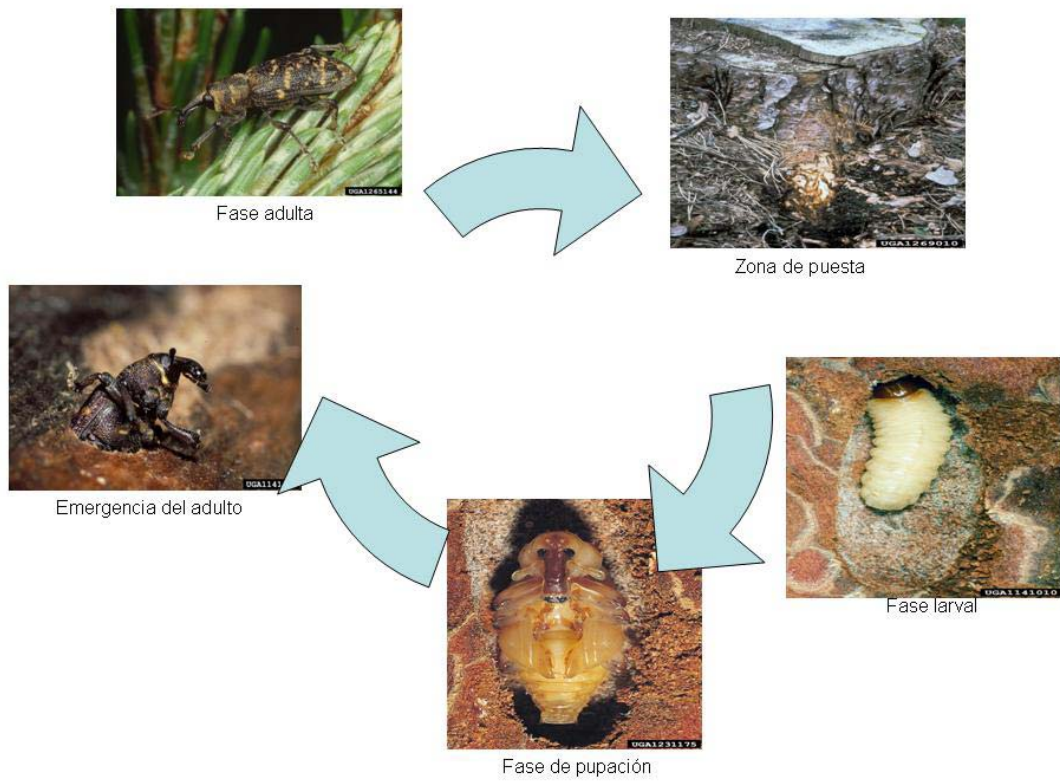


Figura 1. Ciclo biológico de *H. abietis*



Figura 2. Larva de *H. abietis* excavando una galería.



Figura 3. Galería en la base de un tronco de *P. pinaster*.



Figura 4. Emergencia de un insecto adulto.



Figura 5. Adulto alimentándose de la corteza y floema de un pino.



Figura 6. Resinación provocada por las mordeduras del insecto en el tallo.



Figura 7. Pérdida de la guía principal por mordeduras en todo el perímetro del tronco que han conducido al anillamiento del floema.

1.3 Efectos de la herbivoría sobre la fisiología de las plantas

Los efectos de la herbivoría sobre las plantas dependen de las partes de la misma que se ven afectadas y del momento del ataque con respecto al desarrollo de la planta. Además, la planta suele permanecer con vida a corto plazo, y por ello los efectos de la herbivoría dependerán en gran medida de la propia respuesta de la planta. Los minerales o nutrientes pueden ser desviados de una parte a otra de la planta, puede cambiar la tasa general de metabolismo, la tasa relativa de crecimiento de la raíz y de la parte aérea, así como la tasa de reproducción; y es posible que la planta produzca compuestos químicos especiales o tejidos de protección. De manera general, se podría decir que “el efecto de un herbívoro puede ser más drástico de lo que parece, o menos drástico, pero rara vez será el que parece ser” (Begon *et al.* 1998).

Las plantas individuales pueden compensar de distintas maneras los efectos de la herbivoría. Así, por ejemplo, (i) la eliminación de hojas de una planta puede reducir el sombreado de otras hojas y aumentar la tasa de fotosíntesis. Si las que son eliminadas son las hojas que se hallaban a la sombra ello puede mejorar el equilibrio entre fotosíntesis y respiración del conjunto de la planta. En otros casos (ii) inmediatamente después del ataque de un herbívoro muchas plantas efectúan una compensación utilizando los hidratos de carbono almacenados en diversos tejidos. También (iii) las plantas compensan los ataques de los herbívoros mediante un aumento de la tasa de fotosíntesis por unidad de superficie de las hojas supervivientes (Begon *et al.* 1998).

Los herbívoros, en ocasiones, generan consecuencias sobre las plantas desproporcionadas a sus propios efectos directos. Así por ejemplo, el descortezado anular o el consumo de meristemas apicales puede matar a los vegetales; la actuación como vectores de enfermedades o el consumo de savia o xilema sin alterar la estructura física visible de la planta puede tener también consecuencias desproporcionadas. Sin embargo, por lo general, es más frecuente que los herbívoros incrementen la susceptibilidad de una planta a la mortalidad que no que la maten directamente. Específicamente, la herbivoría puede detener el crecimiento y afectar a la fecundidad de las plantas provocando en la mayoría de los casos un retraso de la floración (Begon *et al.* 1998).

Las plantas pueden responder al ataque de los herbívoros iniciando o incrementando la producción de estructuras o compuestos químicos de defensa. Esta

producción tiende a ser costosa pero se obtienen unos beneficios al disminuir los posteriores ataques de los herbívoros (Begon *et al.* 1998).

1.4 Mecanismos de defensa

Entre las plantas y los insectos se producen interacciones, debido principalmente a que los insectos herbívoros no matan inmediatamente a las plantas atacadas (Strauss y Agrawal 1999). Cuando ocurre el ataque de los insectos, las plantas responden al ataque de diversas formas según sea su ciclo de vida, con cambios en su metabolismo y en su estrategia de adjudicación de recursos, con el objeto de minimizar los daños ocasionados, evitar o eliminar al herbívoro y maximizar su potencial de crecimiento o reproducción.

Tolerancia

La tolerancia es la habilidad de una planta para soportar estrés biótico sin serias consecuencias para el crecimiento, apariencia y reproducción. El grado de tolerancia al herbivorismo no está necesariamente relacionado de forma directa con la aptitud de la planta; ya que existen plantas que compensan totalmente el herbivorismo y tienen una aptitud al daño baja (Strauss y Agrawal 1999). Entre los mecanismos empleados por las plantas para aumentar la tolerancia nos encontramos con: (i) aumentar la tasa fotosintética neta después del daño, (ii) aumentar la tasa de crecimiento relativo, (iii) aumentar la ramificación y los brotes cuando se haya producido una pérdida de la dominancia apical, (iv) almacenar niveles altos de hidratos de carbono en diversos tejidos y órganos para su distribución a la reproducción, (v) capacidad para desviar hidratos de carbono desde las raíces a las partes aéreas después del daño.

Maschinski y Whitham (1989) propusieron que las plantas deberían tener el nivel más alto de tolerancia cuando el ataque del herbívoro se produce en la estación temprana, en condiciones libres de competencia, abundante luz y buena disponibilidad de nutrientes y agua. La tolerancia se puede desarrollar por selección natural solamente si existe variación hereditaria que afecte a la aptitud de la planta (Strauss y Agrawal 1999); y a menudo es tratada como un rasgo simple (resistencia), sin embargo, los

diferentes tipos de herbivorismo tienen efectos distintos en las respuestas de las plantas y por consiguiente en su aptitud (Karban y Baldwin 1997).

Defensas constitutivas y defensas inducidas

Las plantas también cuentan con sistemas de defensa activa, entre los que se diferencian las defensas constitutivas y las defensas inducidas. Las defensas constitutivas son las que poseen las plantas sin que se produzca ningún tipo de ataque. Las respuestas inducidas son los cambios en las plantas después del daño y pueden actuar como defensas incrementando la resistencia de las mismas por reducir la preferencia o el efecto de los herbívoros en la planta dañada. Una respuesta inducida también puede operar como una defensa sin disminuir la preferencia del depredador, en su lugar, puede hacer a la planta más tolerante (Karban y Baldwin 1997). Sin embargo estas respuestas inducidas no siempre actúan como defensas ya que pueden producir simultáneamente tanto compuestos disuasivos como atractivos (Karban y Baldwin 1997). Las respuestas inducidas son muy variables debido a las diferencias entre especies, edad, genotipo, factores ambientales, etc. Estas respuestas pueden ser a corto plazo que son las que ocurren durante el ataque, tal que los depredadores sufren las consecuencias del cambio que ellos mismos provocan o a largo plazo que se producen después del daño y tienen poco efecto en los individuos que atacan, pero que pueden afectar a los que utilizan la planta en sus últimas horas (Haukioja 1982). De esto se dedujo que las que se producen después de que el atacante haya actuado como factor negativo son menos efectivas ya que ha tenido lugar un efecto desestabilizador (Haukioja 1982).

Las respuestas inducidas están pensadas para actuar de forma gradual y no como un proceso on/off (Karban y Baldwin 1997). Otra clasificación de las respuestas inducidas es si esa respuesta es activa o pasiva. Entre las activas tenemos como ejemplo la síntesis de fitoalexinas que son compuestos repelentes a los depredadores (Kuc y Rush 1985) y entre las pasivas los cambios en la química de la planta después del daño ya que si se reduce la calidad del tejido se provoca un impacto negativo sobre la densidad futura del depredador (Tuomi *et al.* 1984). Estas últimas son energéticamente menos costosas.

El sistema de defensa constitutiva más importante en coníferas es la producción de resina, en concreto oleorresina (una mezcla de monoterpenos y ácidos resinosos).

Los curculiónidos evitan pinchar en los canales resiníferos durante su puesta y alimentación, indicando que la resina constitutiva es un mecanismo defensivo eficiente contra estos insectos. Se ha comprobado que algunas coníferas son más resistentes cuanto más densos son los canales resiníferos de la corteza (Rosner y Hannrup 2004). Esta densidad de los canales está influenciada por las condiciones meteorológicas. Por ejemplo, un buen suministro de agua provoca que la densidad de los canales sea mayor y se exude más cantidad de resina Mattson y Haack (1987). La cantidad, viscosidad y la composición química de esta resina también puede influir en la conveniencia del árbol como anfitrión (Reeve *et al.* 1995).

Cuando las coníferas no poseen el sistema de resina constitutiva o los insectos sobreviven a éste se produce una defensa inducida importante (Berryman 1972). Esta respuesta consiste en que el cambium revierte la producción de traqueidas normales y células rayo de parénquima a producir canales de resina traumática (Alfaro 1995). Seccionando los tallos se comprobó que esos canales de resina traumática vacían su contenido en las galerías larvales y en las zonas de ataque y puesta de los adultos, produciendo la muerte de huevos y larvas (Alfaro 1995). Cuando la guía principal sobrevive al ataque el cambium vuelve a revertir otra vez a la producción de xilema normal (Alfaro 1995). Esto tiene lugar porque desde los canales resiníferos corticales no se produce suficiente resina pero sí desde las células secretoras en el área necrótica. Esta resina exudada desde la reacción inducida es diferente de la resina normal ya que contiene una mayor concentración de compuestos tóxicos como fenoles y terpenos (Shrimpton y Whitney 1968). Los aumentos de esta resina inducida aumentan la resistencia del árbol contra los insectos de diferentes maneras: (i) disminuyen las razones de ataque del insecto, (ii) disminuyen el éxito de la puesta, (iii) disminuyen la supervivencia tanto de los adultos como de las larvas, (iv) previenen el establecimiento de otros insectos y hongos (Berryman 1972).

A pesar de esto, (Matson y Hain 1985) analizaron los costes energéticos en coníferas de sistemas defensivos basados en canales de resina constitutiva e inducida y llegaron a la conclusión de que ésta última requiere mayor gasto de energía. Sin embargo, esta no es una norma que se cumple en todos los casos; existen plantas donde las defensas inducidas tienen poco gasto (Karban 1993).

Otra defensa inducida de gran importancia es la modificación en la concentración de metabolitos secundarios (como fenoles y taninos) y fitotoxinas después del daño. La mayoría de las respuestas inducidas se producen como resultado

de cambios en la expresión genética que influye en la regulación bioquímica de la síntesis, composición o entrega de metabolitos secundarios (Karban y Baldwin 1997). Si la regulación interna es muy fuerte, las respuestas inducidas son en su mayoría función del estímulo ambiental (heridas) y del genotipo de la planta. Muchos agentes de estrés ambiental relacionados con el herbivorismo aumentan la concentración de metabolitos secundarios (Mattson y Haack 1987). El equilibrio entre algunos metabolitos primarios y secundarios influencia la respuesta de las plantas al estrés y también los efectos que esas plantas pueden tener en el herbivorismo (Tuomi *et al.* 1984).

Entre los compuestos fitotóxicos producidos por las plantas, existen evidencias de que las fitoalexinas pueden ser eficaces contra insectos y patógenos de las plantas (Russell *et al.* 1978; Hart *et al.* 1983). El gran problema que se produciría en el caso de respuestas fitotóxicas es que si los productos inducidos por el daño son tóxicos para los depredadores, también pueden serlo para las plantas (Kuc 1987). Esta autotoxicidad puede aumentar si el efecto se prolonga en el tiempo y se puede evitar con un sistema en el que las fitoalexinas solamente se producen cuando son necesarias. Los precursores de estas sustancias tóxicas se almacenan con seguridad en las vacuolas para que de este modo las enzimas y el substrato sólo se mezclen después de que se rompan las vacuolas por el ataque (Duffey y Felton 1989).

Otras defensas inducidas de las plantas son los cambios fisiológicos y morfológicos provocando un aumento de la densidad de espinas y pelos (Myers y Bazely 1990) o la vuelta a la forma juvenil de crecimiento (Bryant 1981).

Las defensas inducidas son más efectivas que las constitutivas ya que un genotipo cambiante permite a la planta responder más rápido al ataque de parásitos que si confía en las defensas constitutivas que solamente cambian con el paso del tiempo (Whitham 1983). Además las defensas inducidas permiten que la planta responda a la variedad ambiental que es impredecible (Levins 1968).

1.5 Mecanismos que gobiernan la preferencia de los herbívoros

Entre los mecanismos que regulan la preferencia de los herbívoros se encuentra la fertilización, ya que afecta de forma directa a la disponibilidad de nutrientes en la planta. Además, la fertilización con N disminuye la concentración de metabolitos secundarios y el flujo de resina (Kytö *et al.* 1999; Warren *et al.* 1999; Turtola *et al.* 2002). En el caso de la fertilización con P, existen discrepancias, ya que existen

estudios que demostraron que el P no provocaba la reducción de los metabolitos secundarios (Koricheva *et al.* 1998) y, sin embargo existen otros que sí demostraron que la fertilización con P afecta negativamente a la concentración de estos metabolitos (Haukioja *et al.* 1998). La reducción de dichos metabolitos y la disminución del flujo de resina provocan una reducción de las defensas inducidas y constitutivas de las plantas. De este modo se explica la preferencia de *H. abietis* por las plantas fertilizadas, ya que tienen un mayor contenido de nutrientes en el floema (Ayres *et al.* 2000) y por la baja capacidad defensiva, o por ambas causas a la vez. En un estudio se demostró que *H. abietis* prefiere las plantas de pino escocés fertilizadas con nitrógeno que las fertilizadas con PK (Selander y Immonen 1992) pero probablemente el insecto muestra preferencia por las plantas enriquecidas con fósforo cuando éste sea escaso (Zas *et al.* 2005b, Prada 2005).

La fertilización con P afecta en gran medida a la dinámica poblacional de los insectos herbívoros. Existen estudios que demostraron que un incremento en la dieta de fósforo provoca un efecto positivo en el desarrollo larval y el posterior crecimiento de distintas especies de insectos (Goverde *et al.* 2004, Clancy *et al.* 2004, Perkins *et al.* 2004). Los niveles de nutrientes en las plantas pueden variar perceptiblemente dentro de las mismas, y están influenciados por factores externos como la fertilización, disponibilidad de agua o luz (Facknath y Lalljee 2005). De todos modos, el contenido en N y P en los tejidos de las plantas es muy bajo comparado con los requerimientos del insecto, por lo que la disponibilidad de estos nutrientes podría ser crítica y limitante en su alimentación (Ayres *et al.* 2000). Los insectos pueden resolver el problema del bajo contenido en N de formas diferentes: (i) aumentando la eficiencia del uso del N, (ii) aumentando la tasa de consumo, (iii) comiendo en sitios concretos de contenido relativamente alto en N, (iv) se asocian con hongos o microorganismos que mejoran la calidad nutricional del floema ingerido (Forcella 1981; Tabashnik 1982; Ayres y McLean jr 1987; Clancy *et al.* 1988; Clancy 1992; White 1993; Yang y Joern 1994; Trier y Mattson 1997). Esto último es importante en los insectos que tienen tasas de consumo baja, ya que sino tendrían que consumir más recurso para alcanzar sus necesidades (Ayres *et al.* 2000). Las asociaciones más abundantes son con hongos micangiales que contribuyen a la entrada de nutrientes. Además, las especies que no presentan estas asociaciones micangiales son más sensibles a la variación de N en el floema, ya que un único cambio en el N de alimentación tiene un gran impacto cuando ese N es escaso (Ayres *et al.* 2000). Por lo tanto, una ventaja de las asociaciones

micangiales es la reducción del efecto provocado sobre el consumidor por la variabilidad ambiental.

1.6 Métodos de control propuestos

Entre las medidas preventivas más importantes se presenta la aplicación insecticidas como permethrin o el lindano que reducen el ataque y el riesgo de mortalidad (Sydow 1997). El uso de estos insecticidas protege a los árboles del daño de *H. abietis* pero no controlan la población del insecto, por lo que sólo es efectivo si se aplica repetidamente (Thackner *et al.* 2003). Desde el año 2003 el uso de estos insecticidas está prohibido 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 alternativas al uso de estos insecticidas (Thackner *et al.* 2003).

Dentro de estas medidas alternativas se presenta el empleo de extractos de plantas con compuestos repulsivos para los insectos, el uso de nematodos para controlar la plaga, y la más importante, métodos preventivos selviculturales como utilizar barreras alimenticias, realizar una escarificación del suelo, retrasar la plantación a más de 2 años después de la corta a hecho, reservar árboles padre que no se cortan hasta pasados unos años, realizar plantaciones mixtas con frondosas y coníferas, emplear estaquillas en lugar de plantas de semillero, retrasar la plantación hasta principios de verano, llevar a cabo la plantación en suelo mineral, plantar en montículos, plantar en lugares donde existan enemigos naturales de *H. abietis*. A continuación relatamos brevemente cada una de las alternativas propuestas:

(1) Realizar una escarificación del suelo. Con esto se consigue, además de crear un ambiente más favorable para el establecimiento de la plantación al disminuir la competencia con la vegetación herbácea, es reducir el daño por parte de estos insectos ya que al remover el suelo lo que se logra es alterar los refugios donde éstos realizaron las puestas. De todos modos, la escarificación sola rara vez es suficiente para limitar el daño en niveles aceptables, por eso se debe complementar con otras medidas preventivas (Sydow 1997; Orlander y Nilsson 1999; Hannerz *et al.* 2002).

(2) Retrasar la plantación a más de 2 años después de la corta a hecho. Se ha comprobado que *H. abietis* es más abundante durante los primeros años después de la corta, por lo que de este modo se reduce el riesgo de ataque. Sin embargo, retrasar la

plantación provoca pérdidas económicas y problemas de competencia de las plantas con la vegetación del suelo (Nilsson y Örlander 1995; Örlander *et al.* 1996).

(3) Reservar árboles padre que no se cortan hasta pasados unos años. Se ha comprobado que el ataque de *H.abietis* es menos severo cuando se reservan árboles padre que en cortas a hecho (Sydow *et al.* 1994; Lof 2000; Nordlander *et al.* 2003; Petersson y Orlander 2003). El daño fue dos veces mayor en las áreas donde se había realizado una corta a hecho (Nordlander *et al.* 2003) a pesar de que la densidad del insecto era parecida o incluso menor que en las que se dejaron algunos árboles en pie (Sydow *et al.* 1994; Nordlander *et al.* 2003). Por lo tanto el menor daño en estos rodales cortados en dos tiempos no está relacionado con una menor abundancia del insecto sino que se debe a la disponibilidad de otros recursos a parte de la plantas del regenerado (Nordlander *et al.* 2003). Se ha demostrado que una abundancia en el suministro de recursos puede disminuir drásticamente el daño provocado por el insecto. En un estudio de campo se comprobó que colocando ramas de pino fresco en el suelo entre las plantas se redujo en 2/3 la cantidad de insectos comiendo la corteza del tallo (Orlander *et al.* 2001). Además se comprobó que *H. abietis* también se alimenta exhaustivamente de las copas de coníferas maduras (Orlander *et al.* 2000). Los insectos alcanzan las copas principalmente por el vuelo y se concentran en áreas de árboles recién cortados. Este ataque a las copas sugiere que la reserva de árboles padre es una alternativa alimenticia para reducir la presión en las plantas del regenerado (Orlander *et al.* 2000). Otro factor importante a tener en cuenta es que existen diferencias de microclima entre las áreas con árboles protectores y las que no, aunque no parece ser esa una causa de los distintos niveles de daño (Nordlander *et al.* 2003).

(4) Realizar plantaciones mixtas con frondosas y coníferas. En el norte de Europa, concretamente en Suecia, se realizaron estudios que demostraron que *H. abietis* prefiere atacar a especies de coníferas que a frondosas (Löf *et al.* 2004), por lo que se planteó la hipótesis de realizar plantaciones mixtas como solución alternativa. Los resultados que se obtuvieron en el laboratorio con pino y fresno fueron bastante satisfactorios indicando que las frondosas actúan como depresivos alimenticios para el insecto (Leather *et al.* 1994), pero no está muy claro que dichos resultados se verifiquen en el campo donde las distancias entre los árboles son mayores.

(5) Emplear estaquillas en lugar de plantas de semillero: en Suecia se comprobó que la frecuencia de ataque y la mortalidad provocadas por *H. abietis* era de un 4-43 %

mayor en las plantas procedentes de semilla que en los estaquillados, debido al mayor grosor de su corteza y la presencia de espinas de las estaquillas (Hannerz *et al.* 2002).

(6) Retrasar unos meses la plantación. Como la época más usual de plantación es en primavera existe la posibilidad de plantar a principios de verano ya que durante esta época el insecto es menos abundante (Orlander y Nilsson 1999). Sin embargo estaríamos en plena época seca por lo que tendríamos el riesgo de estrés hídrico y mayor densidad de vegetación herbácea. El riesgo a sufrir un estrés hídrico es muy alto y esto es muy perjudicial debido a la preferencia de este insecto por las plantas que presentan este problema (Selander y Immonen 1992). Este estrés hídrico está usualmente relacionado con una mala fijación de las raíces al suelo, menor actividad de las raíces (Hale y Orcutt 1987) y un cambio en la composición de la oleorresina (Mattson y Haack 1987). Los cambios más frecuentes que se producen son que se exuda menor cantidad de la misma (Mattson y Haack 1987) y una variación en las concentraciones de monoterpenos ya que se aumenta el α -pineno que es el principal atrayente del insecto (Hodges y Lorio 1975; Gilmore 1977).

(7) Llevar a cabo la plantación en suelo mineral. El ataque por parte del *H.abietis* es mayor cuando existe gran cantidad de materia orgánica en el suelo (de ahí que se realicen las escarificaciones), por lo que si la plantación se realiza en suelos con humus el riesgo de ataque será mayor que si se realiza en suelos minerales puros (Pettersson *et al.* 2005).

(8) Plantar en montículos. Se demostró que como el ataque de *H. abietis* era mayor cuando existía hojarasca o vegetación herbácea en el suelo (mejores refugios para estos insectos), plantando en montículos de suelo mineral se reducía ese riesgo de ataque (Orlander y Nilsson 1999). Además a los insectos les cuesta más trepar al tallo con la pendiente del montículo que desde el hoyo (Orlander y Nilsson 1999).

(9) Plantar en lugares donde existan enemigos naturales de *H. abietis*. Dentro de los enemigos más importantes de este insecto tenemos: (i) los parásitos como *Bracon hylobii* Ratz. (Hymenoptera: Braconidae), que en Gran Bretaña causa la muerte del 50 % de las poblaciones de *H.abietis* (Henry 1995), *Perilitus areolaris* GH. (Hymenoptera: Braconidae) y *Perilitus rutilus* Nees (Hymenoptera: Braconidae), (ii) depredadores de larvas como gusanos y escarabajos, (iii) microorganismos como *Beauveria bassiana* vuill. (Moniliales: Moniliaceae) que es un hongo que causa la muerte del 4 % de la población de *H.abietis* por infección de sus larvas y adultos (Gerdin 1977) y *Neoplectana carpocapsae* Weiser (Nematoda: Steinernematidae) que

ofrece unos resultados extraordinarios ya que mata al 89 % de la población (Pye y Pye 1985), aunque Collins (1993) encontró que estos resultados solamente se producen bajo ciertas condiciones ambientales, (iv) competidores por los recursos como *Rhagium inquisitor* L. (Coleoptera: Cerambycidae) que es un cerambicido que compite por los recursos con las larvas de *H.abietis*, *Heterobasidion annosum* Bref. (Basidiomycota:Aphyllorales) y *Armillaria mellea* Quel (Agaricales: Tricholomataceae:) que excluyen a las larvas de *H. abietis* en las partes infectadas del tocón, pueden contribuir también a reducir la presión de *H. abietis*. De todos estos enemigos naturales el que mejores resultados ofrece es *B. hylobii* que es considerado como un importante agente de control biológico. Existen evidencias de que la fecundidad de este parasitoide influencia en gran medida la estabilidad poblacional y la abundancia de *H. abietis* (Lane *et al.* 1999). Este parasitoide necesita recursos (miel, néctar, soluciones de azúcar...) para incrementar su fecundidad y longevidad (Jervis y Kidd 1999) ya que su vida es corta; por lo que una estrategia adecuada sería la conservación y propagación de estos recursos en las repoblaciones.

(10) Utilización de barreras alimenticias. Una posibilidad es colocar familias 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.

Todos estos sistemas protectores físicos y biológicos están ofreciendo resultados prometedores aunque todavía deben justificarse biológica y económicamente.

1.7 Resultados previos

En estudios previos realizados en el C.I.F.A de Lourizán se ha observado que la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Zas *et al.* 2005b) y la genética del regenerado (Zas *et al.* 2005a) tienen un papel importante en la susceptibilidad al daño de *H. abietis*. De este modo se ha observado que la fertilización, especialmente si contiene fósforo, aumenta significativamente los daños sobre *P. pinaster* (Zas *et al.* 2005b, Prada 2005 en preparación). Esto tiene una gran trascendencia ya que la fertilización es una herramienta silvicultural importante para los regenerados de *P.pinaster*, especialmente en repoblaciones de 2ª rotación donde se ha extraído una gran cantidad de nutrientes (Sánchez-Rodríguez *et al.* 2002; Zas 2003; Zas y Serrada 2003). En un ensayo de fertilización x familia realizado por el C.I.F.A de Lourizán se comprobó que el daño provocado por el insecto era tres veces mayor en plantas fertilizadas que en las de

control, induciendo a que esas plantas fertilizadas pierdan cuatro veces más la guía principal que las no fertilizadas (Zas *et al.* 2005b). Pese al ataque, la fertilización aumentó significativamente el crecimiento diámetro y la altura en las plantas capaces de mantener la guía principal (Zas *et al.* 2005b). Este efecto positivo de la fertilización en el crecimiento es debido a las deficiencias nutricionales de las especies forestales en los suelos graníticos y ácidos de Galicia (Sánchez-Rodríguez *et al.* 2002; Merino *et al.* 2003; Zas 2003; Zas y Serrada 2003). Sin embargo, cuando consideramos la altura real de la plantación (la altura de todas las plantas, las que conservan la guía principal y las que no), las plantas fertilizadas no difieren de las no fertilizadas; por lo que se concluyó que el ataque de *H. abietis* provoca la pérdida de las ventajas de crecimiento en altura promovidas por la fertilización (Zas *et al.* 2005b). En este mismo estudio se hipotetizó que la fertilización podría influenciar el sistema planta-insecto de varias formas: (i) aumentando la calidad nutricional de los tejidos de las plantas fertilizadas, ya que la cantidad que tienen las plantas de nutrientes es muy baja con referencia a la necesaria por parte de los insectos (White 1993; Ayres *et al.* 2000), (ii) disminuyendo las concentraciones de metabolitos secundarios (la fertilización aumenta la disponibilidad de nutrientes modificando la distribución de los compuestos secundarios como fenoles y terpenos, que se emplean más para crecer que para respuestas defensivas) y (iii) disminuyendo también la densidad de los canales resiníferos y del flujo de resina tal y como se comprobó en *Pinus sylvestris* y *Pinus taeda* (Kytö *et al.* 1999; Warren *et al.* 1999; Turtola *et al.* 2002).

Por otro lado, se observó una importante variabilidad genética en la población de mejora de *P. pinaster* en Galicia en la susceptibilidad a *H. abietis*, con heredabilidades de moderadas a altas (Zas *et al.* 2005a). En este sentido, los investigadores plantean la posibilidad de explotar esta variación genética para desarrollar genotipos resistentes mediante procesos de selección y cruzamiento. Específicamente, en coníferas, se ha demostrado las fuertes diferencias genéticas en la resistencia de varias especies a los insectos depredadores de corteza y floema.

En el mismo ensayo del C.I.F.A de Lourizán descrito anteriormente (fertilización x familia) se observó que las diferencias entre las familias fueron significativamente altas para todos los rasgos estudiados (diámetro, altura, pérdida de la guía, heridas, color, defoliación, resinación y supervivencia) (Zas *et al.* 2005a). Los testigos tenían un crecimiento menor que las demás familias, pero fueron menos atacadas (Zas *et al.* 2005a). Esto nos indica que el uso de material genético mejorado

aumenta el riesgo de daño por *H. abietis* (Zas *et al.* 2005a). Las familias con mayor crecimiento diamétrico fueron las más atacadas (Zas *et al.* 2005a). El alto efecto de la familia en el daño provocado por el insecto indica la posibilidad de incluir la resistencia a esta plaga como un criterio de selección en el programa de mejora del *P. pinaster* en Galicia (Zas *et al.* 2005a; Zas *et al.* 2005b). Sin embargo, la interacción fertilización x familia resultó significativa para el daño, indicando que la resistencia genética es alterada por la fertilización (Zas *et al.* 2005b). La respuesta a los tratamientos de fertilización puede ser muy variable entre las familias porque éstas difieren en su capacidad o eficiencia para asimilar esa fuente adicional de nutrientes, por lo que pueden mostrar diferentes concentraciones de nutrientes en sus tejidos (Jonsson *et al.* 1997; Mari *et al.* 2003, Zas y Fernández-López 2005).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis de trabajo

A la vista de los resultados preliminares obtenidos después del análisis de los daños y del crecimiento de las plantas tras el primer ataque (Zas *et al.* 2005a; Zas *et al.* 2005b), de los que podemos resaltar que (i) la fertilización provocó un mayor crecimiento en las plantas, especialmente cuando ésta contenía fósforo; (ii) la fertilización provocó enormes diferencias en el grado de ataque entre plantas, e *H. abietis* mordió más a las plantas fertilizadas, y específicamente a las fertilizadas con fósforo; (iii) el insecto mordió más a las plantas más grandes, con una relación positiva muy fuerte y significativa.

Nos hemos planteado las siguientes preguntas:

► ¿Cuáles son las repercusiones que el ataque por *H. abietis* tendrá en la vitalidad, inversión en crecimiento y estado nutricional de las plantas atacadas? Sería esperable que las respuestas inducidas por el ataque tuviesen repercusiones en su estado nutricional, o en su desarrollo, o en la forma en la que la planta reparte sus recursos hacia el crecimiento.

► ¿Podría la calidad nutritiva de los tejidos de la plantas fertilizadas (especialmente el fósforo) estar influyendo en la preferencia de *H. abietis*? ¿Sería el contenido nutricional no carbonado mayor en las plantas fertilizadas? La concentración de N y P en los tejidos de las plantas es pequeña comparado con los requerimientos del insecto, la disponibilidad de N y P podría modificar las preferencias alimenticias del insecto. La fertilización de establecimiento provoca un mayor desarrollo de la planta, pero también podría modificar la concentración de nutrientes en sus tejidos y por consiguiente su calidad como alimento para el insecto.

2.2 Objetivos

Antes estas preguntas de compleja respuesta multifactorial, para el presente proyecto nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Evaluar el crecimiento de una plantación de pinos jóvenes dos períodos vegetativos después de un intenso ataque de *H. abietis* y cómo está influida por la fertilización de establecimiento.
2. Evaluar los daños y el ataque del insecto *H. abietis* sobre una plantación de pinos jóvenes dos períodos vegetativos después de un intenso ataque de *H. abietis* y determinar cómo están influidos por la fertilización de establecimiento.
3. Evaluar si el ataque de *H. abietis* sobre una plantación de pinos jóvenes ha modificado su estado nutricional en respuesta a los tratamientos de fertilización de establecimiento aplicados.
4. Estudiar si la preferencia en el ataque de *H. abietis* sobre una plantación de pinos jóvenes está relacionada con una variación de la calidad nutritiva del floema de los individuos de la población atacada.

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción del ensayo factorial progenie x fertilización

3.1.1. Diseño general del ensayo

El estudio fue realizado en parcelas del ensayo factorial progenie x fertilización de *P. pinaster* puesto en marcha por el departamento de Producción forestal del CIFA Lourizán en distintas localidades de Galicia en 2003. En estas parcelas se ensayan 28 progenies y 3 testigos comerciales bajo 9 tratamientos de fertilización. El diseño experimental de cada parcela consiste en un split-plot replicado en 10 bloques, con los 9 tratamientos de fertilización como factor principal y los 31 genotipos (familias + testigos) como factor secundario. Los tratamientos de fertilización son los whole-plot y fueron aplicados al azar dentro de cada bloque. El espaciamiento entre las plantas es de 2 x 3 m y el número total de plantas del ensayo es de $10 \times 9 \times 31 = 2.790$.

En el presente proyecto de investigación hemos empleado material procedente de dos de esas parcelas, de las parcelas de Rianxo (atacada por *H. abietis*) y Rebordelo (sana). La evaluación del crecimiento en esta parcela fue estudiada en otro PFC (Martins 2005).

3.1.2. Material de estudio

El material de este estudio instalado en las parcelas consta de 28 entidades genéticas diferentes. De éstas, 28 progenies proceden de semilla de alta calidad genética del huerto semillero de primera generación de Sergude y 3 son testigos comerciales de diferente procedencia (Sergude, Costa e Interior). Las semillas de las 28 familias de polinización abierta proceden de árboles plus de la zona atlántica costera seleccionados por sus características superiores de crecimiento, forma del tallo y ramosidad. De los testigos comerciales, dos proceden de semilla no mejorada empleada comúnmente en el área costera e interior de Galicia (TCOS y TINT). El testigo de Sergude consta de una colección de semillas procedentes de la fertilización cruzada de los árboles plus del huerto semillero, por lo que de alguna manera son la representación de la población completa con sus variantes.

3.1.3. Tratamientos de fertilización de establecimiento en el ensayo de progenies

Para este estudio se emplearon 8 tratamientos de fertilización (obtenidos a partir de la combinación de cuatro fertilizantes comerciales (Tabla 1) además de un control no fertilizado. Los fertilizantes se administraron inmediatamente después de plantar y su aplicación fue realizada a mano en un círculo de 30 cm de diámetro alrededor de las plantas.

Tabla 1. Códigos y composición de los tratamientos de fertilización en el ensayo de progenies.

Nutriente	Fertilizante	Dosis	Código del Tratamiento								
			T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
N	Urea	5 g N/planta	-	+	-	+	+	+	-	-	-
P + Ca	Superfosfato	10 g P/ planta	-	+	+	-	+	+	-	+	+
K	Sulfato potásico	15 g K/ planta	-	+	+	+	-	+	+	-	+
Mg	Sulfato magnésico	5 g Mg/planta	-	+	+	+	+	-	+	+	-

3.1.4. Ubicación y descripción de las parcelas

La parcela de Rianxo está localizada en el SW de la Sierra del Barbanza (A Coruña) en el límite con la provincia de Pontevedra. Sus coordenadas son 42,60° N, 8,77° W, altitud 90 m. El ensayo fue instalado en Marzo del 2003, un año después de la corta de un antiguo monte maduro de *P. pinaster*. El clima en esta zona es Atlántico, el cual se caracteriza por tener temperaturas suaves (T^a media en verano de 18° C y en invierno de 9° C), una precipitación media anual de 1.880 mm y una precipitación estival de 57 mm. En cuanto a las características edafológicas, el suelo forestal es arenoso sobre granito y típicamente ácido (pH en agua de 4,5), posee alto contenido en materia orgánica, alta concentración de nitrógeno Kjeldahl (8,3 g. N kg) y bajos niveles de nutrientes, especialmente de fósforo disponible (P Olsen = 5,2 mg.kg). Después del verano de 2003 se detectó un ataque masivo del curculiónido comedor de corteza *H. abietis*. Los daños y el crecimiento fueron evaluados en enero de 2004, y posteriormente en octubre de 2004, respectivamente 1 y 2 períodos vegetativos después de la aparición de *H. abietis* en la parcela. Los datos presentados en el presente proyecto corresponden a la evaluación realizada por el autor y otros colaboradores en octubre de 2004. Los resultados de la primera medición dieron lugar a otro PFC (Prada 2005) sobre la resistencia familiar a la plaga.

La parcela de Rebordelo está ubicada en el MVMC de Rebordelo a unos 20 km de Pontevedra y pertenece al Ayuntamiento de Cotobade. Sus coordenadas son 42,46° N, 8,48° W, altitud 530 m. La precipitación media anual en esta parcela es de 2.380 mm, con una precipitación estival de 79 mm y una temperatura media anual de 11,3 °C. Esta parcela fue instalada también en Marzo de 2003 y no procede de ninguna corta a hecho por lo que no se vio atacada por *H. abietis*.

3.2. Toma de muestras y mediciones

3.2.1. Variables de crecimiento (en todas las plantas de la parcela)

- H2: altura total, en cm, evaluada in situ a los 2 años de edad.
- D2: diámetro en la base del tronco en cm, a los 2 años de edad

3.2.2 Variables de daño (en todas las plantas de la parcela)

Se evaluaron también in situ los daños producidos por *H. abietis* en todas las plantas de la parcela a los 2 años mediante las siguientes variables:

- MORT: evaluación del grado de ataque por cuantificación de las mordeduras en cuatro niveles (0: sin daños, 1: pocas mordeduras, 2: muchas mordeduras, 3: seco o lleno de mordeduras). Para eliminar la subjetividad de esta variable se empleó una regla elástica dividida en cinco segmentos iguales (de esta forma podemos dividir el tallo en cinco tramos de igual longitud). La variable MORT será la suma de los cinco valores observados.

- MORR: evaluación subjetiva de las mordeduras en las ramas laterales en una escala de 0 (sin daños) a 6 (plagado de daños y/o resinación).

- MORG: evaluación subjetiva de las mordeduras en el tallo principal utilizando la misma escala que para MORR.

- PS: variable dicotómica (0/1) que determina si el ataque de *H. abietis* generó el anillamiento del tallo y la consiguiente muerte de la guía principal.

- COL: valoración subjetiva de la coloración general de la planta en una escala de 0 (totalmente clorótica) a 4 (totalmente verde).

3.2.3. Muestreo de floema para análisis de nutrientes

Se tomaron muestras de floema de las plantas del testigo comercial TSER de las parcelas de Rianxo y Rebordelo. Para el muestreo del floema se empleó un segmento de tallo de 15 cm de longitud, situado por debajo del último verticilo y se separó el floema del tallo con la ayuda de un bisturí. Previamente, la superficie de los troncos para las muestras de floema se limpiaron cuidadosamente de los restos de vainas, acículas y resina. A continuación se guardó en sobres numerados. Las muestras se almacenaron en frío (4 ° C) durante 7 días hasta su procesado. Las muestras se secaron en una estufa a una temperatura de 65 ° C hasta peso constante (aproximadamente 5 días). Una vez secas, se realizaron 3 muestras compuestas para estimar la humedad residual. Esta humedad se calculó secando las muestras compuestas a 105 ° C y a continuación se aplicó:

$$R = \text{peso } 105 \text{ } ^\circ\text{C} / \text{peso } 65 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$\text{Hdad residual} = (1 - R) * 100$$

Por último se molieron todas las muestras de acículas hasta que quedaron en forma de polvo. Para ello se empleó un molinillo. El contenido se vació en botes numerados y se almacenó en oscuridad.

3.2.4. Muestreo de acículas para análisis de nutrientes foliares

Las acículas muestreadas fueron como mínimo 100 acículas maduras del año, por debajo del verticilo final (crecimiento de otoño) y siempre orientadas hacia el Oeste. Las muestras de acículas fueron tomadas de las plantas testigo TSER y de 8 familias representativas de una graduación de crecimiento y de susceptibilidad al ataque de *H .abietis*. A continuación se guardaron en bolsas de plástico numeradas. Las muestras se almacenaron en frío (4 ° C) durante 7 días hasta su procesado. Las acículas fueron separadas de la vaina con la ayuda de unas tijeras pequeñas. A partir de ahí se procedió de igual manera que con las muestras de floema, es decir, secado, cálculo de la humedad residual y triturado para su posterior almacenamiento.

3.3 Análisis químicos

La concentración de fósforo en las hojas se determinó tras la digestión seca de los tejidos vegetales secos y molidos (Gallardo y Merino 1993), siguiendo el método colorimétrico del molibdato amónico-ácido sulfúrico empleando microplacas de 96 cubetas y un lector de microplacas. La realización de este método usando microplacas

supone un gran avance debido al ahorro de tiempo, la comodidad del análisis y el bajo gasto de reactivos contaminantes.

3.3.1 Procedimiento de digestión

La digestión se realizó de acuerdo con el método propuesto por Jones *et al.* (1991) adaptado a las características de nuestras muestras. El procedimiento se detalla a continuación:

- Se pesan 0,3 g de muestra foliar molida en erlenmeyers numerados con lápiz (así con todas las muestras) y se le añaden 10 ml de nitrato de magnesio [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] para que no se volatilice el fósforo durante la calcinación. Esta mezcla se deja secar durante un día en una estufa a 80 ° C hasta que se evaporan los 10 ml del nitrato.

- Se calcinan todas las muestras en una mufla a 200 ° C durante 1 hora y luego a 500 °C durante 4 horas (hasta que adquiere un color blanquecino que muestre que la calcinación es correcta). De esta forma lo que se consigue es separar el fósforo de la matriz a la que se encuentra ligado. Al estar libre permite el cálculo de su concentración.

- Se diluyen las cenizas con 8 ml de ácido clorhídrico (HCl) 1 M. El erlenmeyer donde están las cenizas se lava tres veces con agua destilada hasta verter todo el contenido (recuperación cuantitativa) en un matraz de 25 ml y se enrasa. A continuación se trasfiere todo el volumen de ese matraz a botes de plástico numerados y se guarda en un frigorífico a 4 °C hasta el análisis (10 días). Esto se lleva a cabo para todas las muestras.

3.3.2 Valoración colorimétrica

La valoración colorimétrica se realizó siguiendo el protocolo empleado por Covelo y Gallardo (2002).

- En primer lugar se preparan los reactivos necesarios. El primer reactivo se obtiene disolviendo 25 g de molibdato amónico [$(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] en 200 ml de agua destilada (es necesario calentar para que se produzca la mezcla). Cuidadosamente se añaden 280 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado en 400 ml de agua destilada, mezclando y enfriando. A continuación se añade la solución de molibdato amónico en la solución ácida. Por último se mezcla y se deja enfriar. El segundo reactivo se obtiene disolviendo 0,05 g de cloruro de estaño ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 25 ml de ácido clorhídrico al 2

% (pipetear 1 ml de HCl y enrasar a 50 ml). Esta solución se debe preparar inmediatamente antes de su uso.

- Para la lectura de la absorbancia se tomó una alícuota de 25 µl de cada muestra recuperada y se diluyó con 175 µl de agua destilada. A continuación se le añadieron 20 µl de la disolución de molibdato amónico y 40 µl de la disolución de cloruro de estaño. Por lo tanto el volumen total en cada pocillo de la microplaca era de 260 µl. Esta mezcla desarrolla un color azul intenso proporcional a la concentración de fósforo.

3.3.3 Cálculo de la recta patrón

Se procedió al establecimiento de una recta patrón mediante el uso de patrones de concentraciones conocidas. El espectrofotómetro ofrece los resultados de absorbancia por lo que mediante esta recta se calculó la concentración de todas las muestras. El sistema empleado fue el siguiente:

- Preparación de la solución estándar madre de 100 mg P / L: se disuelven 0,4393 g de fosfato ácido de potasio (KH₂PO₄) en agua y enrasar a un litro.

- Preparación de la solución estándar de trabajo de 2 mg P / L: tomar 1 ml de la solución estándar madre en un matraz de 50 ml y enrasar a volumen.

- Preparación de patrones con 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 50 ml del estándar de trabajo (KH₂PO₄) en matraces aforados de 50 ml. Con esto obteníamos una concentración de los patrones de 0, 0'2, 0'4, 0'6, 0'8, 1 y 2 mg P / L.

A continuación al aplicar los reactivos a los patrones por triplicado en la microplaca se obtenía la absorbancia de cada patrón:

$$\text{Absorbancia} = a + b * \text{concentración}$$

Como los datos de absorbancia y concentración son conocidos obteníamos la recta patrón por regresión lineal. Después se conseguía la concentración de todas las muestras:

$$\text{Concentración} = (\text{absorbancia} - a) / b$$

Esta concentración que se obtiene es la que existe en el pocillo de la microplaca (260 µl). Aplicando:

concentración pocillo* volumen pocillo (260 µl) = concentración de la alícuota * volumen de alícuota (25 µl), obtenemos la concentración de la alícuota.

Por último calculamos los mg P g⁻¹ muestra seca del modo siguiente:

[concentración alícuota*volumen de recuperación (25 ml)/100 µl ml⁻¹ /0,30 g] / (100-humedad)/100.

El peso seco de cada muestra de 0,30 g se corrigió con la humedad residual (1,61 %).

El cálculo de la recta patrón se realizó en cada lectura del espectrofotómetro, para a continuación obtener las concentraciones de las muestras.

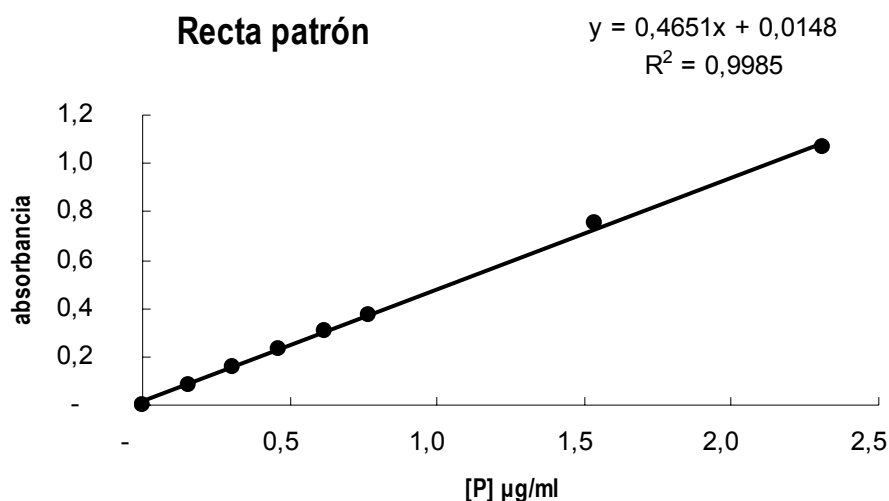


Figura 8. Ejemplo de una recta de patrón fosfato obtenida en el laboratorio.

Se procedió a la calcinación de muestras control para confirmar que no existía una pérdida de fósforo durante la ignición. Además, se analizó una muestra por triplicado mediante ICP-AES tras digestión con horno microondas (CACTI-Universidade de Vigo), y obtuvimos que por nuestro método se recuperaba el 89 % del fósforo.

3.4. Diseño experimental y análisis estadísticos

El diseño experimental para la consecución de los objetivos propuestos en el presente proyecto se ha estructurado en tres bloques:

3.4.1. Evaluación del crecimiento y de los daños provocados por el ataque de *H. abietis* tras dos periodos vegetativos en la parcela de Rianxo.

Para ello se empleó la evaluación realizada en todos los individuos de la parcela de Rianxo atacada por *H. abietis* en verano de 2003 y primavera de 2004, o sea las 2790 plantas de los 9 tratamientos de fertilización, 10 bloques y 28 familias + 3 testigos comerciales.

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

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + G_j + B_k + FG_{ij} + FB_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

donde μ es la media general, F_i es el efecto de los tratamientos de fertilización, G_j es el efecto de los genotipos (familias de polinización abierta y testigos), B_k es el efecto de los bloques, FG_{ij} es la interacción entre fertilización y genotipo, FB_{ik} es la interacción entre fertilización y bloques y ε_{ijk} es el error aleatorio. Todos los factores excepto FB_{ik} fueron considerados fijos. La interacción entre fertilización y bloques (FB_{ik}) fue considerada aleatoria para utilizar el término correcto del error para examinar el factor whole-plot, es decir, el efecto de la fertilización.

Cuando los efectos de las medias o interacciones fueron significativos, las diferencias entre las medias de los tratamientos fueron examinadas empleando el procedimiento LSMEAN del PROC-MIXED (SAS-Institute, 1999). Los términos se muestran como media \pm error estándar de la media.

3.4.2. Evaluación de la concentración foliar de fósforo y su relación con el ataque por *H. abietis* en la parcela de Rianxo

Para este análisis fue necesario reducir la población a estudio por la imposibilidad de realizar 2790 análisis foliares. Después de un estudio previo de los resultados del ataque en el primer año, finalmente se consideraron 8 familias representativas en los 5 tratamientos de fertilización que provocaron una mayor discrepancia en cuanto a los daños del *H. abietis*: T0 (testigo de control), T1 (N+P+), T2 (N-P+), T3 (N+P-) y T6 (N-P-). Las familias muestreadas fueron 1004, 1020, 1030, 2001, 1035, 2017 y 2076 y 2070 en 5 de los 10 bloques (B2, B3, B4, B9 y B10). El

tamaño total de la muestra fue de $5 \times 5 \times 8 = 200$ plantas para extracción de acículas y análisis de nutrientes foliares.

Para el análisis de los efectos principales Familia y Fertilización, se ha empleado el mismo modelo que en el apartado anterior.

3.4.3. Relación entre la concentración de fósforo en acículas y floema en árboles atacados y árboles sanos.

H. abietis se alimenta de la corteza y floema de los tallos de plantas jóvenes de coníferas. Esto representa un problema ya que el muestreo del floema para el análisis de la calidad nutritiva del recurso dañaría enormemente los árboles jóvenes objeto del mismo. Para solucionarlo se realizó una regresión entre las concentraciones en nutrientes en el floema y las acículas en un subconjunto de individuos de cada parcela que fueron muestreados destructivamente. Para la realización de la regresión entre floema y acículas se tomaron los ejemplares del testigo comercial de Sergude (TSER) de los mismos tratamientos de fertilización anteriores en 5 de los 10 bloques (B2, B3, B4, B7 y B10). Esta operación también se realizó en la parcela análoga no atacada de Rebordelo, muestreándose un total de $2 \times 5 \times 5 = 50$ plantas para analizar la concentración de P tanto en las acículas como en el floema.

En este caso se ha analizado el efecto del factor principal Fertilización pero incluyendo también la información del Bloque mediante el procedimiento Main Effects GLM del programa Statistica 6.0 (StatSoft, 1999). Si los efectos resultaban significativos se aplicó el test de separación de medias HSD de Tukey. Las regresiones y correlaciones entre variables se han realizado también con el mismo programa estadístico.

Tabla 2. Resumen de las variables evaluadas para la elaboración del presente proyecto y del tamaño muestral utilizado en cada caso.

VARIABLES EVALUADAS	TAMAÑO MUESTRAL		
	28 familias de polinización abierta 10 bloques 9 tratamientos de fertilización (N = 2520)	8 familias de polinización abierta 5 bloques 5 tratamientos de fertilización (N = 200)	1 Testigo de Sergude (TSER) 5 bloques 5 tratamientos de fertilización 2 Parcelas (Rianxo –atacada- y Rebordelo – sana-) (N = 50)
Evaluación del crecimiento (altura y diámetro)	+	+	+
Evaluación del daño (mordeduras, punta seca, color, etc.)	+	+	+
Concentración de Fósforo foliar		+	+
Concentración de Fósforo en floema			+
Biometría			+

4. RESULTADOS

4.1 Evaluación del crecimiento en todos los individuos de la parcela

El análisis de las mediciones realizadas en octubre 2004, dos periodos vegetativos después del primer ataque de *H. abietis*, mostró que ninguno de los tratamientos de fertilización fue efectivo para promover crecimientos mayores que el obtenido en el control no fertilizado, tanto en altura (Figura 9) como en diámetro (Figura 10). El efecto de la fertilización sobre estas variables no fue significativo (Tabla 3).

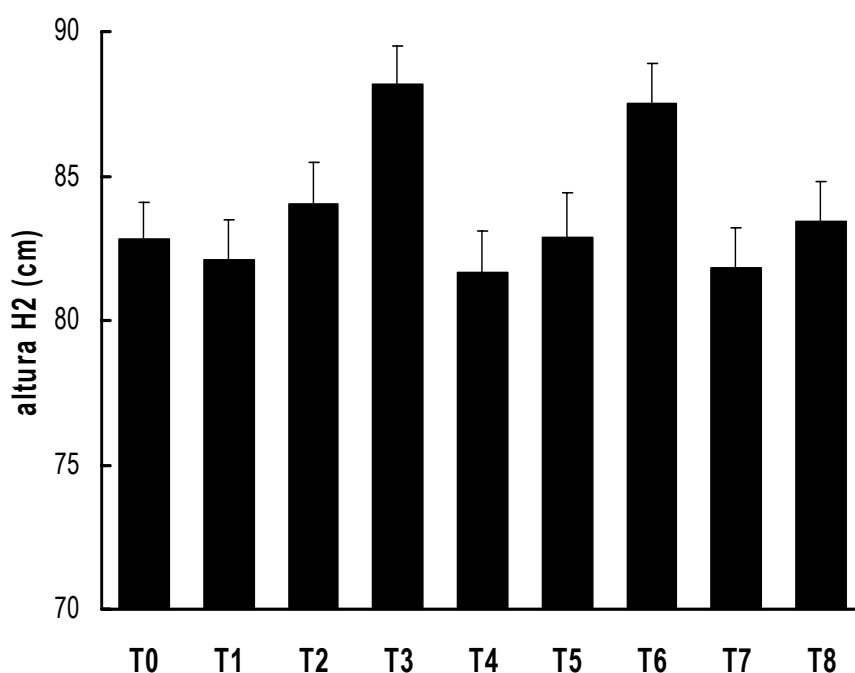


Figura 9. Altura de juveniles de *P. pinaster* sometidos a diferentes tratamientos de fertilización dos periodos vegetativos después de un ataque de *H. abietis*. El efecto de la fertilización no fue significativo. Se muestran las medias de 28 familias de polinización abierta, en 9 tratamientos de fertilización. Las barras indican el error estándar de la media.. N = 280 en cada tratamiento. Ver tabla 1 para la descripción de los tratamientos.

Tabla 3. Resumen de los resultados del análisis de varianza sobre las variables D2 (diámetro período 2) y H2 (altura período 2) de juveniles de *P. pinaster* sometidos a diferentes tratamientos de fertilización de establecimiento en el otoño siguiente a un ataque de *H. abietis*.

Variable	Efecto	GL	GL Denom	F	P
Diámetro 2° período (D2)					
	Tratamiento de fertilización (T)	8	72	1,90	0,074
	Bloque (B)	9	72	3,80	0,001
	Familia (G)	27	1565	2,23	0,000
	T*G	216	1565	1,33	0,002
	B*G	243	1565	1,02	0,420
Altura 2° período (H2)					
	Tratamiento de fertilización (T)	8	72	0,92	0,503
	Bloque (B)	9	72	2,52	0,014
	Familia (G)	27	1565	6,17	0,000
	T*G	216	1565	1,29	0,005
	B*G	243	1565	1,07	0,221

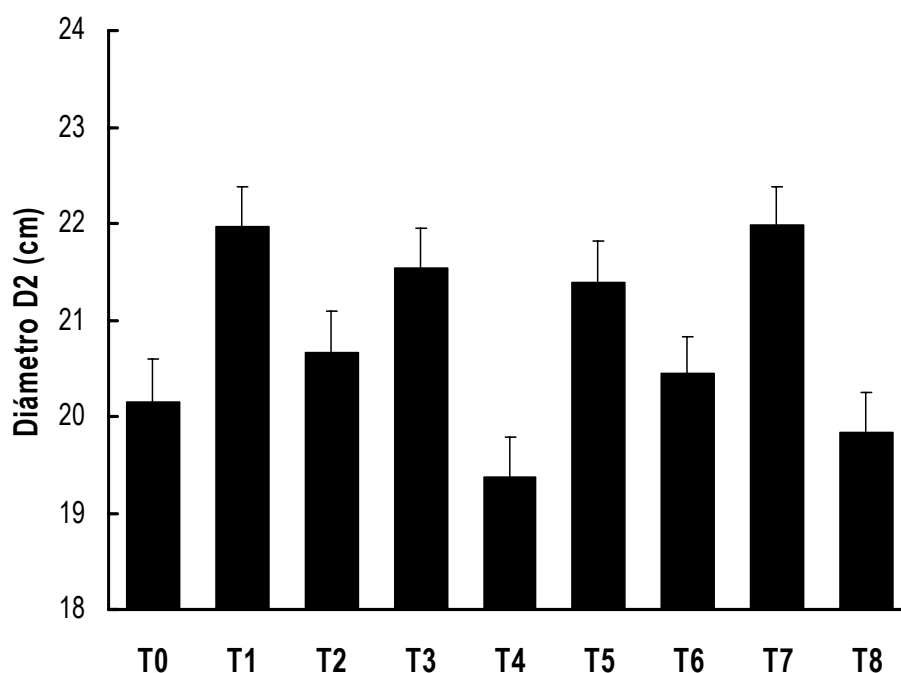


Figura 10. Diámetro de juveniles de *P. pinaster* bajo diferentes tratamientos de fertilización dos periodos vegetativos después de un ataque de *H. abietis*. El efecto de la fertilización no fue significativo. Se muestran las medias de 28 familias de polinización abierta, en 9 tratamientos de fertilización. Las barras indican el e.s.m. N=280 en cada tratamiento (ver Tabla 1 para su descripción).

Esto sugiere que el ataque por *H. abietis* anuló el efecto de la fertilización de establecimiento. Sin embargo, en otras parcelas plantadas en las mismas condiciones, se ha comprobado que el efecto de la fertilización de establecimiento perdura con claridad

después del tercer período vegetativo, como por ejemplo la que se muestra en la Figura 11 para el ensayo de progenie x fertilización de Rebordelo.

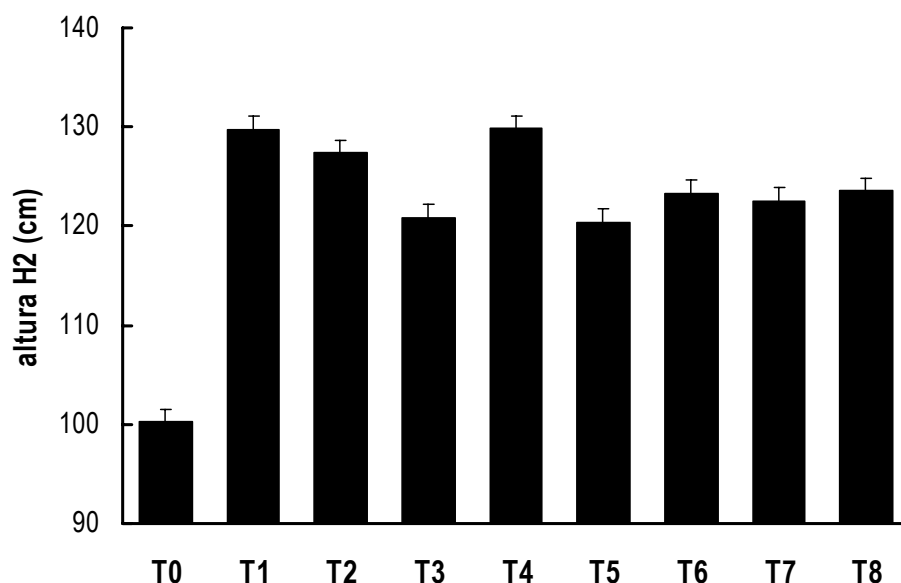


Figura 11. Altura de juveniles de *P. pinaster* dos temporadas después de ser sometidos a diferentes tratamientos de fertilización de establecimiento, en una parcela no atacada por *H. abietis* (Rebordelo). El efecto de la fertilización sigue siendo altamente significativo en el segundo período. Se muestran las medias de 28 familias de polinización abierta, en 9 tratamientos de fertilización. Las barras indican el error estándar de la media. N = 280 en cada tratamiento (adaptada de Martíns 2005).

Además, la ausencia de una regresión significativa, en contra de lo esperable, entre los diámetros medidos antes y después del ataque (Figura 12) sugiere que los beneficios de cada tratamiento de fertilización sobre el crecimiento en el primer período vegetativo no se correspondieron con una respuesta equivalente en el segundo.

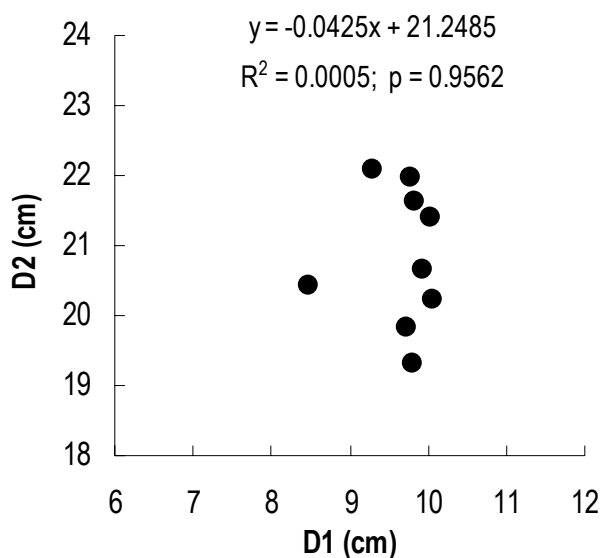


Figura 12. Relación entre los diámetros de juveniles de *P. pinaster* sometidos a diferentes tratamientos de fertilización tomados antes del episodio de ataque de *H. abietis* y en el otoño siguiente al ataque de este curculiónido. No existe relación significativa. Se muestran las medias de 28 familias de polinización abierta para cada tratamiento de fertilización en 5 bloques.

La fuerte relación inversa observada entre el grado de ataque en el primer período vegetativo y el crecimiento relativo observado en los árboles sometidos a cada tratamiento de fertilización (Figura 13) indica que los tratamientos más atacados en el primer período resultaron ser los que presentaron menor crecimiento relativo en el segundo período, sugiriendo una relación causal entre las dos variables.

Además, la fertilización afectó significativamente a la supervivencia de las plantas en cada tratamiento (Figura 14; $P < 0.05$), siendo la supervivencia mayor en el control no fertilizado y gradualmente menor en los tratamientos fertilizados.

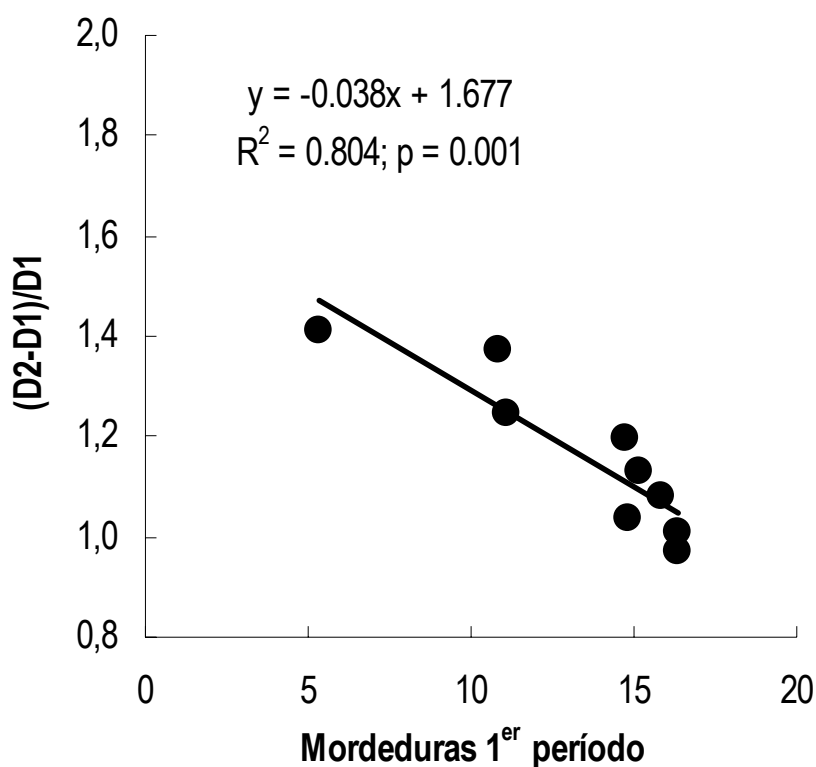


Figura 13. Relación entre los daños sufridos por juveniles de *P. pinaster* sometidos a diferentes tratamientos de fertilización tras un ataque de *H. abietis* y el crecimiento relativo durante la temporada siguiente. Se muestran las medias de 28 familias de polinización abierta para cada tratamiento de fertilización. La relación fue inversa y significativa.

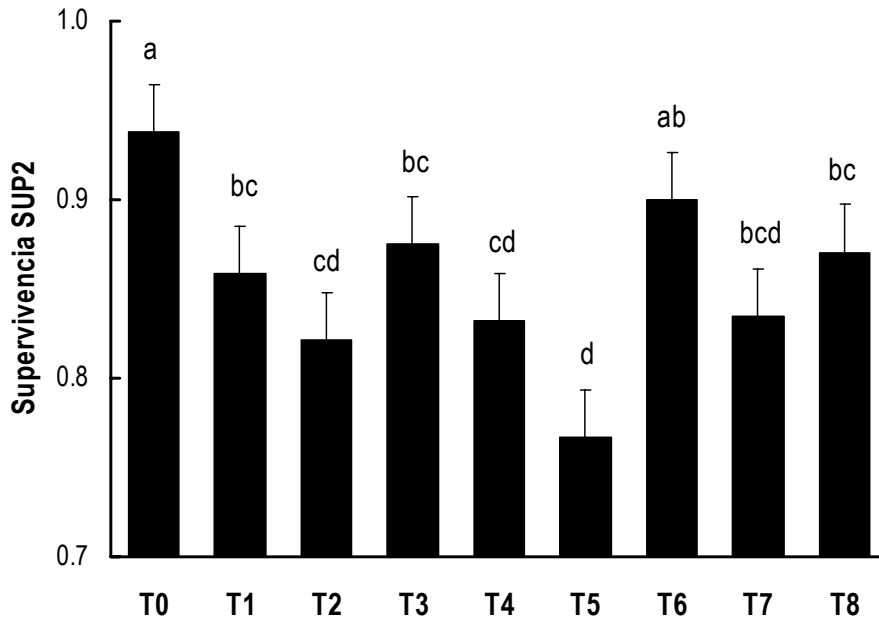


Figura 14. Supervivencia (SUP2) de juveniles de *P. pinaster* sometidos a diferentes tratamientos de fertilización a un ataque de *H. abietis* en el segundo período vegetativo. El efecto de la fertilización fue significativo ($P < 0.05$). Letras diferentes sobre cada barra indican medias significativamente distintas. Las barras de error indican el e.s.m.

4.2 Evaluación de la concentración de fósforo foliar y de su distribución en la planta

A pesar de la intensidad de la fertilización de establecimiento, la concentración de fósforo en las acículas de las 8 familias de los 5 tratamientos prospectados para análisis foliar, al contrario de lo esperado, no estuvo afectada de forma significativa por la aplicación de diferentes tratamientos de fertilización (Figura 15; Tabla 4). Ello sugiere que el ataque de *H. abietis* ha alterado de alguna manera la capacidad de los pinos para ubicar fósforo en sus hojas de acuerdo con el gradiente de disponibilidad de fósforo en el suelo establecido por los tratamientos de fertilización.

Tabla 4. Resumen de los resultados del análisis de varianza de la concentración de fósforo foliar en juveniles de *P. pinaster* sometidos a diferentes tratamientos de fertilización de establecimiento en el otoño siguiente a un ataque de *H. abietis*. Ninguno de los efectos considerados resultó significativo.

Variable	Efecto	GL	GL Denom	F	P
Concentración de P en acículas (mg P g ⁻¹ peso seco)	Tratamiento de fertilización (T)	4	16	1.07	0.403
	Bloque (B)	4	16	2.70	0.068
	Familia (G)	7	90	0.97	0.461
	T*G	28	90	1.32	0.163
	B*G	28	90	0.70	0.855

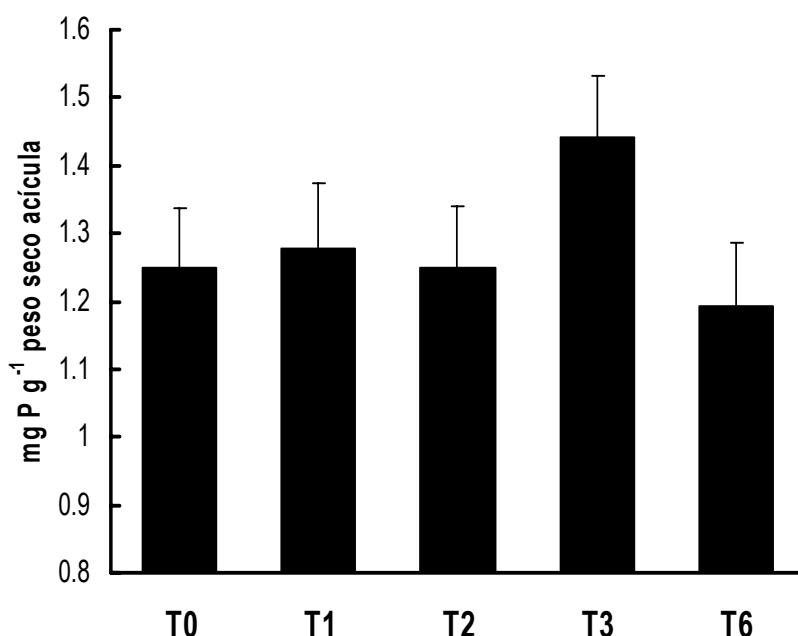


Figura 15. Concentración de fósforo en las acículas de individuos juveniles de *P. pinaster* sometidos a diferentes tratamientos de fertilización en el otoño siguiente a un ataque de *H. abietis*. El efecto de la fertilización no fue significativo. Se muestran las medias de 8 familias de polinización abierta en 5 tratamientos de fertilización. Las barras indican el error estándar de la media. N = 40 para cada tratamiento. Ver tabla 1 para la descripción de los tratamientos.

La comparación de las concentraciones foliares en los individuos del testigo comercial entre la parcela de Rianxo atacada por *H. abietis* y Rebordelo, no atacada, (Fig.16) sugiere también que el origen de las diferencias observadas podría estar en el ataque del herbívoro. A pesar de que se trata de dos parcelas diferentes entre las que no puede hacer una comparación estadística directa, la magnitud de las diferencias

observadas permite si no afirmar categóricamente, sí sugerir con cierta consistencia que la causa de las desviaciones en las concentraciones foliares sería el ataque por *H. abietis*.

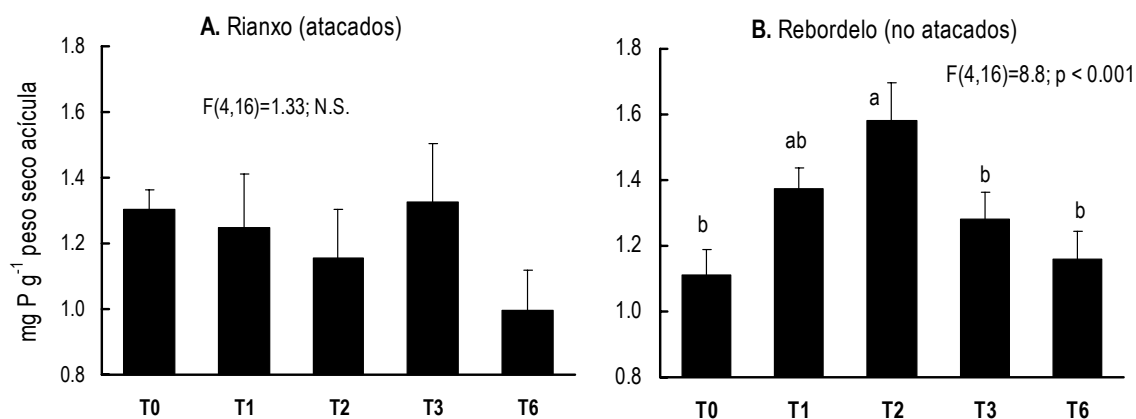


Figura 16. Concentración de fósforo en las acículas de individuos juveniles de *P. pinaster* procedentes de un testigo comercial sometidos a diferentes tratamientos de fertilización. La figura 16.a. corresponde a una parcela atacada por *H. abietis* después del ataque, en la que el efecto de la fertilización no fue significativo. La fig. 16.b. ilustra la relación observada en otra parcela con los mismos tratamientos y familias que la anterior, pero distante unos 40 km y que no ha sido atacada y en la que la fertilización afectó claramente al estado nutricional foliar. Las barras indican el error estándar de la media; N = 5; tratamientos seguidos por las mismas letras no fueron significativamente diferentes tras el test de separación de medias HSD Tukey.

En la Figura 17 se presenta la relación entre el contenido nutricional en el floema y en las acículas en las muestras del testigo comercial TSER de la parcela de Rianxo (atacada) y de la de Rebordelo (sana). En la Figura 17.b podemos observar que en la parcela sana la concentración de fósforo en las acículas fue directamente proporcional a la concentración de fósforo existente en el floema para los 5 tratamientos de fertilización estudiados, con una relación lineal positiva muy fuerte y significativa, con los tratamientos de fertilización siguiendo el orden esperado de disponibilidad de fósforo. Sin embargo, en la parcela de Rianxo, tras el ataque de *H. abietis*, esa relación se ha perdido, y la posición relativa de cada uno de los tratamientos de fertilización ha variado sustancialmente, sugiriendo que el ataque del herbívoro también ha alterado la capacidad o la forma en la que las plantas distribuyen el fósforo entre sus tejidos.

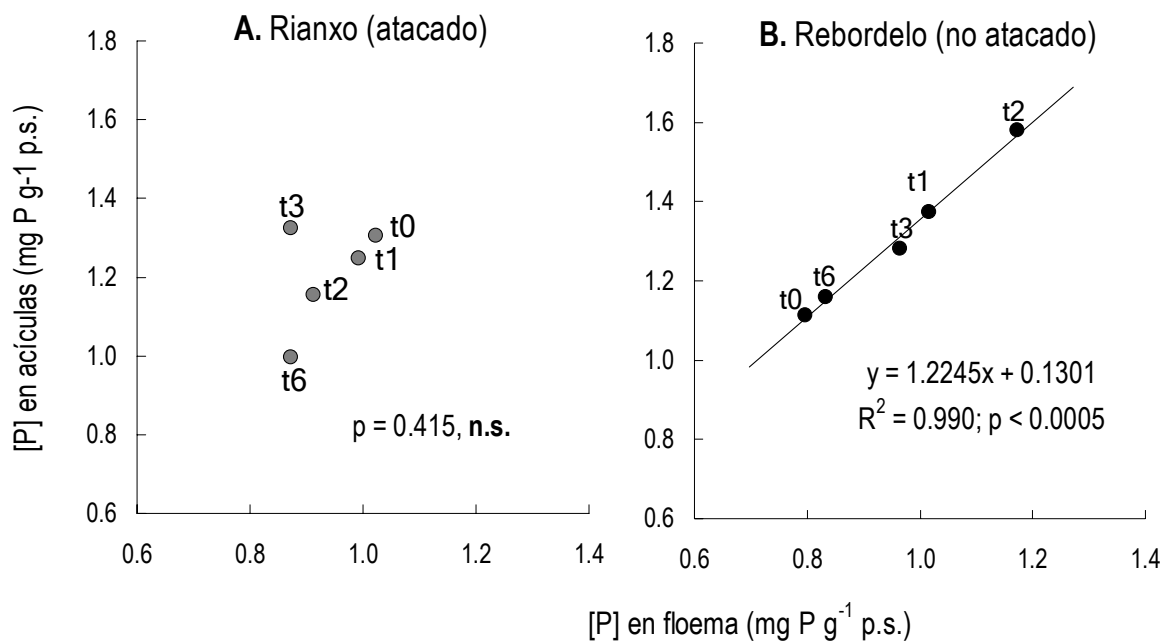


Figura 17. Relación entre la concentración de fósforo en el floema y en las acículas de juveniles de *P. pinaster* procedentes de un testigo comercial sometidos a diferentes tratamientos de fertilización. La figura 17.a. corresponde a una parcela atacada por *H. abietis* un período vegetativo después del ataque. La fig. 17.b. ilustra la relación observada en otra parcela con las mismos tratamientos y familias que la anterior, pero distante unos 40 km y que no ha sido atacada. En ella se observa que la concentración de nutrientes es proporcional en floema y hojas. Cada punto es la media de 5 individuos.

4.3. Daños provocados por *H. abietis* y papel del fósforo en la preferencia del insecto

Aunque en las páginas anteriores hemos visto que tras dos periodos vegetativos después del ataque de *H. abietis*, las concentraciones foliares de fósforo y el crecimiento en diámetro y altura de las plantas no han respondido a los tratamientos de fertilización aplicados, sin embargo sí se ha observado un mayor ataque de *H. abietis* sobre las plantas fertilizadas en el segundo período (Figura 18.B), siguiendo el patrón de preferencia del primer período vegetativo (Figura 18.A), aunque con menor diferencia entre tratamientos.

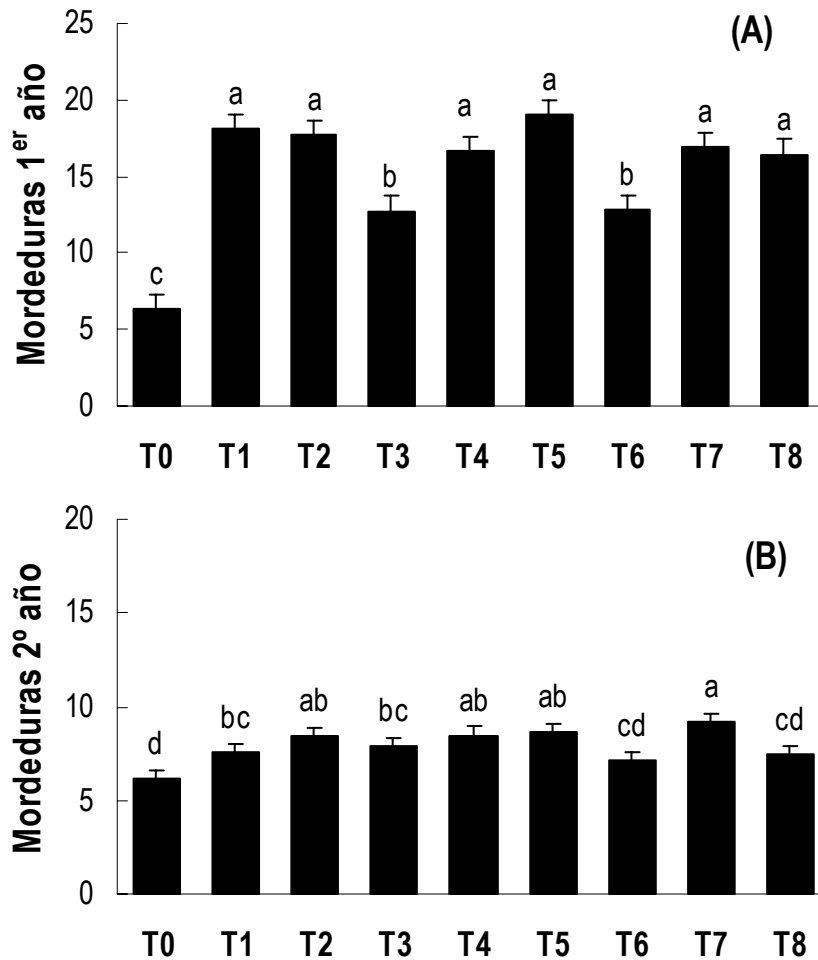


Figura 18. Daños causados por *H. abietis* durante dos periodos vegetativos consecutivos en juveniles de *P. pinaster* sometidos a varios tratamientos de fertilización. La magnitud del daño estuvo fuertemente influenciada por la fertilización durante los dos periodos ($p < 0.01$) La Figura A está tomada de Prada (2005).

Además de este efecto significativo de la fertilización sobre el ataque en el segundo período vegetativo, la estrecha relación positiva observada entre el ataque durante el primer período y el segundo (Figura 19) sugiere que *H. abietis* en el período vegetativo siguiente al ataque inicial siguió alimentándose más sobre aquellas familias de cada tratamiento de fertilización que había preferido en la temporada anterior (Figura 19.A), así como sobre los mismos tratamientos de fertilización (Figura 19.B). Estos resultados sugieren que la preferencia de *H. abietis* por determinados individuos está afectada de alguna manera importante por la fertilización, pues prefiere unos tratamientos de fertilización que otros, y en general las plantas fertilizadas sobre el control. No existió relación significativa entre el ataque del primer y segundo período cuando se tomaron las medias familiares (Fig. 19.C) ni para la matriz de datos original ($r = 0.169$; $p = 0.28$).

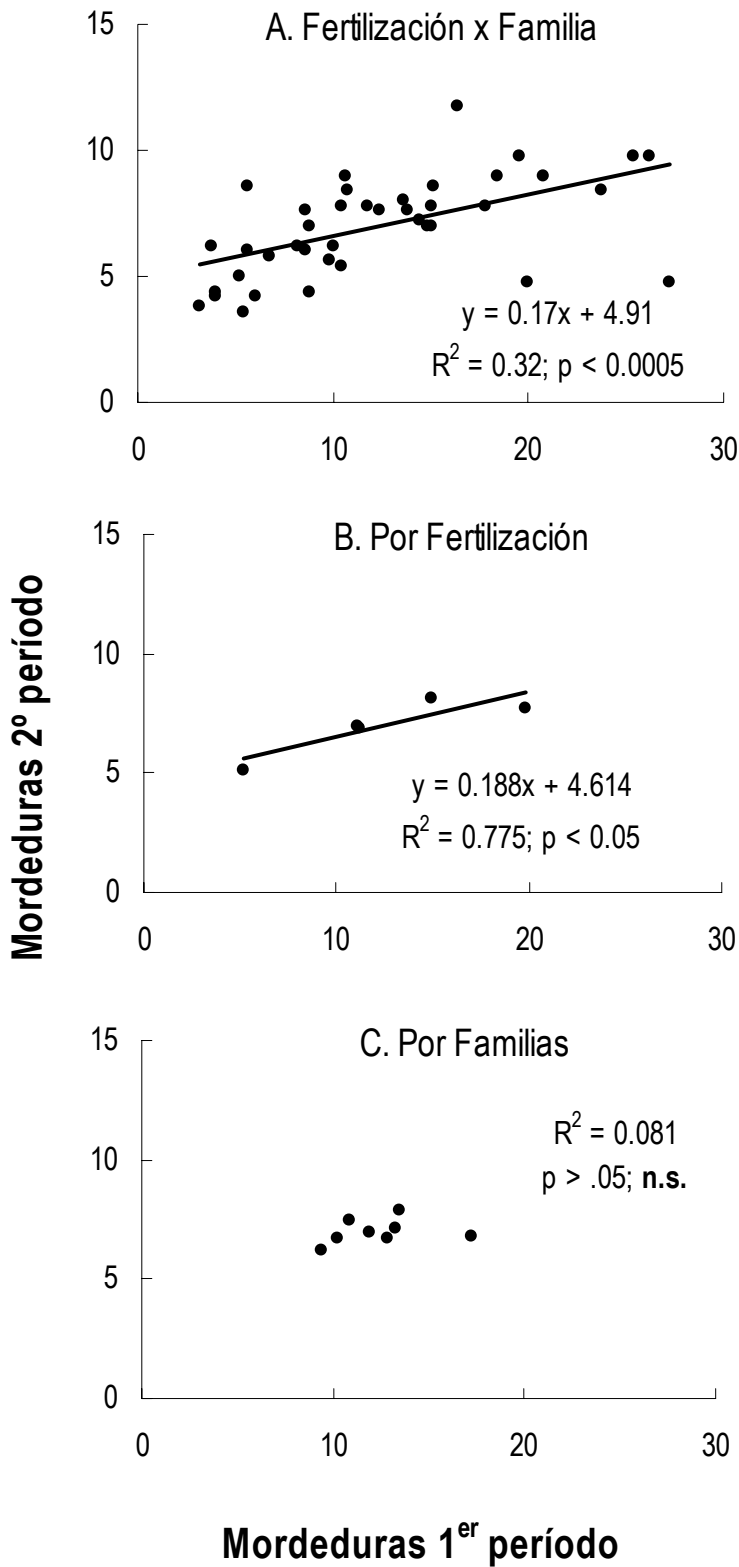


Figura 19. Relación entre la intensidad de ataque por *H. abietis* sobre juveniles de *P. pinaster* en el primer período vegetativo y la intensidad de ataque en el segundo período analizado para un conjunto de 200 individuos pertenecientes a 8 familias de polinización abierta sometidos a 5 tratamientos de fertilización en 5 bloques. Se muestra la información de los promedios familiares para cada tratamiento de fertilización (19.a), los promedios por tratamiento (19.b) y por familia (19.c).

La concentración de fósforo en las acículas analizado en 200 individuos de 8 familias y 5 tratamientos de fertilización no mostró relación alguna con la intensidad del ataque en el período 1 ni en el período 2 (Figura 20). Dado que el muestreo se realizó después del primer ataque y durante el segundo, la concentración foliar de nutriente fue más bien una consecuencia del ataque, con lo que es difícil la interpretación.

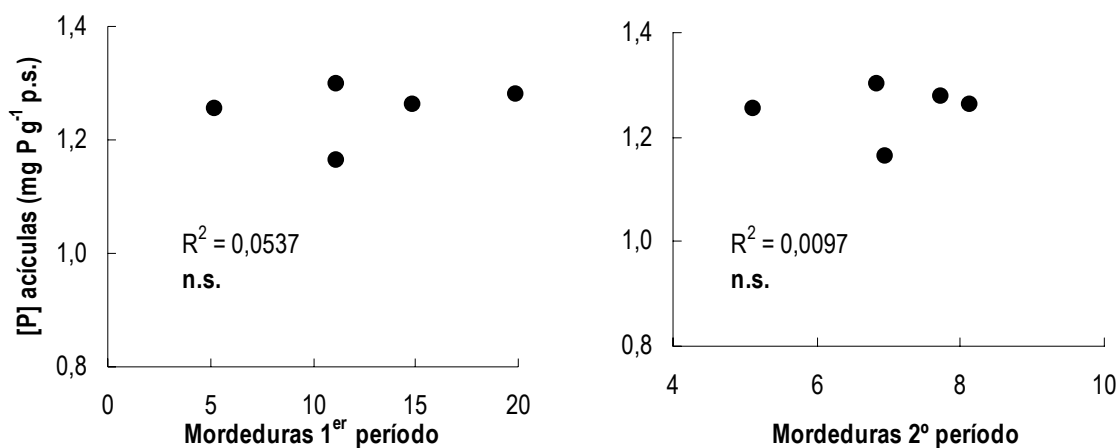


Figura 20. Relación entre la concentración de fósforo foliar y las mordeduras registradas en los dos períodos vegetativos supervisados en cada uno de los 5 tratamientos de fertilización considerados. Cada punto es el promedio de 40 individuos pertenecientes a 8 familias en 5 bloques. Las correlaciones no fueron significativas ($p > 0.05$).

Por tanto, y debido a que el estado nutricional de las plantas sufrió graves alteraciones inducidas por el propio ataque de *H. abietis*, las concentraciones de fósforo en los tejidos muestreados después del ataque no son buenas predictoras de la preferencia de *H. abietis*. Esto quiere decir que las plantas más atacadas deberían ser las que mayor concentración de fósforo tienen tanto en el floema como en las acículas y no es así ya que no existe regresión entre el grado de ataque y la concentración de fósforo (Figura 21).

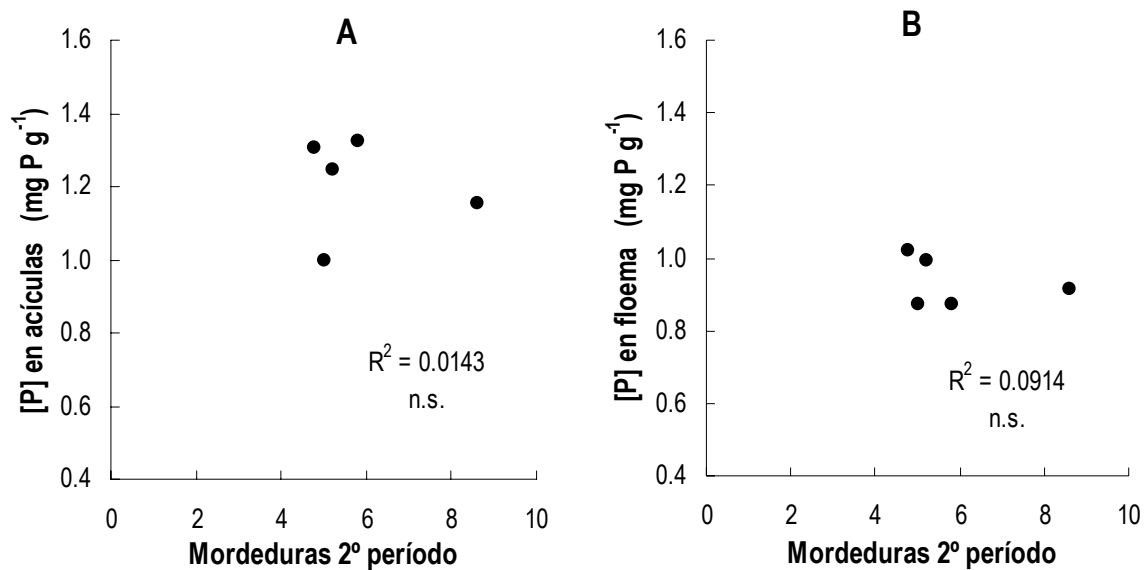


Figura 21. Relación entre la intensidad del ataque en el segundo período vegetativo y la concentración de fósforo en el floema y en las acículas de los ejemplares del testigo comercial TSER en la parcela de Rianxo, atacada por *H. abietis*. No existió relación significativa entre el contenido nutricional y la intensidad del ataque.

5. DISCUSIÓN

Consecuencias sobre el crecimiento

La fertilización de establecimiento es una herramienta ampliamente recomendada para suelos forestales y en particular para los suelos pobres, arenosos y ácidos de Galicia donde existe un déficit importante de nutrientes y la fertilización de establecimiento genera importantes ventajas en cuanto al crecimiento en altura y diámetro de las plantaciones de coníferas (Sánchez-Rodríguez *et al.* 2002; Zas 2003; Zas y Serrada 2003). Además, se ha establecido que el efecto de la fertilización de establecimiento perdura durante varios períodos vegetativos consecutivos (Raupach *et al.* 1975; Warren y Adams 2002; Warren *et al.* 2005). Por ejemplo Raupach (1975) encontró que, en una plantación de *P. pinaster* bajo distintos tratamientos de fertilización fosfórica, existían diferencias de crecimiento a los diez años de su aplicación, y este crecimiento era directamente proporcional a la dosis de fertilizante aplicada. De acuerdo con estos autores, el efecto de la fertilización en la parcela sana de Rebordelo se mantiene tras dos períodos vegetativos, con un beneficio en el crecimiento en altura de un 30% sobre el control (Martins 2005). Sin embargo, en contra de lo esperado, nuestros resultados de la parcela atacada de Rianxo indican que las plantas fertilizadas no difieren, tanto en altura como en diámetro, de las no fertilizadas o control, a pesar de que en el primer período vegetativo después del ataque del *H. abietis* sí se mantuvieron los efectos de la fertilización (Zas *et al.*, 2005b). Por otra parte, los tratamientos más atacados durante el primer período fueron los que presentaron menor crecimiento relativo en el segundo. Esta pérdida de los beneficios esperados de la fertilización fue sin duda resultado del ataque del insecto. La reducción del crecimiento como resultado del ataque de insectos ha sido comúnmente observada en otros estudios, por ejemplo el ataque del curculiónido *Pissodes strobi* sobre abetos fertilizados provocó pérdidas de crecimiento significativas, aunque en este caso fueron compensadas por la ganancia en crecimiento debida a la fertilización (vanAkker *et al.* 2004). Varias hipótesis ecológicas planteadas en otros estudios proponen que la producción de sustancias defensivas y el crecimiento compiten por la misma energía y el carbono asimilado (Bryant *et al.* 1983; Waterman y Mole 1989; Kytö *et al.* 1996). Algunos de estos modelos predicen que la respuesta de las plantas a un aumento de la fertilización implica un descenso en los compuestos carbonados secundarios por lo que las plantas poseen una menor capacidad de defensa

contra el ataque de patógenos. Específicamente, la disponibilidad de recursos para la planta podría modificar la adjudicación de fotosintatos hacia defensas constitutivas e inducidas, resultando en una alteración de la resistencia y del crecimiento (Gershenson 1994, Coley *et al.* 1985, Lombardero *et al.* 2000).

Fertilización e intensidad del ataque

Como ocurrió en el primer período vegetativo después del ataque de *H. abietis* (Zas *et al.* 2005b), las plantas fertilizadas siguieron siendo las más atacadas durante el segundo período vegetativo. La forma en que la fertilización afecta al ataque de *H. abietis* y otros insectos ha sido investigada por otros autores, y de forma general coinciden con los resultados de este estudio (Selander y Immonen 1992, Perkins *et al.* 2004, vanAkker *et al.* 2004, Lejeune *et al.* 2005). VanAkker (2004) realizó recientemente un estudio sobre abetos de Norteamérica bajo diferentes tratamientos de fertilización en el que describe que el ataque de *P. strobi* fue mayor en las plantas más fertilizadas. Perkins (2004) encontró que la fertilización inducía un efecto significativo en la herbivoría ya que aumentando la dieta de fósforo encontró variaciones en el crecimiento y en la dinámica poblacional de *Manduca sexta*. En este mismo sentido Lejeune (2005) teorizó que aunque la fertilización no afectaba de un modo directo a la herbivoría, sin embargo los insectos preferían plantas más vigorosas y con mayor concentración de nutrientes en sus tejidos, por lo que la fertilización sí podría aumentar la susceptibilidad de la planta. El resultado de todos estos trabajos indica que la fertilización afecta considerablemente en el ataque de distintos tipos de insectos. Como *H. abietis* sigue prefiriendo a las plantas fertilizadas pero la fertilización pierde su efecto sobre el crecimiento y sobre la relación entre mordeduras-tamaño en el segundo período vegetativo consecutivo tras el ataque, entonces las preferencias podrían deberse a la fertilización y no al tamaño.

Estado nutricional

El hecho de que la concentración de fósforo en las acículas en la parcela atacada por *H. abietis* no haya reflejado la aplicación de los diferentes tratamientos de fertilización supone una gran alteración del estado fisiológico de la planta, pues es bien sabido que la concentración foliar se emplea como indicador del estado nutricional de las plantas (Zas y Serrada, 20003) y que la fertilización incrementa significativamente la concentración de los nutrientes en las distintas partes de la planta (Warren y Adams

2002, Warren *et al.* 2005). En la parcela análoga de Rebordelo y para los testigos comerciales sí que se observaron las condiciones normales, es decir, la concentración de fósforo en las hojas fue mayor en los tratamientos de fertilización con mayor contenido de fósforo (T1 y T2). Además, los resultados de nuestro estudio muestran que, en la parcela de Rianxo, no existió una relación significativa entre la concentración de fósforo en las acículas y en el floema mientras que esta relación en la parcela sana de Rebordelo fue muy acentuada y lineal. A pesar de que las parcelas son diferentes, lo cual impide realizar comparaciones estadísticas, la diferencia observada en la concentración foliar de fósforo entre las mismas nos lleva a sugerir que estas diferencias son provocadas por el ataque del insecto. Por otro lado, nuestros resultados conducen a una posible discusión que abrieron Orlander y Nilsson (1999), los cuales proponían que el ataque de *H. abietis* provocaba alteraciones en el sistema de transporte de nutrientes, de ahí el probable problema de las plantas para la adjudicación del fósforo presente en el suelo a las acículas.

Por otro lado, la propia herbivoría puede afectar a la concentración de los nutrientes foliares, provocando una alteración de dicha concentración (Clancy 2002). Como respuesta inducida al ataque de los depredadores las plantas podrían variar la concentración foliar de nutrientes con el fin de disminuir el grado de ataque. Se sabe que una baja calidad nutricional del tejido puede ser un mecanismo de resistencia importante debido a que no satisface los requerimientos de nutrientes del insecto (Clancy 2002) y también se sabe que niveles de nutrientes más altos o más bajos de los requeridos por los herbívoros provocan una reducción del desarrollo larval dando lugar a la consiguiente tasa de reproducción más baja de los mismos (Ayres *et al.*, 2000; Clancy 2002). Estas podrían ser algunas de las causas implicadas en la respuesta inducida de las plantas que hace que la concentración de nutrientes sea tan variable dentro de la propia planta.

Aplicaciones prácticas para la gestión forestal

La magnitud de los daños y la mortalidad provocados por el ataque de este insecto sobre una plantación de pinos jóvenes conducen a considerar la posibilidad del uso de medidas alternativas protectoras en zonas con riesgo de ataque. Debido a que la fertilización provocó un aumento en el grado de ataque del insecto, una mayor mortalidad de las plantas y no induce un aumento en el crecimiento de las mismas, se podría cuestionar el empleo de la fertilización de establecimiento en lugares con alto

riesgo de ataque por parte de *H.abietis*. Se ha comprobado que realizando una escarificación del suelo se reduce drásticamente el ataque de este insecto debido a que se eliminarían los lugares de puesta del mismo (Sydow 1997; Orlander y Nilsson 1999; Hannerz *et al.* 2002). También se podría solucionar empleando plantas procedentes de estaquillado en lugar de plantas procedentes de semilla (siempre que la especie lo permita), ya que se ha comprobado que sufren menos frecuencia de ataque (Hannerz *et al.* 2002). Otra solución alternativa sería no realizar una corta a hecho sino que se reservarían árboles para disminuir la posibilidad de ataque a las plantas jóvenes (Sydow *et al.* 1994; Lof 2000; Nordlander *et al.* 2003; Petersson y Orlander 2003). En el caso de realizar una corta a hecho, debería realizarse la plantación por lo menos dos años después de la corta porque en ese caso los insectos ya agotaron prácticamente todos los recursos por lo que su abundancia es mucho menor (Nilsson y Örlander 1995). También podría incluirse el genotipo como un factor importante en la resistencia al gorgojo. Se ha comprobado que existen familias con mayor resistencia al ataque que otras (Zas *et al.* 2005a). Todas estas medidas protectoras físicas y biológicas han dado resultados satisfactorios aunque todavía deben justificarse tanto económica como biológicamente.

6. CONCLUSIONES

1. El efecto de la fertilización de establecimiento sobre el crecimiento, tanto en diámetro como en altura, en una parcela de *P. pinaster* atacada por *H. abietis* se ha perdido dos periodos vegetativos después del ataque
2. La intensidad del ataque de *H. abietis* durante el segundo período vegetativo fue mayor sobre las plantas fertilizadas, siguiendo el patrón observado durante el primer período.
3. El ataque del herbívoro de corteza *H. abietis* sobre juveniles de *P. pinaster* provocó una respuesta inducida en la planta que: (i) alteró la adjudicación de fósforo a las hojas de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes en el suelo y (ii) alteró la distribución del fósforo en hojas y floema ya que no existe una relación entre ambas como la que existiría en otras parcelas no atacadas.
4. La pregunta de si *H. abietis* prefiere tejidos con mayores concentraciones de fósforo no pudo ser contestada con los resultados de este estudio, pues la respuesta de la planta inducida por el ataque alteró enormemente su concentración foliar de fósforo. Sin embargo, ya que *H. abietis* atacó más a las plantas fertilizadas durante los dos periodos analizados, a pesar de que no fueron las de mayor crecimiento en el segundo período, podemos sugerir que, de alguna manera, la fertilización hizo que las plantas resultasen más atractivas para *H. abietis* no por ser las más grandes ni las de mayor crecimiento, sino por otros motivos que es preciso seguir investigando.

7. REFERENCIAS

- Alfaro, R.I. 1995. An induced defense reaction in white spruce to attack by the white pine weevil, *Pissodes strobi*. Canadian Journal of Forest Research **25**: 1725-1730.
- Álvarez, P., Rosa, E., Vega, P., Vega, G. y Rodríguez, R. 2001. Viveros forestales y uso de planta forestal en repoblación en Galicia. *En Proc. of the III Congreso Forestal Nacional*. Granada. pp. 232-238.
- Ayres, M.P. y McLean jr, S.F. 1987. Development of birch leaves and the growth energetics of *Epirrita autumnata*. Ecology **68**: 558-568.
- Ayres, M.P., Wilkens, R.T., Ruel, J.J., Lombardero, M.J. y Vallery, E. 2000. Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi (Coleoptera: Scolytidae). Ecology **81**: 2198-2210.
- Begon, M., Harper, J.L. y Townsend, C.R. 1998. La naturaleza de la depredación. *En Ecología. Individuos, poblaciones y comunidades*. Editorial Omega, S.A., Barcelona. pp. 294-302.
- Berryman, A.A. 1972. Resistance of conifers to invasion by bark-beetle-fungus associations. BioScience **22**: 598-602.
- Björklund, N. 2004. Movement Behaviour and Resource Tracking in the Pine Weevil *Hylobius*. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Silvestria 302 17 pp.
- Bryant, J.P. 1981. Phytochemical deterrence of snowshoe hare browsing by adventitious shoots of four Alaskan trees. Science **213**: 889-900.
- Clancy, K.M., Wagner, M.R. y Tinus, R.W. 1988. Variation in host foliage nutrient concentrations in relation to western spruce budworm herbivory. Canadian Journal of Forest Research **18**: 530-544.
- Clancy, K.M. 1992. Response of western spruce budworm (Lepidoptera, Tortricidae) to increased nitrogen in artificial diets. Environmental Entomology **21**: 331-344.
- Clancy, K.M. 2002. Mechanisms and deployment of resistance in trees to insects. *En Mechanisms of resistance in trees to defoliators*, Eds: M.R. Wagner, K.M. Clancy, F. Lieutier and T.D. Paine. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 79-103.
- Clancy, K.M., Chen, Z. y Kolb, T.E. 2004. Foliar nutrients and induced susceptibility: genetic mechanisms of Douglas-fir resistance to western spruce budworm defoliation. Canadian Journal of Forest Research **34**: 939-949.
- Coley, P.D., Bryant, J.P. y Chapin, F.S. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defence. Science **230**: 895-899.

- Collins, S.A. 1993. The potential of entomopathogenic nematodes to reduce damage by *Hylobius abietis* L., En *Imperial College*. University of London.
- Covelo, F. y Gallardo, A. 2002. Effect of pine harvesting on leaf nutrient dynamics in young oak trees at NW Spain. *Forest Ecology and Management* **167**: 161-172.
- Duffey, S.S. y Felton, G.W. 1989. Role of plant enzymes in resistance to insects. *Enzymes in Agriculture*, Eds: J.R. Whittaker and D.E. Sonnet. American Chemical Society pp. 289-313.
- Facknath, S. y Lalljee, B. 2005. Effect of soil-applied complex fertiliser on an insect-host plant relationship: *Liriomyza trifolii* on *Solanum tuberosum*. The Netherlands Entomological Society *Entomologia Experimentalis et Applicata* **115**: 67-77.
- Forcella, F. 1981. Twig nitrogen content and larval survival of twig girdling beetles *Oncideres cingulata* (Coleoptera, Cerambycidae). *Coleopteris Bulletin* **35**: 211-212.
- Fraysse, J.Y. y Saintonge, F.X. 1996. Forest plantations: a new product for protection against *Hylobius abietis* in maritime pine stands. *Informations Foret, Afocel Armeef* **4**: 6 pp.
- Gallardo, A. y Merino, J. 1993. Leaf decomposition in two Mediterranean ecosystems of Southwest Spain. Influence of substrate quality. *Ecology* **74**: 152-161.
- Gerdin, S. 1977. Observations on pathogens and parasites of *Hylobius abietis* (Coleoptera, Curculionidae) in Sweden. *Invertebrate Pathology* **30**: 263-264.
- Gershenson, J. 1994. Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *Journal of Chemical Ecology* **20**: 1281-1328.
- Gilmore, A.R. 1977. Effects of soil moisture stress on monoterpenes in lobolly pine. *Journal of Chemical Ecology* **3**: 667-676.
- Goverde, M., Erhardt, A. y Stöcklin, J. 2004. Genotype-specific response of a Lycaenid herbivore to elevated carbon dioxide and phosphorus availability in calcareous grassland. *Oecologia* **139**: 383-391.
- Hale, M.G. y Orcutt, D.M. 1987. *The physiology of plants under stress*. John Wiley & Sons. p. 206.
- Hannerz, M., Thorsen, A., Mattsson, S. y Weslien, J. 2002. Pine weevil (*Hylobius abietis*) damage to cuttings and seedlings of Norway spruce. *Forest Ecology and Management* **160**: 11-17.
- Hart, S.V., Kogan, M. y Paxton, J.D. 1983. Effect of soybean phytoalexins on the herbivorous insects Mexican bean beetle and soybean looper. *Journal of Chemical Ecology* **9**: 657-672.

- Haukioja, E. 1982. Inducible defences of white birch to a geometrid defoliator, *Epirrita autumnata*. *En Proc. of the Proc. 5th Int. Symp. Insect-Plant Relationships*. Pudoc, Wageningen. pp. 199-203.
- Haukioja, E., Ossipov, V., Koricheva, J., Larsson, S. y Lempa, K. 1998. Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: cause of variable responses of woody plants to fertilization? *Chemoecology* **18**: 39-42.
- Henry, C.J. 1995. The effect of a braconid ectoparasitoid *Bracon hylobii* Ratz. on larval populations of the large pine weevil *Hylobius abietis* L. University of Ulster.
- Hodges, J.D. y Lorio, P.J.j. 1975. Moisture stress and composition of system oleoresins in loblolly pine. *Forest Science* **21**: 283-290.
- Jervis, M.A. y Kidd, N.C.A. 1999. Parasitoid adult nutritional ecology: implications for biological control. *En Theoretical Approaches to Biological Control*, Eds: B.A. Hawkins and H.V. Cornell. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 131-151.
- Jones jr, J.B., Wolf, B. y Mills, H.A. 1991. Organic matter destruction procedures. *En Plant analysis handbook*. Micro-Macro Publishing, Athens, Georgia. pp. 195-196.
- Jonsson, A., Ericsson, T., Eriksson, G., Kähr, M., Lundkvist, K. y Norell, L. 1997. Interfamily variation in nitrogen productivity of *Pinus sylvestris* seedlings. *Scandinavian Journal of Forest Research* **12**: 1-10.
- Karban, R. 1993. Costs and benefits of induced resistance and plant density for a native shrub, *Gossypium thurberi*. *Ecology* **74**: 9-19.
- Karban, R. y Baldwin, I.T. 1997. Book Review in *Ecology: Induced responses to herbivory. Interspecific interactions*. University of Chigago Press, Illinois.
- Koricheva, J., Larsson, S., Haukioja, E. y Keinänen, M. 1998. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos* **83**.
- Kuc, J. y Rush, J.S. 1985. Phytoalexins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **236**: 455-472.
- Kuc, J. 1987. Plant immunization and its applicability for disease control. *En Innovative Approaches to Plant Disease Control*, Eds: I. Chet, New York. pp. 225-274.
- Kytö, M., Niemelä, 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**: 763-769.
- Lane, S.D., Mills, N.J. y Getz, W.M. 1999. The effects of parasitoid fecundity and host taxon on the biological control of insect pests: the relationship between theory and data. *Ecological Entomology* **24**: 181-190.

- 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., Ahmed, S.I. y Hogan, L. 1994. Adult feeding preferences of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). *European Journal of Entomology* **91**: 385-389.
- Lejeune, K.D., Suding, K.N., Sturgis, S., Scott, A. y Seastedt, T.R. 2005. Biological control insect use of fertilized and unfertilized diffuse knapweed in Colorado grassland. *Environmental Entomology* **34** (1): 225-234.
- Levins, R. 1968. *Evolution in Changing Environments: Some Theoretical Explorations*. Princeton University.
- Lof, M. 2000. Influence of patch scarification and insect herbivory on growth and survival in *Fagus sylvatica* L., *Picea abies* L. Karst. and *Quercus robur* L. seedlings following a Norway spruce forest. *Forest Ecology and Management* **134**: 111-123.
- Löf, M., Isacson, G., Rydberg, D. y Welandera, T.N. 2004. Herbivory by the pine weevil (*Hylobius abietis* L.) and short-snouted weevils (*Strophosoma melanogrammum* Forst. and *Otiorhynchus scaber* L.) during the conversion of a wind-thrown Norway spruce forest into a mixed-species plantation. *Forest Ecology and Management* **190**: 281-290.
- Lombardero, M.J., Ayres, M.P., Lorio, P.L. y Ruel, J. 2000. Environmental effects on constitutive and inducible resin defences of *Pinus taeda*. *Ecology Letters* **3**: 329-339.
- Mabry, C.M. y Wayne, P.W. 1997. Defoliation of the annual herb *Abutilon theophrasti*: mechanisms underlying reproductive compensation. *Oecologia* **111**: 225-232.
- Mari, S., Jansson, G. y Jonsson, A. 2003. Genetic variation in nutrient utilization and growth traits in *Picea abies* seedlings. *Scandinavian Journal of Forest Research* **18**: 19-28.
- Martins, P. 2005. Efecto de la fertilización de establecimiento en el comportamiento de familias de polinización abierta de *Pinus pinaster*. Proyecto Fin de Carrera, Escuela Politécnica Superior de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela.
- Maschinski, J. y Whitham, T.G. 1989. The continuum of plant responses to herbivory: the influence of plant association, nutrient availability, and timing. *American Naturalist* **134**: 1-19.
- Matson, P.A. y Hain, F.P. 1985. Host conifer defense strategies: a hypothesis. *En Proc. of the The Role of the Host in the Population Dynamics of Forest Insects*. Banff, Alta. Eds: L.Safranyik. Canadian Forest Service, Pacific Forestry Centre, Victoria. pp. 33-42.

- Mattson, W.J. y Haack, R.A. 1987. The role of drought in outbreaks of plant-eating insects. *Bioscience* **37**: 110-118.
- Merino, A., Rodríguez-López, A., Brañas, J. y Rodríguez-Soalleiro, R. 2003. Nutrition and growth in newly established plantations of *Eucalyptus globulus* in northwestern Spain. *Annals of Forest Science* **60**: 509-517.
- 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.
- Myers, J.H. y Bazely, D. 1990. Thorns, spines, prickles and hairs: are they stimulated by herbivory and do they deter herbivores? *En Phytochemical Induction by Herbivores*, Eds: J. Wiley, New York.
- 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.
- Nordenhem, H. y Nordlander, G. 1994. Olfactory oriented migration through soil by root-living *Hylobius abietis* (L.) larvae (Col, Curculionidae). *Journal of Applied Entomology* **117**: 457-462.
- Nordlander, G., Bylund, H., Örlander, G. y Wallertz, K. 2003. Pine weevil population density and damage to coniferous seedlings in a regeneration area with and without shelterwood. *Scandinavian Journal of Forest Research* **18**: 191-198.
- O'Reilly-Wapstra, J.M., Potts, B.M., McArthur, C. y Davies, N.W. 2005. Effect of nutrient variability on the genetic-based resistance of *Eucalyptus globulus* to a mammalian herbivore and on plant defensive chemistry. *Oecologia* **142**: 597-605.
- Örlander, G., Nilsson, U. y Nordlander, G. 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. y Nilsson, U. 1999. Effect of Reforestation Methods on Pine Weevil (*Hylobius abietis*) Damage and Seedling Survival. *Scandinavian Journal of Forest Research* **14**: 341-354.
- Örlander, G., Nordlander, G., Wallertz, K. y Nordenhem, H. 2000. Feeding in the crowns of Scots pine trees by the pine weevil *Hylobius abietis*. *Scandinavian Journal of Forest Research* **15**: 194-201.
- Örlander, G., Nordlander, G. y Wallertz, K. 2001. Extra Food Supply Decreases Damage by the Pine Weevil *Hylobius abietis*. *Scandinavian Journal of Forest Research* **16**: 450-454.
- Örlander, G. y Nordlander, G. 2003. Effects of field vegetation control on pine weevil (*Hylobius abietis*) damage to newly planted Norway spruce seedlings. *Annual Forest Science* **60**: 667-673.

- 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.
- Perkins, A.C., Woods, H.A., Harrison, J.F. y Elser, J.J. 2004. Dietary phosphorus affects the growth of larval *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **55**: 153-168.
- Petersson, M. y Örlander, G. 2003. Effectiveness of combinations of shelterwood, scarification, and feeding barriers to reduce pine weevil damage. *Canadian Journal of Forest Research* **33**: 64-73.
- Petterson, M., Örlander, G. y Nordlander, G. 2005. Soil features affecting damage to conifer seedlings by the pine weevil *Hylobius abietis*. *Forestry* **78**: 83-92.
- Piou, D. 1993. Role d'*Hylobius abietis* (L.) (Col, Curculionidae) dans le transport de *Leptographium procerum* (Kendr) Wingf et son inoculation au pin sylvestre. *Annales de Sciences Forestière* **50**: 297-308.
- Prada, E. 2005. Efecto da fertilización e do xenotipo no grao de ataque de *Hylobius abietis* L. en plantacións de *Pinus pinaster* Ait. e *Pinus radiata* D.Don. Proyecto Fin de Carrera **en preparación**, Escuela Politécnica Superior de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela.
- Pye, A.E. y Pye, N.L. 1985. Different applications of the insect parasitic nematode *Neoaplectana carpocapsae* to control the large pine weevil, *Hylobius abietis*. *Nematologica* **31**: 109-116.
- Raupach, M., Clarke, A.R.P., Gibson, B.F. y Cellier, K.M. 1975. Cultivation and fertilizer effects on the growth and foliage nutrient concentrations of *Pinus radiata*, *P. pinaster* and *P. caribaea* on three soil types at Anglesea (Victoria).
- Reeve, J.R., Ayres, M.P. y Lorio, P.L. 1995. Host suitability, predation and bark beetle population dynamics. *En Population dynamics: new approaches and synthesis.*, Eds: N. Cappuccino y P. Price. Academic Press, San Diego. pp. 339-357.
- Rosner, S. y Hannrup, B. 2004. Resin canal traits relevant for constitutive resistance of Norway spruce against bark beetles: environmental and genetic variability. *Forest Ecology and Management* **200**: 77-87.
- Russell, G.B., Sutherland, O.R.W., Hutchins, R.F.N. y Christmas, P.E. 1978. Vestitol: a phytoalexin with insect feeding-deterrent activity. *Journal of Chemical Ecology* **4**: 571,579.
- Sánchez-Rodríguez, F., Rodríguez-Soalleiro, R., Español, E., López, C.A. y Merino, A. 2002. 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.

- SAS-Institute 1999. SAS/STAT User's guide, Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Selander, 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 Fenn.* **26**: 75-84.
- Shrimpton, D.M. y Whitney, H.S. 1968. Inhibition of growth of blue stain fungi by wood extractives. *Canadian Journal of Botany* **46**: 757-761.
- StatSoft, Inc. (1999). Statistica 6.0.m Electronic Statistics Textbook. Tulsa, OK, USA. StatSoft. WEB: <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>
- Strauss, S.Y. y Agrawal, A.A. 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* **14**: 179-185.
- Sydow, F.v., Orlander, G. y Von Sydow, F. 1994. The influence of shelterwood density on *Hylobius abietis* (L.) occurrence and feeding on planted conifers. *Scandinavian Journal of Forest Research* **9**: 367-375.
- Sydow, F.V. 1997. Abundance of pine weevils (*Hylobius abietis*) and damage to conifer seedlings in relation to silvicultural practices. *Scandinavian Journal of Forest Research* **12**: 157-167.
- Tabashnik, B.E. 1982. Responses of pest and nonpest *Colias* butterfly larvae to intra-specific variation in leaf nitrogen and water content. *Oecologia* **55**: 389-394.
- Thackner, J.R.M., Bryan, W.J., McGinley, C., Heritaage, S. y Strang, R.H.C. 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.
- Trier, T. y Mattson, W.J. 1997. Needle mining by the spruce budworm provides sustenance in the midst of privation. *Oikos* **79**: 241-246.
- Tuomi, J., Niemelä, P., Hautala, E.L., Siren, S. y Neuvonen, S. 1984. Nutrient excess: an explanation for anti-herbivore responses to defoliation. *Oecologia* **61**: 208-210.
- Turtola, S., Manninen, A.M., Holopainen, J.K., Levula, T., Raitio, H. y Kainulainen, P. 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. 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. *En Proc. of the I Congreso Forestal Español*. Pontevedra, Spain. Eds: J. Silva-Pando y G. Vega. Xunta de Galicia. pp. 129-134.

- Warren, J.M., Allen, H.L. y Booker, F.L. 1999. Mineral nutrition, resin flow and phloem phytochemistry in loblolly pine. *Tree Physiology* **19**: 655-633.
- Warren, C.R. y Adams, M.A. 2002. Phosphorus affects growth and partitioning of nitrogen to Rubisco in *Pinus pinaster*. *Tree Physiology* **22**: 11-19.
- Warren, C.R., McGrath, J.F. y Adams, M.A. 2005. Differential effects of N, P and K on photosynthesis and partitioning of N in *Pinus pinaster* needles. *Annual Forest Science* **62**: 1-8.
- White, T.R.C. 1993. *The inadequate environment: nitrogen and the abundance of animals*. Springer, Berlin.
- Whitham, T.G. 1983. Host manipulation of parasites: within-plant variation as a defense against rapidly evolving pests. *En Natural and Managed Systems*, Eds: R.F. Denno y M.S. McClure. Academic, New York. pp. 15-41.
- Yang, Y. y Joern, A. 1994. Compensatory feeding in response to food quality by *Melanopus differentialis*. *Physiological Entomology* **19**: 75-82.
- Zas, R. 2003. Foliar nutrient status and tree growth response of young *Pseudotsuga menziesii* Mirb. (Franco) to nitrogen, phosphorus and potassium fertilization in Galicia (Northwest Spain). *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales* **12**: 75-85.
- Zas, R. y Serrada, R. 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., Sampedro, L., Prada, E. y Fernández-López, J. 2005a. Genetic variation of *Pinus pinaster* Ait. seedlings in susceptibility to *Hylobius abietis* L. *Annals of Forest Science* (en prensa).
- Zas, R., Sampedro, L., Prada, E., Lombardero, M.J. y Fernández-López, J. 2005b. Fertilization increases *Hylobius abietis* L. damage in *Pinus pinaster* Ait. seedlings. *Forest Ecology and Management* (en revisión)
- Zas, R. y Fernández-López, J. 2005. Juvenile genetic parameters and genotypic stability of *Pinus pinaster* Ait. open pollinated families under different water and nutrient regimes. *Forest Science* **51**: 165-174.