

UNIVERSIDADE DE VIGO

ESCUELA UNIVERSITARIA DE INGENIERÍA TÉCNICA FORESTAL DE PONTEVEDRA



UNIVERSIDADE
DE VIGO

IMPRIMACIÓN DE RESISTENCIA EN TRES ESPECIES DE PINO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE METIL JASMONATO A BAJAS CONCENTRACIONES: ALTERACIÓN DE LA PRODUCCIÓN INDUCIDA DE RESINA

PROYECTO FIN DE CARRERA

Autor:

MANUEL MUÑOZ CARVAJALES

Directores

RAFAEL ZAS ARREGUI LUIS SAMPEDRO PÉREZ

Tutor

JOSE CARLOS SOUTO OTERO

2014

UNIVERSIDADE DE VIGO

ESCUELA UNIVERSITARIA DE INGENIERÍA TÉCNICA FORESTAL DE PONTEVEDRA



UNIVERSIDADE
DE VIGO

IMPRIMACIÓN DE RESISTENCIA EN TRES ESPECIES DE PINO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE METIL JASMONATO A BAJAS CONCENTRACIONES: ALTERACIÓN DE LA PRODUCCIÓN INDUCIDA DE RESINA

El alumno

Los directores

Fdo. Manuel Muñoz Carvajales

Fdo. Rafael Zas Arregui Fdo. Luis Sampedro Pérez

VºBº. Tutor

Fdo. Jose Carlos Souto Otero

Mayo 2014

Quiero dedicarles este trabajo a todas las personas que me han ayudado a realizarlo en especial a los tutores Rafael Zas y Luis Sampedro y dedicárselo también a mis padre, a Katia y a mi abuelo que siempre me han ayudado y apoyado en todo.

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

ÍNDICE

Resumo.....	10
Resumen.....	11
Summary.....	12
1.- Introducción.....	14
1.1.- Defensas químicas en pinos.....	15
1.2.- Estrategias defensivas en pinos.....	17
1.3.- Papel del jasmonato en la activación de las defensas inducidas...	19
1.4.- <i>Priming</i>	23
2.- Justificación, hipótesis y objetivos.....	26
3.- Materiales y métodos.....	29
3.1.- Los hospedadores.....	29
3.1.1.- <i>Pinus pinaster</i>	30
3.1.2.- <i>Pinus radiata</i>	32
3.1.3.- <i>Pinus sylvestris</i>	33
3.2.- El herbívoro (<i>Hylobius abietis</i>).....	36
3.3.- Material vegetal empleado.....	38
3.4.- Captura y mantenimiento del curculiónido <i>H. abietis</i>	38
3.5.- Diseño experimental y tratamientos de MeJa.....	40
3.6.- Bioensayo.....	42
3.7.- Determinación del contenido de resina.....	45
3.8.- Análisis estadísticos.....	48

4.- Resultados.....	49
4.1.- Efecto de la aplicación de MeJa a concentraciones bajas sobre las defensa constitutivas.....	50
4.2.- Efecto de la aplicación de MeJa a concentraciones bajas sobre la resistencia efectiva frente a <i>H.abietis</i>	52
4.3.- Efecto de la aplicación de MeJa a concentraciones bajas sobre el <i>Priming</i> de la maquinaria defensiva.....	54
5.- Discusión.....	58
5.1.- Respuesta a la aplicación de MeJa a bajas concentraciones.....	59
5.2.- Respuesta a la herbivoría de <i>Hylobius abietis</i>	61
5.3.- Imprimación de defensas mediante la aplicación de MeJa.....	62
6.- Conclusiones.....	64
7.- Bibliografía.....	65
8.- Agradecimientos.....	70

Resumo

Imprimación da resistencia en tres especies de piñeiro mediante a aplicación de Metil xasmonato a baixas concentracións: alteración da produción inducida de resina.

As plantas deféndense dos herbívoros e patóxenos mediante dous mecanismos de defensas principais: (defensas constitutivas e defensas inducidas). As primeiras están sempre presentes e as segundas só actívanse en resposta a un ataque. Estudos anteriores mostran que, a aplicación de altas concentracións de metil xasmonato (MeXa), una fitohormona involucrada na activación das defensas inducidas, provoca unha resposta similar a herbivoría real en plántulas de piñeiro, aumentando a produción de resina e reducindo os danos producidos por distintos insectos e fungos patóxenos. Así, a indución de defensas mediante aplicación de MeJa propónse como una interesante alternativa de control fitosanitario. A desvantaxe desta ferramenta, é que, o incrementar a inversión en mecanismos defensivos, prodúcese unha redución doutras actividades metabólicas vitais, e en particular una redución do crecemento. Recentemente descubriuse un estado intermedio de prealerta coñecido como *Priming*, no que as plantas preparan a súa maquinaria defensiva sin xerar cambios na produción de defensas e polo tanto sen afectar ó crecemento. As plantas *imprimadas*, son capaces sen embargo de responder de forma máis rápida e eficaz a un dano posterior de herbivoría. Neste traballo de investigación se estudíu si este intermedio entre defensas constitutivas e defensas inducidas tamén existe no xénero *Pinus*. Realizouse un experimento con plantas xóvenes de tres especies de Piñeiro (*P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*). Aplicamos baixas concentracións de MeXa (0-25 mM) e exploramos o seu efecto na capacidade das plántulas de piñeiro de responder aos danos causados polo insecto (*Hylobius abietis*), aumentando a concentración de resina non volátil nos seus tecidos. A herbivoría deste insecto, un curculiónido comedor de corteza e floema, só produciu alteracións no contido de resina no talo superior das plantas de *P. pinaster* e *P. sylvestris*. Para estas dúas especies, observouse un aumento da resina non volátil entre un 30% e un 60% en resposta a herbivoría polo insecto. Esta resposta non foi igual en tódolos pretratamentos de MeXa. A aplicación de MeXa a baixa concentración (1, 5 mM) aumentou notablemente a capacidade destas dúas especies de responder o consumo do insecto aumentando a concentración de resina non volátil na parte superior do talo. Polo contrario non observáronse efectos significativos na resina non volátil na parte inferior do talo ni nas acículas, e tampouco en ningún dos tecidos de *P. radiata*. Estos resultados apuntan hacia a implicación do xasmonato nos mecanismos de imprimación da maquinaria defensiva en especies de pino, polo menos en *P. pinaster* e *P. sylvestris*.

Palabras claves: defensas inducidas, defensas constitutivas, *Hylobius abietis*, Metil Jasmonato, *Pinus pinaster*, *Pinus radiata*, *Pinus sylvestris*, *Priming*, resistencia herbivoría.

Resumen

Imprimación de resistencia en tres especies de pino mediante la aplicación de Metil Jasmonato a bajas concentraciones: alteración de la producción inducida de resina.

Las plantas se defiende de los herbívoros y patógenos mediante dos mecanismos de defensas principales: (defensas constitutivas y defensas inducidas). Las primeras están siempre presentes y las segundas solo se activan en respuesta a un ataque. Estudios previos muestran que, la aplicación de altas concentraciones de metil jasmonato (MeJa), una fitohormona involucrada en la activación de defensas inducidas, provoca una respuesta similar a la herbivoría real en plántulas de pino, aumentando la producción de resina y reduciendo los daños producidos por distintos insectos y hongos patógenos. Así, la inducción de defensas mediante aplicación de MeJa se ha propuesto como una interesante alternativa de control fitosanitario. El inconveniente de esta herramienta, es que, al incrementar la inversión en mecanismos defensivos, se produce una disminución de otras actividades metabólicas vitales, y en particular una reducción del crecimiento. Recientemente se ha descubierto un estado intermedio de prealerta, conocido como *Priming*, en la que las plantas preparan su maquinaria defensiva sin generar cambios en la producción de defensas y por tanto sin afectar al crecimiento. Las plantas *imprimadas*, son capaces sin embargo de responder de forma más rápida y eficaz a un daño posterior de herbivoría. En este trabajo de investigación se estudió si este intermedio entre defensas constitutivas y defensas inducidas también existe en el género *Pinus*. Se realizó un experimento con plantas jóvenes de tres especies de Pino (*P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*). Para ello, aplicamos bajas concentraciones de MeJa (0-25 mM) y exploramos su efecto en la capacidad de las plántulas de pino de responder a los daños causados por el insecto (*Hylobius abietis*), incrementando la concentración de resina no volátil en sus tejidos. La herbivoría de este insecto, un curculiónido comedor de corteza y floema, solo produjo alteraciones en el contenido de resina en el tallo superior de las plantas de *P. pinaster* y *P. sylvestris*. Para estas dos especies, se observó un aumento de resina no volátil de entre un 30% y un 60% en respuesta a la herbivoría del insecto. Esta respuesta no fue igual en todos los pretratamientos de MeJa. La aplicación de MeJa a baja concentración (1, 5 mM) aumentó notablemente la capacidad de estas dos especies de responder al consumo del insecto incrementando la concentración de resina no volátil en la parte superior del tallo. Por el contrario no se observaron efectos similares en la resina no volátil en la parte inferior del tallo ni en las acículas, ni tampoco en ninguno de los tejidos de *P. radiata*. Estos resultados apuntan hacia la implicación de jasmonato en la imprimación de la maquinaria defensiva en especies de pino, al menos en *P. pinaster* y *P. sylvestris*.

Palabras claves: defensas inducidas, defensas constitutivas, *Hylobius abietis*, Metil Jasmonato, *Pinus pinaster*, *Pinus radiata*, *Pinus sylvestris*, Priming, resistencia herbivoría.

Abstract

Priming strength in three species of pine by applying low concentrations Metil Jasmonato: alteration of induced resin production.

Plants are defended from herbivores and pathogens by two main mechanisms of defenses: (constitutive defenses and induced defenses). The first one is always present and the second is only activated in response to an attack. Previous studies show that the application of high concentrations of methyl jasmonate (MeJa), a phytohormone involved in the activation of induced defenses which a similar response in the herbivore real pine seedling, increasing resin production and reducing damage from various insects and fungal pathogens. So, the induction of defenses by applying MeJa has been proposed as an interesting alternative to phytosanitary control. The drawback of this tool is that, by increasing investment in defense mechanisms, there is a decrease of other vital metabolic activities, and in particular a reduction of the growth. It was recently discovered an intermediate state of pre-alert, known as priming, in which plants prepare their defense equipment without generating changes in the production of defenses and thus without affecting their growth. Primed plants, are nevertheless able to respond more quickly and effectively to a subsequent herbivory damage. In this research we studied whether this intermediate between constitutive and induced defenses also exists in the genus *Pinus*. An experiment was conducted with three seedlings Pine species (*P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*). To this end, we apply low concentrations of MeJa (0-25 mM), and expire its effects on the ability of pine seedlings to respond to insect damage (*Hylobius abietis*), increasing the concentration of non-volatile resin in their tissues. This insect herbivory a dining curculionid crust and phloem, only produced changes in resin content in the top stem of plants *P. pinaster* and *P. sylvestris*. For these two species, an increase in non-volatile resin between 30% and 60% was observed in response to insect herbivory. This answer was not the same in all MeJa's pre-treatments. MeJa application at a low concentration (1, 5 mM) significantly increased the capacity of these two species of insect consumer respond by increasing the concentration of non-volatile resin at the top of the stem. Rather similar effects were observed in non-volatile resin at the lower part of stem or on the needles, or in any of the tissues of *P. radiata*. These results point to the possibility of applying primer MeJa as defensive machinery pine species, at least in *P. pinaster* and *P. sylvestris*.

Keywords: constitutive defenses, induced defenses, *Hylobius abietis*, Metil Jasmonato, *Pinus pinaster*, *Pinus radiata*, *Pinus sylvestris*, Priming, herbivory resistance.

INTRODUCCIÓN



1.-INTRODUCCIÓN

1.1.- Defensas químicas y físicas en pinos

Las coníferas son organismos de larga duración que llevan en la tierra decenas de millones de años. Hoy en día se expanden por todo tipo de hábitats, desde el trópico hasta zonas boreales, y desde el nivel del mar hasta la montaña. Son muchos los autores que atribuyen este éxito a sus potentes mecanismos de defensas que les permiten sobrevivir y reproducirse a pesar de la gran cantidad de enemigos a los que se encuentran expuestas a lo largo de su prolongada vida.

Las distintas especies de coníferas tienen diferentes estrategias de defensa, si bien, en general, éstas se conforman mediante la superposición de defensas químicas, como la producción, acumulación y liberación de sustancias repelentes para los insectos o patógenos (fenoles, terpenos, alcaloides...) dispersadas por los diferentes tejidos de la planta, y defensas mecánicas, como la presencia de espinas, pelos, escamas o tejidos impregnados con polímeros como la lignina o la suberina que proporciona una mayor resistencia a la penetración, degradación e ingestión por parte de los organismos invasores (Honkanen et al., 1999).

La combinación de estos mecanismos defensivos (mecánicos y químicos), permite a las plantas defenderse de un amplio rango de organismos herbívoros, algo clave en especies de vida larga como las coníferas. Las defensas químicas suelen ser más efectivas contra herbívoros generalistas, mientras que las mecánicas protegen también a las plantas de enemigos especializados (Koricheva et al., 2004).

La función última de las defensas es proteger el floema, rico en nutrientes y carbohidratos, y las regiones meristemáticas, responsables del crecimiento continuo de los árboles (cambium vascular, meristemas apicales, etc.). En los árboles también es importante proteger frente a la degradación las estructuras de soporte como la madera del tronco y las raíces.

Una de las defensas químicas más importante en las coníferas es la producción de oleorresina, una sustancia viscosa con eficaces propiedades defensivas. La oleorresina se produce a lo largo de todos los tejidos del árbol, principalmente en células especializadas que rodean a los canales resiníferos (Trapp y Croteau, 2001), un sistema conductor específico de este grupo de plantas, que constituye una densa red de canales axiales y radiales que discurren por todos los tejidos, desde la madera hasta las acículas (Figura 1). La oleorresina está compuesta principalmente por una mezcla de mono y sesquiterpenos, que constituyen la fracción volátil, y ácidos resiníferos, que polimerizan en contacto con el aire. (Franceschi, Krokene & Krekling 2005).

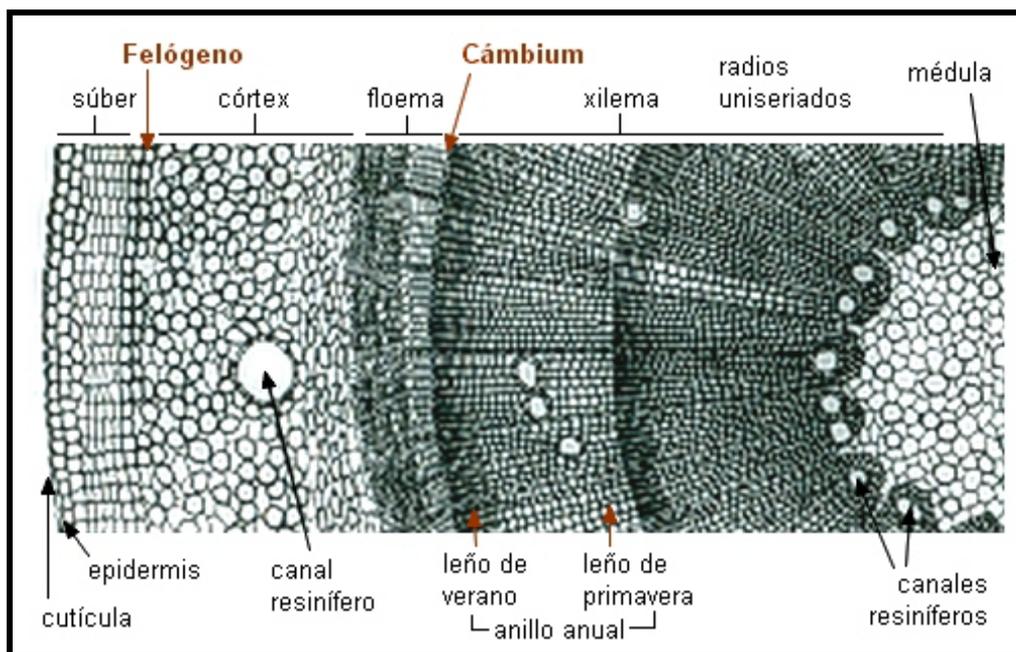


Figura 1. Corte transversal del tallo de una plántula de *Pinus pinaster* mostrando los canales resiníferos en el floema y en el xilema. (<http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema15/15-2xilorigen.htm>)

La secreción de resina es un elemento importante en la protección de las coníferas frente a enemigos, actuando tanto como barrera física, dificultando la entrada de organismos patógenos, como defensa química, ya que muchos de los terpenos que contiene resultan nocivos, repelentes e incluso tóxicos para algunas especies de herbívoros. La resina se acumula en los canales resiníferos bajo presión; cuando la planta sufre algún tipo de daño, la resina fluye contra el organismo atrapándolo o matándolo debido a su toxicidad (Franceschi et al., 2005). Además, los ácidos resiníferos polimerizan en contacto con el aire, actuando como una medida eficaz de sellado de las heridas abiertas por los agresores bióticos (Bohlmann 2008).

Además de la oleoresina otro grupo mayoritario de compuestos químicos defensivos presentes en las coníferas son los compuestos fenólicos. Aunque este grupo de compuestos también juega una variedad muy heterogénea de roles en las plantas (protección de la radiación ultravioleta, funciones relacionadas con la atracción de polinizadores, agentes alelopáticos, etc.), muchos son compuestos conocidos de herbívoros y patógenos con propiedades repelentes y tóxicas.

Los fenoles están presentes principalmente en las acículas, en el floema y en la corteza, y su concentración es elevada en células especializadas del parénquima denominadas células PP (células polifenólicas del parénquima) (Franceschi et al, 2005).

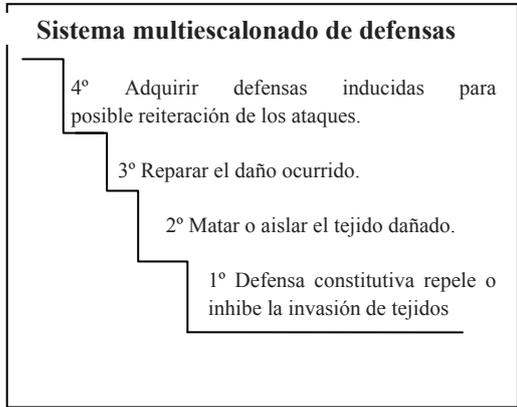
La producción de estructuras y compuestos defensivos supone un coste energético para la planta. Todos los recursos utilizados en la defensa de la planta dejan de estar disponibles para otras funciones, como puede la reproducción o el crecimiento. Así, una elevada inversión en defensas puede resultar negativo si finalmente la planta no

se ve afectada por ningún agresor. Este es uno de los principios fundamentales que explica por un lado la existencia de una gran variación intraespecífica en la inversión en defensas y, por otro, la capacidad de las plantas para regular la adjudicación de recursos a mecanismos defensivos, en función de las condiciones ambientales (plasticidad fenotípica). Este último punto es fundamental en los árboles, pues por tratarse de especies longevas, es previsible que se vean expuestos a condiciones ambientales cambiantes a lo largo de su vida.

1.2.- Estrategias defensivas en pinos

Según propone Franceschi et al. (2005), existen cuatro fases en el sistema defensivo de las plantas independientemente del tipo de ataques y del organismo agresor. En una primera fase las defensas constitutivas impiden o repelen la invasión. Si esto no funcionase, se pasaría a una segunda fase donde el objetivo sería aislar, matar o frenar la invasión del organismo. En la tercera fase se procedería a sellar los daños producidas para que la planta pudiese seguir funcionando con normalidad y de este modo evitar el ataque de oportunistas. Y para concluir, la última fase consistiría en adquirir, una resistencia sistemática que ayude a las plantas a defenderse de manera más eficaz ante la aparición de posibles futuros ataques (Figura 2).

Las defensas constitutivas e inducidas conforman un sistema multiescalonado con un marcado componente espacial y temporal. El componente espacial está determinado por la disposición de las defensas constitutivas de la capa de la peridermis de la zona del cambium (Franceschi et al., 2005).



Esquema de los tipos de defensas en pinaceas

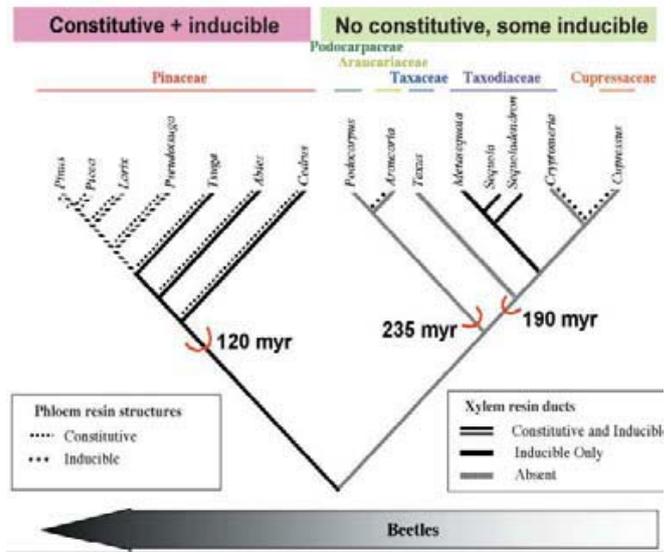
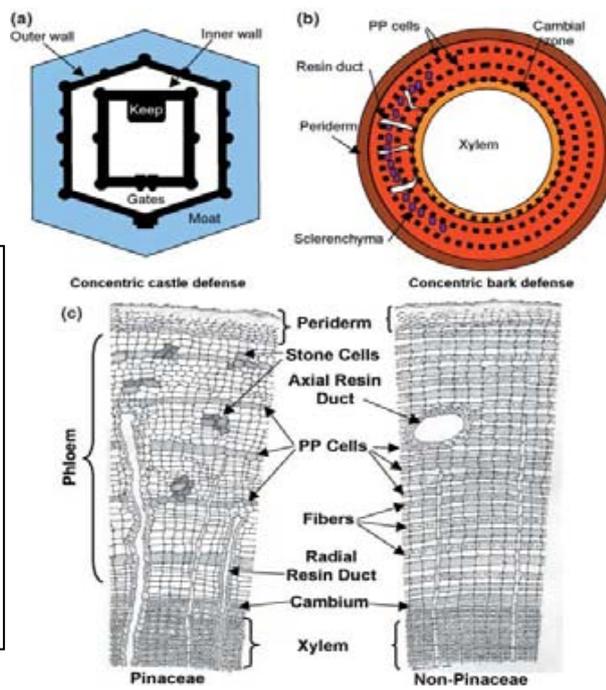


Figura 2. Representación esquemática de la superposición espacial y temporal de las distintas estrategias defensivas de coníferas, incluyendo defensas constitutivas e inducidas en conífera (Franceschi et al. 2005)

Atendiendo a la figura anterior, las defensas físicas y químicas pueden clasificarse en dos modalidades en función del momento en el que son generadas: defensas constitutivas y defensas inducidas.

Las primeras siempre están presentes en la planta, independientemente de si la planta ha sufrido o no daños por un enemigo biótico. Las defensas constitutivas suponen

pues, una defensa basal que protege de ataques de insectos herbívoros u otros patógenos (Franceschi et al., 2005).

Las defensas inducidas se producen en respuesta a un ataque, con la finalidad de incrementar las defensas y frenar el avance del agresor así como prever posibles ataques futuros (Karban et al., 1997; Franceschi et al., 2005). Este tipo de defensas permite a las plantas regular la inversión en mecanismos defensivos en función del riesgo real al que están sometidas, optimizando así los costes de producción (Van Dam & Baldwin 1998; Agrawal, Strauss & Stout 1999; Cipollini & Heil 2010). La inversión solo se materializa cuando realmente es necesario, es decir ante un ataque, dejando disponibles los recursos para cualquier otra función cuando la planta no está sometida a estreses bióticos.

Pero ambas estrategias defensivas (constitutivas e inducidas) tienen sus ventajas y sus inconvenientes. Una de las ventajas que presentan las defensas constitutivas es que al estar formadas antes de que se produzca el ataque, están operativas en el momento preciso. En otras palabras, con las defensas constitutivas la planta ya está preparada para cualquier agresión. Sin embargo, si no ocurriese ningún ataque, este tipo de defensas al estar ya sintetizadas desvían una gran cantidad de recursos y energía de forma inútil, recursos que podrían haberse utilizado para otros procesos (Franceschi et al., 2005). En cambio, en el caso de las defensas inducidas, solo se dedica la energía necesaria cuando se produce la agresión (Agrawal et al., 1999; Franceschi et al., 2005). El gran inconveniente es que estas respuestas pueden no producirse de una manera inmediata, lo que haría que la planta continuase siendo vulnerable al ataque durante dicho proceso de formación (Franceschi et al., 2005).

La intensidad de los mecanismos de defensa, bien sean constitutivos o inducidos, varían dependiendo de la edad, genotipo y especie (Karban and Baldwin, 1997), y están afectados por los factores ambientales como la sequía (Estiarte et al., 1994; Lombardero et al., 2000) o la disponibilidad de nutrientes (Vanakker et al., 2004).

1.3.- Papel del MeJa en la activación de las defensas inducidas

Las plantas activan las defensas inducidas después de que estas hayan detectado algún tipo de ataque en algunos de sus tejidos (Karban y Baldwin, 1997; Franceschi et al., 2005). Esto implica no sólo la capacidad de detectar el daño, sino también la capacidad de transmitir el mensaje de daño para que partes alejadas del mismo reacciones ne consecuencia incrementando sus defensas.

En los últimos años, gracias al avance espectacular en biología molecular en plantas modelo, se ha descubierto que distintas fitohormonas endógenas de las plantas, como el ácido salicílico, el ácido jasmónico o el etileno, están implicadas en la señalización y el desencadenamiento de las respuestas de defensas inducidas del

reconocimiento de un ataque de insectos (Farmer et al , 2003 ; . Halitschke y Baldwin , 2004).

En particular, el rol del ácido jasmónico en la activación de defensas químicas inducidas es bien conocido en multitud de especies vegetales diferentes, desde especies herbáceas hasta árboles (Franceschi et al., 2002; Erbilgin et al., 2006), y entre ellos, los pinos (Moreira et al.2011).

El ácido jasmónico y su ester de metilo, el metil jasmonato (MeJa) es una fitohormona involucrada en muchos procesos fisiológicos en la plantas, siendo especialmente reconocidos su papel en la activación de defensas inducidas en las plantas, así como en muchos procesos fisiológicos relacionados con el desarrollo tales como la germinación de semillas, el crecimiento de la raíz, la floración, la maduración del fruto, y la senescencia (Franceschi et al., 2005).

El MeJa es un compuesto orgánico volátil cuya fórmula química es $C_{13}H_{20}O_3$ (Figura 3). Hoy en día se sabe que esta fitohormona regula los procesos de señalización de una agresión biológica y sirve de mensaje para la activación de defensas inducidas en zonas alejadas de la agresión. Un ataque de herbívoros en una planta desencadena la síntesis y acumulación de MeJa, que, a su vez, regula la activación de defensas inducidas en la propia planta y podría participar en la señalización de riesgo a otras plantas vecinas. Se puede transmitir a través del sistema vascular, por contacto físico o por el aire como sustancia volátil sirviendo de molécula-mensaje de riesgo en complejos procesos de comunicación planta-planta o intraplanta de los que, cada día, tenemos más evidencias, como se pudo observar en el proyecto de Fin de carrera de Beatriz Diz defendido en la EUET Forestal de la Universidad de Vigo en 2013 (Diz 2013).

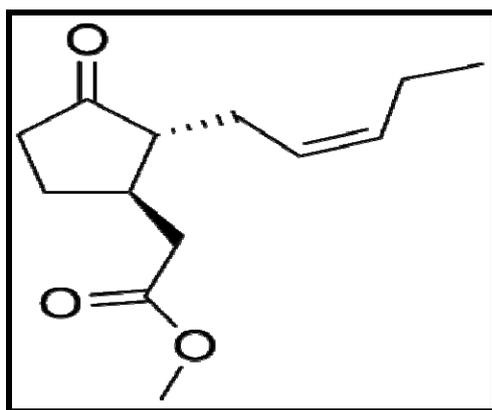


Figura 3. Esquema de la molécula de Metil Jasmonato

El descubrimiento del papel del MeJa en la activación de defensas inducidas ha desencadenado un intenso campo de investigación, abriendo incluso nuevas vías para la lucha contra plagas. Por ejemplo la fumigación con MeJa permite activar defensas inducidas en las plantas de forma artificial. En el caso de las coníferas varios trabajos han demostrado la posibilidad de inducir resistencia con MeJa a determinados hongos

patógenos (*Ceratocistis polonica* en *Picea abies* (Franceschi et al., 2002; Zeneli et al., 2006), (*Diplodia pinea* en *Pinus radiata* (Gould et al 2008) e insectos (*Hylobius abietis* en distintas especies (Hejari et al 2005; Zas et al. 2014). Además la fumigación del MeJa se ha utilizado mucho como herramienta experimental para estudiar la variación genética y la plasticidad ambiental de las defensas inducidas (Moreira et al. 2010; Heil 2010; Fornoni 2011).

Con la aplicación exógena de MeJa se produce un aumento de defensas químicas que se traduce en un aumento de la resistencia frente a insectos y patógenos. Por ejemplo, en *P. pinaster* y *P. radiata*, se observó, que la aplicación de MeJa aumentó las concentraciones de diterpenos y polifenoles en los tallos y acículas, lo que se tradujo en menos daños producidos por el curculiónido *H. abietis*, que provocó menos heridas y causó menos mortalidad en plantas previamente tratadas con MeJa (Moreira et al. 2009; Zas et al. 2014). De esta manera la aplicación de MeJa se ha propuesto como herramienta de control fitosanitario para proteger a las plantaciones forestales frente a determinadas plagas (Zas et al 2014), sin embargo, como se dijo antes, la producción de defensas, sean constitutivas o inducidas, supone un coste energético y de recursos para la planta (Sampedro et al. 2011). Es frecuente observar, por tanto, que la inducción de defensas mediante fumigación con MeJa provoca un descenso en el crecimiento de los árboles, si bien este se compensa, en general, por el beneficio de reducir el daño y la mortalidad (Zas et al. 2014).

Todos los resultados publicados de los efectos positivos de la aplicación de MeJa en coníferas se basan en aplicaciones de MeJa a concentraciones mucho mayores (50-100 mM) que las habitualmente utilizadas en plantas anuales. Dosis inferiores a 25 mM raramente han dado lugar a resultados positivos en coníferas. La lignificación, el tamaño y la forma de las acículas podrían explicar estas observaciones, aunque la información disponible todavía es limitada. En la Tabla 1 se resume algunos de los resultados obtenidos en relación a la activación de defensas mediante la aplicación de MeJa en las tres especies objeto de este trabajo.

Especie	Concentración MeJa (mM)	Número de aplicaciones	Efectos observados	Referencia
<i>P. pinaster</i>	100	Única	Aumento del 40% del contenido en resina. Aumento de la resistencia al herbívoro <i>H. abietis</i> .	Sampedro et al., 2010
<i>P. pinaster</i>	5-50-100	Única	Con concentración de 100 mM la acumulación de resina se duplica a las plantas control. Con concentraciones de 5-50 mM no se observan diferencias significativas frente a las plantas control.	Moreira et al., 2009
<i>P. pinaster</i>	22	Única	La aplicación de MeJa afecta al crecimiento y a la acumulación de resina La concentración en azúcar y carbohidratos en los tallos no se vieron afectados	Sampedro et al., 2011
<i>P. pinaster</i>	5-10-25	Doble	Con concentración de 25 mM se observa un aumento importante de la concentración de resina, especialmente el MeJa se aplica dos veces Las aplicación de MeJa 25 mM repetida dos veces reduce significativamente el consumo de <i>H. abietis</i> en campo	Zas et al., 2014
<i>P. radiata</i>	0-1-4.5-18	Única	Incremento de la resistencia frente al hongo <i>Diplodia pinea</i>	Gould et al., 2009
<i>P. radiata</i>	0-1-4.5-18	Única	Incremento de la resistencia frente al hongo <i>Diplodia pinea</i>	Gould et al., 2008
<i>P. radiata</i>	5-10-25	Doble	Todas las concentraciones aplicadas dos veces en un plazo de 15 días aumentan la concentración de resina La aplicación de 25 mM repetida dos veces aumenta la resistencia a <i>H. abietis</i> en campo	Zas et al., 2014
<i>P. sylvestris</i>	0-10-100	Única	Formación de conductos de resina en el xilema La aplicación de MeJa 100 mM reduce el consumo de <i>H. abietis</i>	Heijari et al., 2005
<i>P. sylvestris</i>	3-6-9	Repetida	La aplicación continuada de MeJa altera la concentración de algunos mono y diterpenos Se reduce el desarrollo de <i>Neodiprion sertifer</i> y <i>Diprion pini</i>	Heijari et al., 2008
<i>P. sylvestris</i>	5-10-25	Doble	La aplicación doble de MeJa 25 mM aumenta el contenido de resina en los tallo Reduce el consumo de <i>H. abietis</i> en campo	Zas et al., 2014

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos en diferentes trabajos sobre los efectos de la aplicación de MeJa sobre la acumulación de resina y resistencia a distintos hongos y herbívoros en plantas de las tres especies objeto de estudio en el presente trabajo.

1.4.- Priming

Además de la clasificación clásica en defensas constitutivas e inducidas recientemente se ha descubierto un estado intermedio en el que la planta, tras recibir un estímulo externo, se prepara para el daño. Esta preparación, conocida como cebado de resistencia o *Priming*, no involucra la activación de defensas, sino simplemente una pre activación de la maquinaria responsable de la producción de defensas inducidas. Por ello, el estado *Priming*, no consume recursos y carece de costes, por lo que no debería afectar al crecimiento ni a la reproducción. Con la maquinaria pre activada, cuando se produce el siguiente ataque, la producción de defensas químicas es mucho más eficaz, pudiendo ser o bien más rápida o bien más intensa. (Figura 4).

Determinar si este estado intermedio funciona también en especies forestales sería un avance muy importante, ya que, al ayudar a la planta a estar protegida frente a herbívoros invasores sin que se produzca gasto de energía, tendría importantes consecuencias evolutivas e incluso podría derivar en interesantes aplicaciones prácticas. El presente proyecto intentará demostrar este estado en tres especies de coníferas (*P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*)

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2.- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A día de hoy se sabe que cuando las coníferas son atacadas por insectos herbívoros, éstas reaccionan y transmiten al resto de la planta mediante señales químicas el mensaje de la existencia de algún tipo de problema, mensaje al que las plantas reaccionan dejando crecer y dedicando todos sus esfuerzos a producir barreras químicas y físicas, como por ejemplo resina (Moreira 2010). De este modo las coníferas pueden adaptarse rápidamente a los cambios que se produzcan en el medio.

Se sabe también que el MeJa juega un papel clave en la señalización del daño, y aplicándolo externamente a altas dosis induce defensas y aumenta la resistencia efectiva frente a distintos patógenos e insectos. Sin embargo, se desconoce en qué medida el MeJa podría influir en la capacidad de las plantas de responder a un daño con la activación de defensas inducidas (una mayor inducibilidad), es decir, hasta qué punto la aplicación exógena de MeJa desencadena una mayor capacidad de responder a un ataque real de herbivoría.

En este trabajo exploramos en qué medida la aplicación de MeJa a dosis bajas, inferiores a las que se sabe generan respuestas defensivas directamente, modifica la capacidad de las plantas de responder a un ataque de un insecto, es decir, si se produce el efecto de *Priming*.

De ser el caso, la aplicación de MeJa a dosis bajas podría ser interesante para favorecer las estrategias defensivas sin repercutir en el crecimiento como se ha observado en concentraciones altas.

En este trabajo de investigación se pretende determinar cómo responden tres especies de pinos (*Pinus pinaster*, *Pinus radiata* y *Pinus sylvestris*) al ataque del insecto *Hylobius abietis* cuando se les rocía previamente con diferentes concentraciones bajas de MeJa (0, 1, 5 y 25 mM).

Nuestra hipótesis de trabajo es que la aplicación de MeJa a plántulas de pino a concentraciones bajas más que provocar un aumento de la concentración de defensas químicas, tal y como ocurre a dosis altas, hace que las plántulas se pongan en un estado de prealerta (*Priming*) que las prepararía para responder a cualquier tipo de ataque que sufran con una mayor intensidad y rapidez. De esta manera, ante un ataque de un herbívoro, las plántulas pre-tratadas con MeJa ya estarían prevenidas y tendrían su maquinaria defensiva preparada para producir una respuesta inducida más rápida o más intensa.

Las especies de pinos con las que vamos a trabajar son: *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*, tres especies relevantes en el sector forestal gallego. Para las tres especies ya se conoce que la aplicación de MeJa a concentraciones altas (50-100 mM) desencadena la acumulación de defensas químicas (Franceschi et al., 2002; Heijari et al., 2005; Zeneli et al., 2006). En particular, nuestra idea es que las plántulas de pino pretratadas con concentraciones bajas de MeJa reaccionarán más intensamente al

consumo del insecto, aumentando en mayor medida la acumulación de resina en sus tejidos, tal como se refleja en la siguiente figura hipotética (Figura 5).

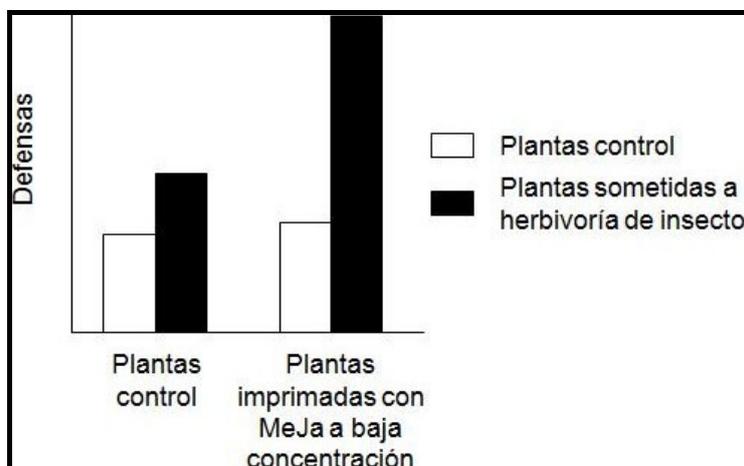


Figura 5. Representación conceptual de la hipótesis de trabajo. La aplicación de **MeJa** a dosis bajas no aumenta la concentración de defensas, sino que altera la capacidad de las plantas de responder a un episodio de herbívora, siendo el aumento de defensas químicas inducidas mucho mayor en las plantas previamente tratadas con **MeJa**, es decir en las plantas imprimadas.

Los objetivos específicos de este proyecto son:

- 1- Explorar en qué medida la aplicación de **Metil Jasmonato** a concentraciones bajas (0-25 mM) genera acumulación de defensas químicas inducidas en plántulas de *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris* de 2 años de edad.
- 2.- Determinar si la aplicación de **Metil Jasmonato** a concentraciones bajas (0-25 mM) es eficaz reduciendo el daño provocado por el curculiónido *H. abietis* en plántulas de *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*.
- 3.- Valorar en qué medida la aplicación de **Metil Jasmonato** a concentraciones bajas (0-25 mM) altera la capacidad de las plántulas de pino de *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris* de responder al ataque del curculiónido *H. abietis* generando defensas inducidas.

De estos tres objetivos planteados, el tercero es el realmente novedoso y que motiva el presente trabajo. Los dos primeros son objetivos colaterales y simplemente complementan los conocimientos actuales sobre el efecto del **MeJa** en la química defensiva y resistencia al curculiónido en las tres especies de pino.

MATERIAL Y METODOS



3.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- Los hospedadores

3.1.1.- *Pinus pinaster*

Pinus pinaster Ait (Figura 6a), llamado comúnmente en España pino negral debido a su corteza oscura (Figura 6b), pino gallego por la gran extensión que ocupa en Galicia, internacionalmente pino de Las Landas debido a la extensión que ocupa en esa región de Francia y sobre todo, pino marítimo que es el nombre más conocido en Europa, es una gimnosperma de la familia de las Pináceas.

Se trata de un árbol perennifolio de hasta 40 m, con ritidoma oscuro, grueso y profundamente fisurado. Presenta hojas aciculares, largas (10-25 cm) y rígidas, dispuestas en parejas (en realidad se trata de ramitas enanas -braquiblastos- con 2 hojas cada una). Como el resto de pináceas, es monoico: cada pie produce conos masculinos y femeninos separados. Los masculinos aparecen en grupos hacia el extremo de las ramas, son amarillos y producen una gran cantidad de polen, cayendo cuando se ha dispersado éste ayudado por el viento. Los conos femeninos, de color violáceo, al principio se encuentran casi en el extremo de las ramas más altas. Las piñas maduran al cabo de dos años, y son largas y estrechas (8-22 x 5-8 cm), simétricas, con escamas puntiagudas y punzantes.

Esta especie produce resina de forma copiosa, que muchas veces mancha las piñas (Figura 6c) y fluye a lo largo del tronco emanando por heridas bióticas o abióticas. De hecho es una de las especies más utilizadas para la extracción industrial de resina.

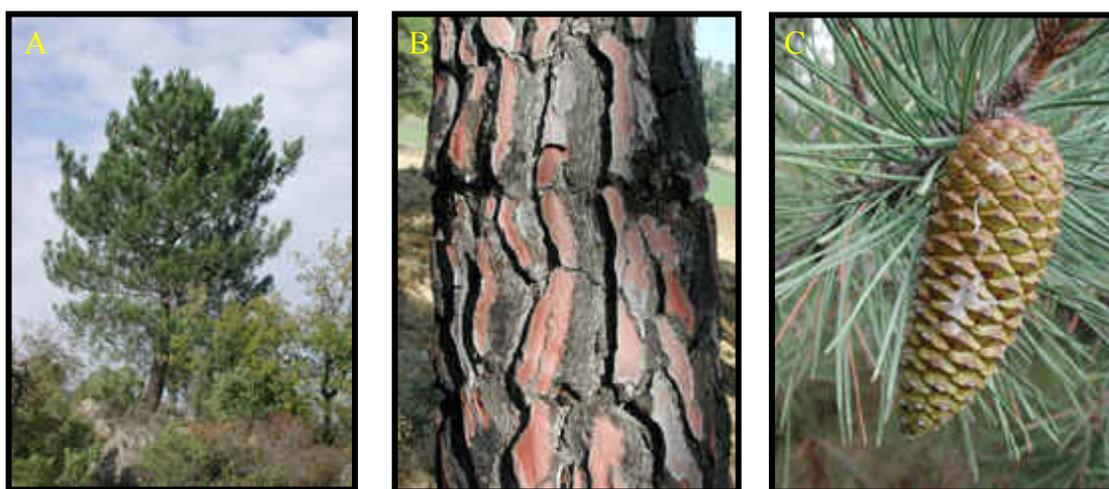


Figura 6. a) Ejemplar de mediana edad, b) Detalle de la corteza y c) Detalle de los conos femeninos maduros de *Pinus pinaster* (Fotos tomadas de http://www.farmazia.ehu.es/p04611213/eu/contenidos/informacion/jardin_virtual/eu_jardin/adjuntos/07.pipi.htm)

Es una conífera natural de la región Mediterránea occidental y de la fachada atlántica del sudeste Europeo. Constituye masas forestales en Francia, España, Portugal, Italia, Marruecos, Argelia y Túnez (Figura 7). En España es la especie de pino que ocupa más superficie (Álvarez-González et al., 2005), siendo también la especie arbórea que más se utiliza en repoblaciones. Por su interés como productor de madera para zonas con marcada sequía estival se ha exportado a otros países, ocupando extensiones relativamente importantes en Australia y Sudáfrica, donde muestra un comportamiento invasor.

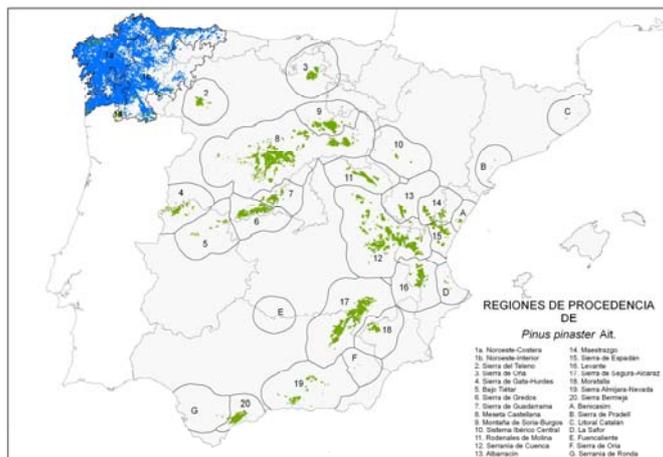


Figura 7. Mapa de la distribución *Pinus pinaster* (http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/recursos-geneticos/recursos-geneticos-forestales/rgf_regiones_procedencia.aspx)

En la península se distinguen tres grupos genéticos muy diferenciados (Alía et al., 1996): grupo Noroeste, grupo Suroeste y grupo Este, concentrándose la mayor parte de la biodiversidad en los dos últimos. Existe una gran diversidad genética en las poblaciones próximas a la costa Mediterránea, la cual se va reduciendo a medida que nos vamos acercando hacia el Norte y hacia el Atlántico.

Existe gran variedad de enfermedades provocadas por hongos de pudrición que afectan a esta especie como *Armillaria ostoyae*, *Cenangium ferruginosum*, *Fomes pini*, *Fomes pinicola*, *Lophodermium pinastri*, *Perdermium pini* y *Diplodia acicola*. Entre las plagas más difundidas en sus masas podemos citar *Thaumeotopea pityocampa* (Procesionaria del pino), *Dendrolymus pini*, *Pissodes notatus*, *Ryacionia buoliana*, *Ryacionia duplana* o *Blastophagus piniperda*. El curculiónido *H.abietis*, causa daños importante en las masas del norte de España y Francia, especialmente en regenerados naturales o artificiales establecidos en zonas de corta (Zas et al. 2006).

3.1.2.- *Pinus radiata*

Pinus radiata, es una especie originaria del suroeste de los Estados Unidos, en donde existen cinco pequeñas poblaciones localizadas principalmente en California (Figura 8). Es un árbol de talla media a elevada, de aproximadamente 30 metros de altura. Es una especie de crecimiento rápido ya que alcanza un diámetro de tronco de más de 50 centímetros en 25 o 35 años, y por ello se ha extendido de forma artificial por grandes extensiones de distintos países, entre ellos España.

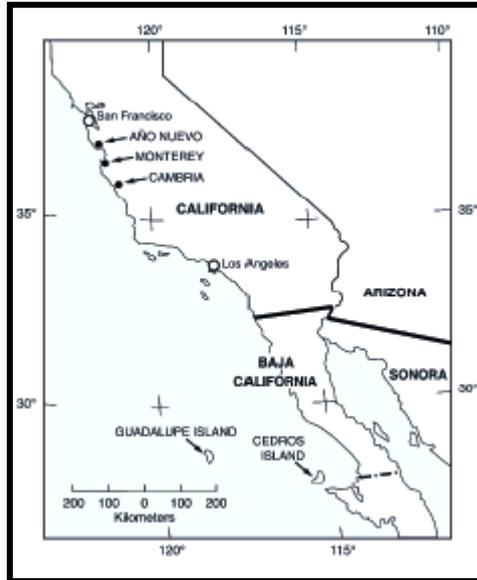


Figura 8. Mapa distribución natural *P. radiata*. (<http://www.fao.org>)

Posee una copa aplanada o abovedada en su madurez, con ramas inferiores extendidas. Tiene el tronco recto de color pardo-rojizo. Las hojas son aciculares de unos 15 cm de longitud y se agrupan en grupos de tres en tres en los braquiblastos (Figura 9a). Los estróbilos son ovoides, de 7-14 cm de longitud agrupados en parejas o verticilos de 3-5 con las escamas externas muy prominentes (Figura 9b).



Figura 9. a) Acículas de *Pinus radiata*. **b)** Estróbilos de *Pinus radiata*. ([http:// www.asturnatura.com](http://www.asturnatura.com) ; <http://recursos.uach.cl/asignaturas/Dendrologia/Pinus%20radiata.htm>)

Es una especie de gran interés para la industria por la calidad de su madera y su rápido crecimiento, que hace que su cultivo comience a dar beneficios en pocos años. Se

ha introducido en Europa, Nueva Zelanda, sudoeste de Australia, Chile, Brasil y Sudáfrica. Las mayores plantaciones están en Chile y Nueva Zelanda, donde esta especie ocupa hasta el 80 % de la superficie total de plantaciones forestales. Su madera se aprovecha para diferentes fines, entre las que destacan la pasta de papel y la fabricación de tableros de partículas. Con frecuencia se utiliza como cortavientos.

Se desarrolla mejor en suelos silíceos y muy profundos. Prefiere climas templados o cálidos, puesto que no soporta las temperaturas muy bajas ni las heladas, y necesita bastante humedad, aunque tolera algo de sequía estival.

En la Península Ibérica se ha introducido sobre todo en la zona norte con el fin de aprovechar su madera para la fabricación de pasta de papel y para labores de estibamiento en minas de carbón. Se encuentra en zonas de baja altitud de las Comunidades Autónomas de Asturias, Cantabria, Castilla y León, Galicia y País Vasco; y excepcionalmente en algunas regiones de Andalucía como Málaga, Cádiz y Sierra Morena.

Pinus radiata es una especie con buena capacidad de adaptación y una excelente productividad, pero presenta el gran inconveniente de ser objeto del ataque de agentes patógenos muy diversos que pueden llegar a producir fuertes impactos en sus masas. En las zonas de introducción artificial se considera que una vía rápida de entrada de estos patógenos pudo ser a través de la importación de semilla y de material vegetal, realizadas por los viveristas particulares y organismos oficiales. Esta especie se enfrenta a plagas como la procesionaria (*Thaumtopoea pityocampa*), *Lymantria dispar*, *Hylobius abietis*, *Rhyacionia buoliana*, *Tomicus piniperda*.

3.1.3.- *Pinus sylvestris*

Pinus sylvestris es un árbol bastante elevado que supera los 30 m y alcanza los 40 m. El porte es inicialmente cónico-piramidal. En su madurez se va deformando y volviendo asimétrico, con menos ramas en la parte más sometida a la sombra. Esta asimetría del porte se acentúa en estaciones duras.

El sistema radical es muy potente, con una raíz principal, que en suelos profundos y sueltos puede ser larga y gruesa y con muchas raíces secundarias. En zonas rocosas la raíz principal se atrofia y se desarrollan las secundarias.

El tronco es recto y cilíndrico, principalmente en bosques densos, en los que las ramas bajas desaparecen por poda natural. La corteza de joven es de un tono gris y al madurar el árbol, este se descama y la corteza se vuelve asalmonada, principalmente en la parte superior, donde la corteza se desprende en placas translúcidas y en la base de las ramas.

Las hojas de color verde glauco, son acículas cortas de 3 a 7 cm por 1-2 mm de grosor, torcidas helicoidalmente, rígidas y punzantes. Dichas hojas van unidas en parejas por una vaina (braquiblasto).

Las flores son poco vistosas, pero las masculinas son tan numerosas que, en primavera, el polen llega a caer en forma de "lluvia de azufre". Florece en abril y mayo y la piña madura en el otoño del año siguiente, si bien puede permanecer en el árbol uno o dos años. Esta piña tiene de 3 a 8 cm de largo y de 2 a 3 cm de ancho, y se une a las ramas por un pedúnculo corto. No es una piña totalmente simétrica y las apófisis de las escamas pueden estar más curvadas en la parte externa. Las piñas encierran unos piñones que son difundidos por el viento. La semilla no es fértil con regularidad hasta los 40 años de edad del árbol. Los conos masculinos son de escasa floración y los femeninos son rosas en la polinización, verdes el segundo año y pardos el tercero. (Figura 10).



Figura 10. Ejemplar de *Pinus sylvestris*. (<http://waste.ideal.es/pino.htm>)

En cuanto a su distribución mundial es de entre todas las especies del género *Pinus* la que presenta una extensión más amplia; tanto en Europa como Asia, extendiéndose desde Escandinavia hasta montañas del norte de Persia y desde la Península Ibérica hasta Siberia. Las masas más extensas se encuentran en Siberia, Rusia, Alemania y Polonia. Existen numerosas procedencias geográficas que difieren en la forma de la copa, de la corteza y del tronco. La copa presenta un color azulado, sobre todo en los árboles jóvenes. A nivel peninsular, límite sur de su distribución natural, sus mejores representaciones se encuentran en Pirineos, Cordillera Ibérica y Cordillera Central donde ocupan importantes extensiones en la sierra de Guadarrama central (Pinar de Valsain), desde donde va difuminándose hacia Gredos y Somosierra. Su límite Este se encuentra en Castellón, mientras que su límite Sur hay que buscarlo a la Sierra de Baza y Sierra Nevada. Por el oeste alcanza los confines de León y Lugo. El mayor índice de calidad se encuentra en las masas de Valsain (Segovia) y Soria. En cuanto a las altitudes, se puede encontrar desde las llanuras hasta más de 1300 m (Figura 11).

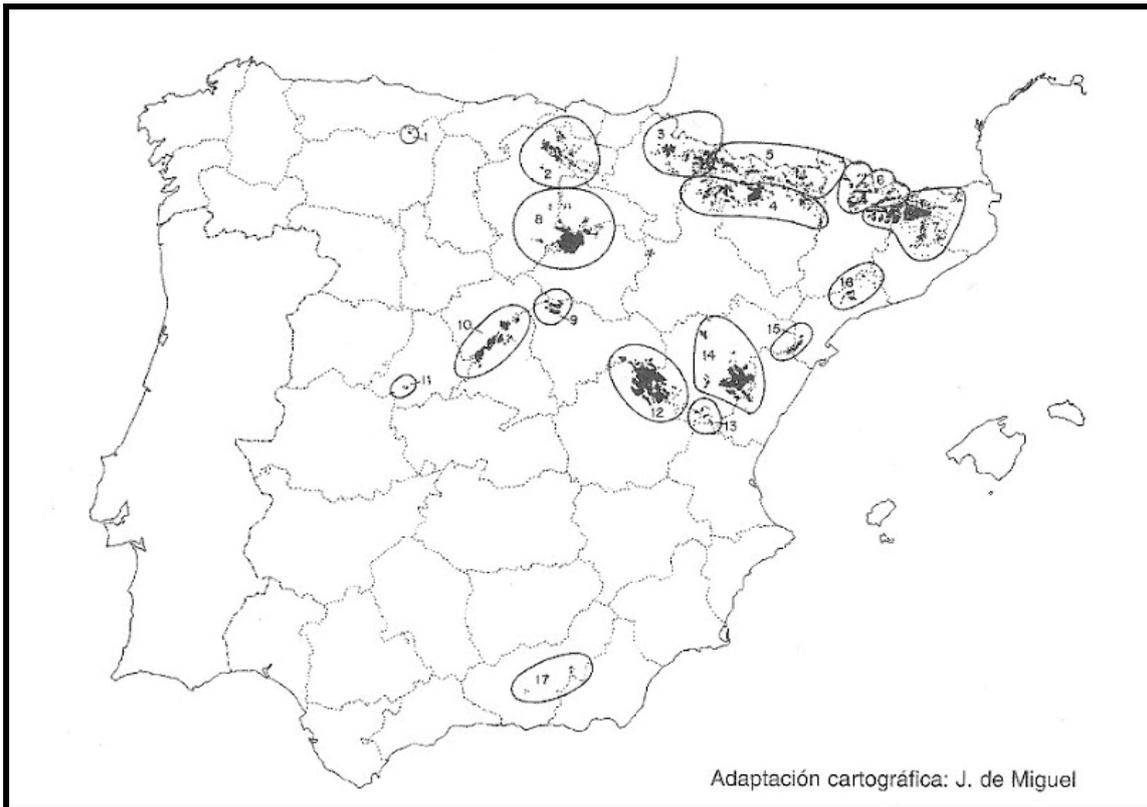


Figura 11. Mapa de distribución *Pinus. sylvestris* en la Península Ibérica. (<http://arbolesdeeuropa.blogspot.com.es>)

Posee una madera resinosa de buena calidad que produce más proporción de duramen y albura mas colorada en las variedades de mejor porte y albura más blanca y gruesa en las de peor porte. La madera es en general de buena calidad, con troncos rectos y poco nudosos, propiedades que han conseguido que sea uno de los pinos más apreciados. Por su calidad y considerando su dureza que es mediana, se ha utilizado en construcción, ebanistería y carpintería. Se ha usado para muebles de calidad y para mástiles de barcos.

Los pies de pequeño tamaño no son muy buenos para pasta de papel por la presencia de resinas y se utilizan por ello para otros fines. Así tenemos que torneados y después de tratamientos protectores con autoclave se han utilizado para postes de vallas. Los restos y los pies de peor calidad pueden emplearse para leña y/o combustible con buen resultado, siendo la mejor de las pináceas ibéricas para este uso.

Por su amplia distribución tiene también un gran número de plagas que pueden afectarle. Así podemos tener defoliaciones provocadas por la procesionaria del pino (*Thaumtopoea pityocampa*), ataques de escolítidos como *Ips acuminatus*, defoliaciones provocadas por el hongo *Diplodia pinea*, brotes torcidos sintomáticos de *Melampsora pinitorqua*, la roya de las acículas que origina *Coleosporium senecionis* y otros ataques de hongos como la *Armillariella ostoyae* o *Lophodermium pinastri*. El curculiónido *H. abietis*, es una de las principales plagas para el regenerado

de esta especie en zonas de corta, especialmente en el centro y norte de Europa (Wainhouse 2004).

3.2.- El herbívoro (*Hylobius abietis*)

Hylobius abietis o gorgojo del pino es un coleóptero de la familia *Curculionidae* en la que se incluyen también otros herbívoros de especies forestales como *Gonipterusn scutellatus* o *Cryptorrhynchus lapathi*. El imago mide de 7 a 13 mm. de longitud y está provisto de una trompa ligeramente arqueada con dos antenas insertadas en su extremo (Figura 12), carácter éste que los diferencia de sus parientes los *Pissodes*.



Figura 12. Adulto del curculiónido *Hylobius abietis*. (http://es.mashpedia.com/Hylobius_abietis)

La hembra pone de uno a cinco huevos en un agujero practicado en los tocones o en las raíces (Norderhen y Nordlander 1994). Las larvas miden de 14 a 16 mm. y son blanquecinas y encorvadas, con la cabeza de color marrón. (Figura 13).



Figura 13. Detalle de una larva de *Hylobius abietis*. (<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1231174>)

Las larvas comienzan a alimentarse del floema que se encuentra debajo de la corteza, excavando galerías. Al terminar su desarrollo realizan la pupación, dejando la entrada taponada con serrín. (Figura 14)



Figura 14. Detalle de una larva escavando la cámara de pupación. (<http://www.forestry.gov.uk/fr/INFD-8XZDWS>)

El daño principal lo hace el imago perfecto que se alimenta de la corteza y del floema de distintas especies arbóreas, pero principalmente de coníferas. Provoca daños tanto en árboles adultos como en plántulas jóvenes, pero es sólo en estas últimas donde los daños son problemáticos. Cuando el ataque es intenso, se producen verdaderas descortificaciones, seguidas de la muerte de la planta. El imago come durante todo el periodo vegetativo, pero los ataques se observan, sobre todo, en los meses de abril-mayo (ataque de primavera) y en agosto-septiembre (ataque de otoño). (Figura 15)



Figura 15. Ataque del curculiónido *Hylobius abietis*. (<http://01.efa.dip.org/VARIOS/Galeria/HYLOBIUS%20abietis.htm>)

Las cortas, si no son seguidas la saca de las ramas gruesas y tocones son los desencadenantes de la expansión de la plaga. Los daños ocasionados en las plantas pueden ser más fuertes en aquellas que estuviesen bien fertilizadas y con buenos crecimientos (Zas et al. 2006; Zas et al. 2008).

Hylobius abietis es un herbívoro de las coníferas, ataca principalmente a las especies *Pinus*, *Abies* y *Picea*, a los que causa daño al consumir la corteza de los brotes jóvenes, reduciendo su crecimiento y sobre todo causando daños en el regenerado. Cuando el ataque es intenso el descortezado de las plántulas puede ser elevado y llegar

al anillamiento del tallo principal, provocando la muerte de la planta. Cuando la repoblación se hace inmediatamente después de una corta y no se toman otras medidas de control, los daños pueden llegar a provocar la muerte en más del 80% de las plantas.

3.3.- Material vegetal empleado

Para conseguir los objetivos marcados en el presente proyecto, empleamos un total de 186 plantas de dos savias, cultivadas en el vivero de Norfor-Pontevedra (Croas, 15 Figueirido, 36140, Vilaboa, Pontevedra (latitud 42° 22.50' 42'' N; longitud 8° 38.44' 59'' O; elevación 184 m), 62 plantas de cada una de las tres especies *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*. Las plantas fueron escogidas al azar entre el lote existente, y trasplantadas a macetas de 2 L (Figura 16a) con un sustrato de turba y corteza de pino triturado (1:1 vol) (Figura 16b), y fertilizadas con Granum (11-22-9+(6)) a razón de 3 g por planta (Figura 16c).



Figura 16. (a) Maceta, (b) Turba y (c) fertilizante empleado como sustrato para las plantas.

3.4.- Captura y mantenimiento del curculiónido *Hylobius abietis*

Para la realización de los bioensayos planificados necesitábamos disponer de unos 88 ejemplares del curculionido *Hylobius abietis*.

Para su captura se colocaron trampas en diferentes pinares del monte Castrove en Poio (Pontevedra). Las trampas se colocaron en dos lugares, una corta reciente de *P. pinaster*, con presencia de tocones frescos y restos de corta (latitud 42° 27' 23'' N; longitud 8° 43' 19'' O; elevación 471 m) y una zona de regenerado natural de *P. pinaster* cubierto por una densa capa de *Pteridium aquilinum* y *Ulex europeus* (latitud 42° 28' 19'' N; longitud 8° 42' 47'' O; elevación 491 metros).

Las trampas utilizadas fueron diseñadas por el profesor Göran Nordlander (*SLU, Uppsala, Suecia*) y consistieron en botes de plástico con tapa, agujereados por la parte superior y enterrados en el suelo hasta que los agujeros de entrada estuviesen a nivel del suelo. En el interior de estos recipientes se ponen pequeños trozos de papel empapados en esencia de trementina y etanol para atraer al insecto (Moreira et al., 2008), ramas frescas de pino para que éstos puedan alimentarse mientras estén en la trampa, y un

papel empapado en agua para que puedan beber. En la parte superior de las paredes del recipiente y por debajo de los agujeros de la trampa se aplicó una capa de aproximadamente 5 cm de ancho de teflón líquido, un lubricante resbaladizo para evitar que los insectos capturados se escapasen (Figura 17c).

En cada uno de estos lugares de muestreo colocamos entre 20-30 trampas distribuidas por la zona, alejadas las unas de las otras para aumentar la superficie de captura (Figura 17a). Las trampas fueron semienterradas en el suelo, de manera que los agujeros quedasen a ras del terreno para que los insectos pudiesen entrar sin complicaciones (Figura 17b). La localización de las trampas se señaló con una estaca marcada con cinta.

En la zona de corta, antes de colocar las trampas, también revisamos los tocones en busca de algún ejemplar del insecto ya que es la zona donde el adulto realiza las puestas, e inspeccionamos las plántulas del regenerado para ver si había algún indicio de la presencia de *H. abietis* (Figura 17d).

Las trampas se revisaron cada 4-5 días, recogiendo todos los insectos capturados y reponiendo los atrayentes y el alimento con material fresco. El traslado de los insectos al laboratorio se hacía en cajas ventiladas con tapa para evitar que se escapen (Figura 17e). Una vez en el laboratorio se colocaron en cajas de madera ventilada que se mantuvieron en oscuridad y a temperatura controlada de 14° C en cámaras refrigeradas. Los insectos se alimentaron periódicamente con tallos frescos de *P. pinaster*.

La población total de insectos con los que contábamos para llevar a cabo los bioensayos era de aproximadamente 430, de los cuales 88, 44 machos y 44 hembras seleccionados al azar entre los disponibles, son los que utilizamos para realizar los experimentos de este proyecto.



Figura 17. (a) Monte Castrove-Poio lugar de captura de adultos *Hylobius abietis*, (b) detalle de la colocación de las trampas cerca del tocón y a ras del suelo, (c) detalle de las trampas utilizadas, diseñadas por el profesor Göran Nordlander, (d) Colocación trampas en el terreno.

3.5.- Diseño experimental

El experimento arrancó el día 23 de Abril del 2012 en el vivero de Norfor-Pontevedra y consistió en una primera medición del diámetro y la altura de las plantas de *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*, evaluaciones que posteriormente utilizaremos para evaluar las pérdidas de crecimiento ocasionada por los tratamientos de MeJa. La medida del diámetro se realizó en la base del tallo de las plantas con la ayuda de un calibre digital y la altura se midió con una regla de 1000 mm. (Figura 18)



Figura 18. Detalle de la medición del diámetro y altura de las plantas previa a la aplicación de los tratamientos de MeJa.

Tras seleccionar las 186 plantas experimentales, 62 de cada especie, evitando aquellas cuyo tamaño se alejaba más del promedio de la especie, se procedió a la aplicación de los tratamientos de MeJa, el día 3 de Mayo del 2012.

Los tratamientos se aplicaron en un invernadero del vivero rociando diferentes concentraciones de MeJa. Se aplicaron 4 tratamientos de MeJa, cuyas concentraciones fueron de 0, 1, 5 y 25 mM de MeJa. Las soluciones se realizaron disolviendo primero en etanol al 2.5 %, y después completando con agua y agitando vigorosamente hasta alcanzar una emulsión lechosa. El tratamiento control se realizó aplicando sólo agua con la misma cantidad de etanol utilizada en las emulsiones de MeJa. Se aplicaron 15 pulverizaciones por planta, que se corresponden a aproximadamente 11,1 ml de solución (Figura 19).



Figura 19. Ejemplo de pulverización de MeJa sobre las plantas.

Los distintos tratamientos se aplicaron en cabinas independientes del invernadero, donde las plantas permanecieron aisladas durante 24 horas para evitar contaminaciones entre los diferentes tratamientos. A continuación las plantas se dispusieron siguiendo un diseño experimental, manteniendo las plantas del mismo tratamiento de MeJa en mesas de cultivo independientes (cuatro mesas de cultivo) y repartiendo las especies al azar dentro de cada mesa de cultivo.

3.6.- Bioensayo

Un mes después de la aplicación de MeJa, las plantas se trasladaron a la Misión Biológica de Galicia donde se realizaron los bioensayos, sometiendo a la mitad de las plantas a herbivoría real con el curculiónido *H. abietis*. La otra mitad de las plantas se cosechó directamente. La evaluación de la respuesta de las plántulas al consumo del insecto nos permitió dar respuesta a los objetivos planteados, y en particular evaluar en qué medida la aplicación de MeJa a baja concentración podría afectar a la capacidad de respuesta de las plántulas a la herbivoría de este insecto. Para la realización de los bioensayos fue necesaria la construcción de unos tubos donde se expusieron las plantas individualmente al ataque de adultos de *H. abietis*. Para su construcción se emplearon láminas de PVC transparentes de 750 μm y cinta adhesiva de doble haz de 2 cm de ancho (Figura 20). La cara interna superior de los cilindros se pintó con teflón líquido para evitar la huida de los insectos.

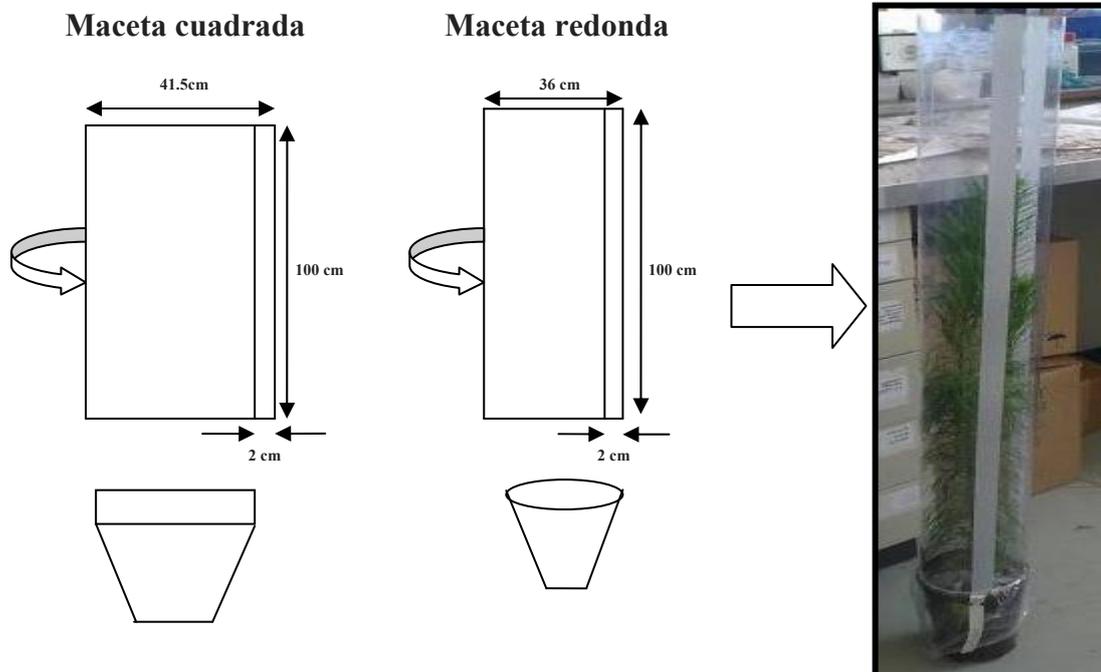


Figura 20. Detalle de la construcción dos tubos de plástico para la realización de los bioensayos con *H. abietis*, en su resultado final.

Los adultos de *H. abietis*, antes de ser colocados en las plantas, fueron sexados, pesados individualmente y numerados en placas Petri con papel de filtro humedecido, anotando los datos en un estadillo.

El bioensayo consistió en la colocación de una pareja adulta (macho y hembra) de *H. abietis* en cada planta, dejando que estos se alimentasen de la misma durante un periodo de 24-36 horas para después evaluar las mordidas en cada caso y, posteriormente, poder determinar, mediante análisis de caracteres químicos de resistencia, la respuesta de las plantas a los daños causados por el insecto.

Antes de la colocación de los insectos y para evitar que estos huyesen a través de la tierra se colocó una bolsa de plástico envuelta en la base de la planta, la cual fue sujeta por la parte exterior del tubo con una goma elástica. Además, para extremar la precaución y evitar que el insecto volase se colocó en el extremo superior una maya sujeta con otra goma elástica. (Figura 21a).

Las plantas se mantuvieron agrupadas mediante una cinta adhesiva (Figura 21b). Posteriormente, se transportaron a un lugar tranquilo y con una luz tenue para facilitar la actividad de los insectos, donde se dejaron antes de ser procesados.

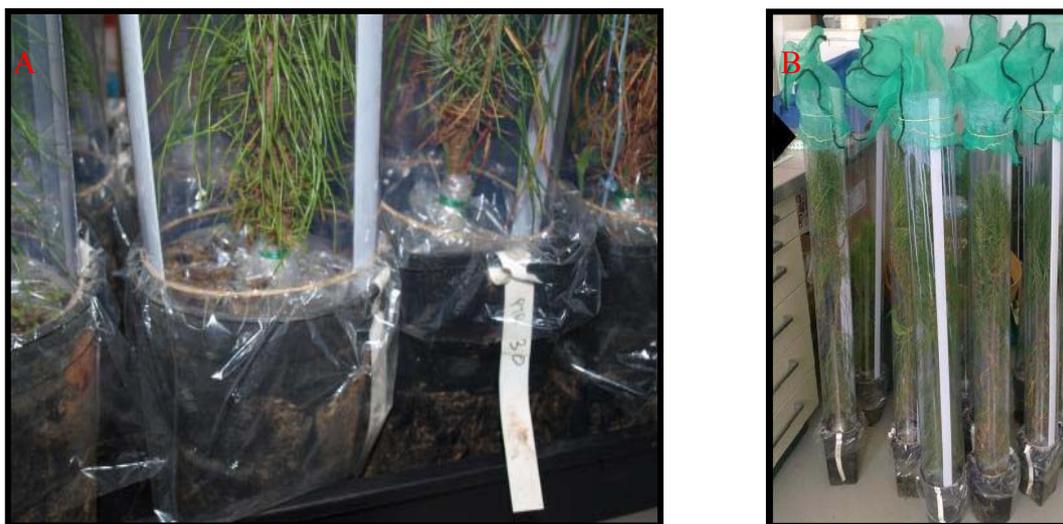


Figura 21. (a) Detalle del cierre de los extremos de los tubos para los bioensayos.(b) Detalle de la colocación de las plantas con *Hylobius abietis*.

Una vez terminado el tiempo de permanencia de los insectos en las plantas, se procedió a procesar las plantas. Previamente se evaluó de nuevo la altura total y el diámetro en la base del tallo. Las plantas se procesaron separando la parte aérea de la parte radical cortando la planta con una tijera de podar a la altura del cuello de la raíz. Después se separaron las acículas del tallo, (Figura 22), el tallo superior (aproximadamente 5 cm por debajo del ápice), el tallo inferior (aproximadamente 5 cm por encima del cuello de la raíz) y se extrajo la tierra del sistema radical.

Las muestras de acículas (A), tallo superior (Ts) y tallo inferior (Ti) se guardaron por separado en bolsas previamente identificadas con el número (ID) de cada planta y la parte del tejido de la que se tratase. Las muestras se congelaron inmediatamente a una temperatura de -30°C . Este proceso fue exactamente igual en las plantas control.



Figura 22. Detalle de la separación de acículas del tallo.

En las plantas que se sometieron al ataque *H. abietis*, se evaluaron las mordeduras causadas por el insecto. Esta evaluación se realizó con el tallo congelado debido a que el procesado de las plantas había que hacerlo lo más rápido posible y no daba tiempo a evaluar las mordeduras.

Las mordeduras se evaluaron con la ayuda de una plantilla milimetrada (Figura 23), anotando tanto la superficie como el número total de heridas. La evaluación se hizo por tramos con ayuda de una cinta métrica, contabilizando y midiendo las mordeduras cada 5 cm de tallo. Una vez evaluada por un lado de la planta, se procedía a girar el tallo un ángulo de 180° para seguir evaluando por el otro lado y conseguir de este modo reducir el error de la evaluación.

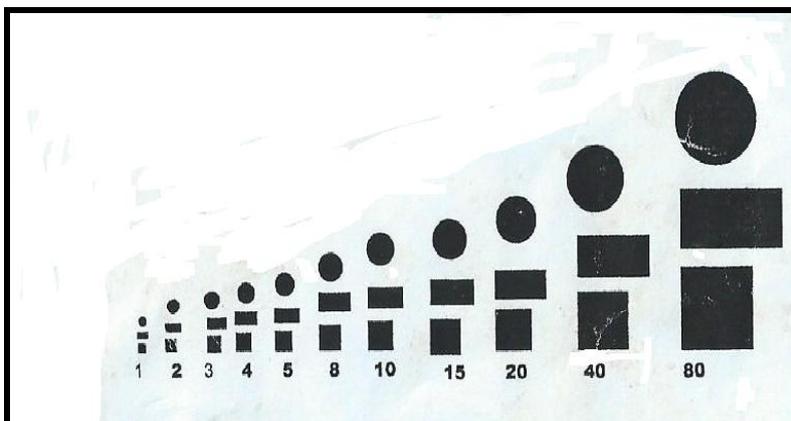


Figura 23. Plantilla milimetrada empleada para la evaluación de las mordeduras.

3.7.- Determinación del contenido de resina

Para cuantificar la respuesta de las plantas al ataque del insecto *Hylobius abietis*, se llevo a cabo la cuantificación del contenido de resina no volátil en los distintos tejidos muestreados: tallo superior, tallo inferior y acículas. La estimación del contenido de resina, expresada en mg de resina por g de peso seco del tejido, se realizó siguiendo el método gravimétrico descrito en (Moreira et al. 2009).

La extracción se llevó a cabo con un disolvente orgánico, el Hexano. Para ello se separó el floema del xilema en las muestras de tallo con ayuda de un bisturí, y se fraccionó la muestra en pequeños fragmentos con un cuchillo, para introducirlos en un tubo de ensayo que a continuación se rellenaría con Hexano. Los tubos de vidrio antes de ser utilizados fueron pesados en vacío en una balanza de precisión y numerados. Para la extracción de la resina en las acículas, se tomó una muestra de aproximadamente 2 g, mezclando acículas de la parte basal y apical, y se procedió de igual manera depositando las acículas en un tubo de ensayo previamente pesado y rellenado con Hexano.

Una vez terminado este proceso todos los tubos de ensayo fueron agitados en un Vortex VWR (VV3) y seguidamente se colocaron en unas gradillas de 50 tubos de ensayo que a continuación se sometieron a un baño de ultrasonido durante 20 minutos para facilitar la penetración del disolvente en las muestras.

Las muestras se dejaron reposar en una cámara extractora de gases durante 24 horas debido a que el Hexano que es muy volátil.

Pasado este tiempo, se filtro el Hexano con la ayuda de un embudo de vidrio en un segundo tubo, también previamente pesado y numerado.

Después de la primera filtración se vuelve añadir Hexano a las muestras vegetales, se agita y se vuelve meter en el baño de ultrasonidos durante 15 minutos e inmediatamente después se realizará un segundo filtrado en un tercer tubo también pesado y numerado.

El material vegetal que contenían los tubos fue retirado del tubo e introducido en un sobre de papel previamente numerado que se colocó en una estufa a 45 °C para su secado hasta peso constante.

La mezcla de Hexano y resina de los tubos se dejó en la campana extractora hasta que se volatilizo completamente todo el hexano, quedando el residuo resinoso en el tubo. Este proceso aproximadamente fue de 1 o 2 semanas.

Una vez evaporado el Hexano, se pesaron todos los tubos con el residuo resinoso en una balanza de precisión determinando los mg de residuo resinoso (suma de los mg de resina de la primera y segunda filtración) por diferencia con el peso del tubo vacío.

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

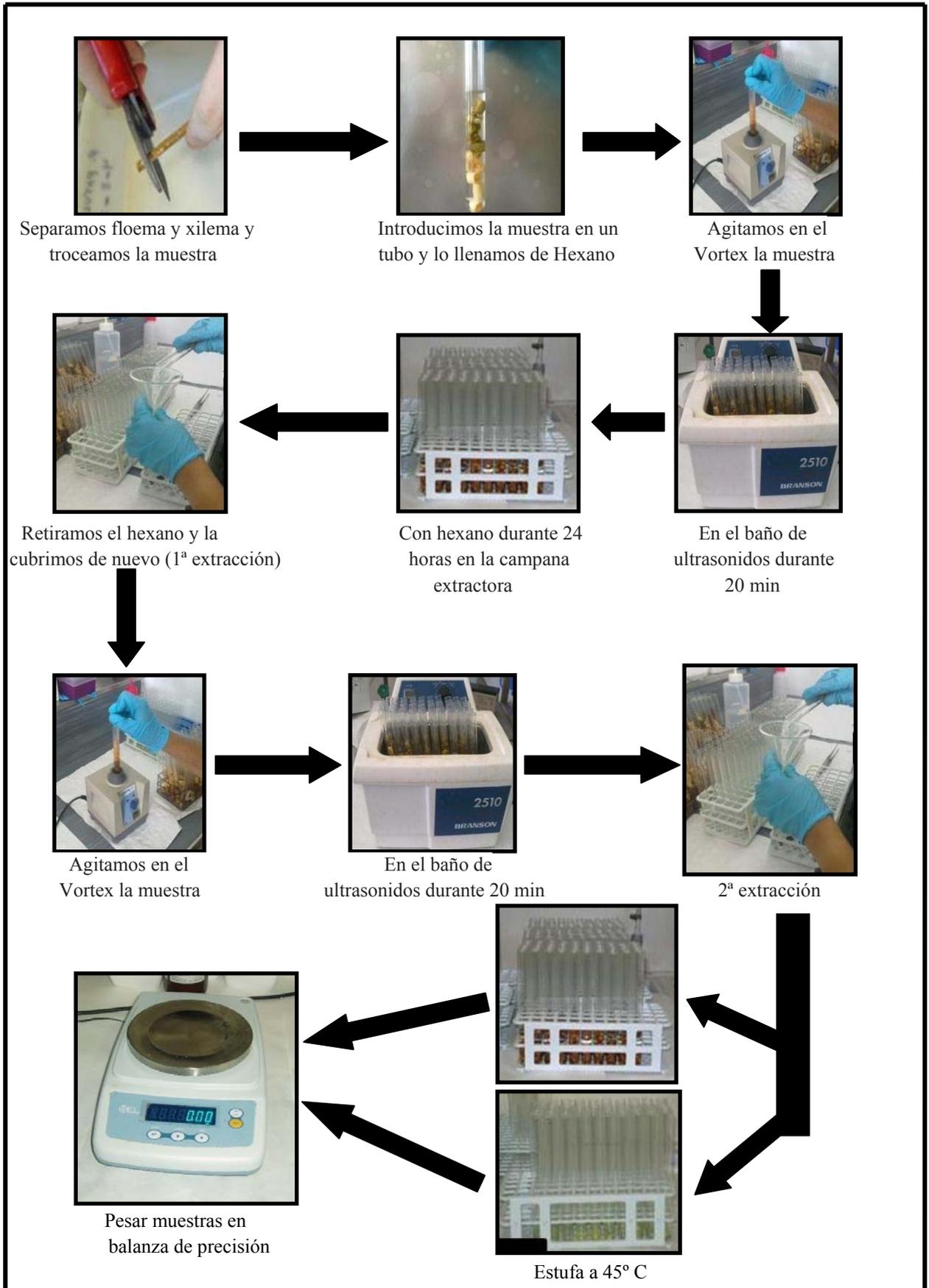


Figura 24. Representación esquemática del procedimiento de extracción de resina en muestras de tallo y acícula.

3.8.- Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVAS convencionales utilizando el paquete estadístico SAS. Se realizaron tres tipos de análisis diferentes, uno para cada uno de los tres objetivos previamente planteados.

Para responder al objetivo 1 y evaluar el efecto directo de la aplicación de MeJa sobre la inducción de defensas (resina no volátil) y sobre las posibles pérdidas de crecimiento de las plántulas de pino, se realizó, para cada variable (resina en los tres tejidos e incremento de altura) un ANOVA de dos vías sobre las plantas control, es decir sobre aquellas plantas no expuestas a la herbivoría del insecto. Este análisis incluye como factores las especies de pino (*P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*), el tratamiento de MeJa (0, 1, 5 y 25 mM) y la interacción entre ambos factores.

Para responder al objetivo 2 y evaluar el efecto directo de la aplicación de MeJa a concentraciones bajas sobre el consumo de *Hylobius abietis* en los bioensayos se realizó un ANOVA de dos vías equivalentes al anterior pero aplicado sobre las plantas que estuvieron expuestas al insecto. En este caso se incluyó como covariable la suma del peso de los insectos utilizados en cada planta. Solo se incluyeron en el análisis las plantas en las que se recuperaron los dos insectos vivos. La información sobre el daño ocasionado por los insectos en los bioensayos se ha sintetizado en tres variables resumen que actúan como variables dependientes en los análisis: la suma total del área mordida a lo largo del tallo (MOR, mm²), el número total de mordeduras independientes en la planta (NMOR) y el área promedio de cada mordedura (MEANMOR, mm²) obtenida dividiendo las dos variables anteriores.

Finalmente, para responder al objetivo 3, realizamos un análisis independiente para cada especie de pino incluyendo todas las plantas experimentales (control y expuestas al insecto). Se realizó un ANOVA de dos vías con el tratamiento de MeJa y el tratamiento de exposición al insecto (control vs *H. abietis*) como factores principales. La interacción entre ambos factores (MeJa x *H. abietis*) es el factor principal de estudio ya que evalúa si la respuesta al daño del insecto (*H. abietis* vs control) es igual o diferente según los pretratamientos de MeJa, es decir evaluar si existe el fenómeno de Priming.

En todos los casos se comprobó tanto la normalidad de los residuos como la homogeneidad de las varianzas entre los distintos niveles de cada factor de estudio. Para alcanzar la normalidad de los residuos, hubo que transformar las variables de resina no volátil mediante una transformación logarítmica (Log (x+1)). La comparación de medias entre los niveles se realizó estimando las medias de cuadrados mínimos (*Least Square Means*) mediante el comando LSMEANS del procedimiento MIXED de SAS.

La relación entre variables se realizó mediante análisis de regresión simple utilizando el procedimiento REG del paquete SAS.

RESULTADOS



4.- RESULTADOS

4.1.- Efecto de la aplicación de Metil jasmonato a concentraciones bajas sobre el contenido de resina y las pérdidas de crecimiento.

Para poder responder al objetivo 1, en este apartado se presentan los resultados del análisis de las plantas control, cosechadas directamente sin exponerlas al ataque de *Hylobius abietis*. Con este análisis se pretende determinar en qué medida influye la aplicación de MeJa a concentraciones bajas sobre los contenidos de resina y el crecimiento de las plantas de las tres especies empleadas (*P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*).

En la Tabla 2 se muestran un resumen de los resultados del análisis estadísticos para las cuatro variables dependientes consideradas (crecimiento en altura y contenido en resinas no volátiles en acículas, tallo superior y tallo inferior).

Se puede observa que la aplicación de MeJa tuvo un efecto significativo sobre el contenido de resina no volátil en acículas (Tabla 2), con un aumento de su contenido de resina en las acículas proporcional a la concentración de MeJa aplicada en las tres especies (Figura 26b). Sin embargo, el contenido de la misma en el tallo inferior y en tallo superior no respondió de forma clara y consistente entre especies a la aplicación de MeJa (Tabla 1). En el caso de la resina en el tallo superior se observó a su vez una interacción MeJa x especie significativa (Tabla 2), indicando respuestas estadísticamente diferentes en las especies estudiadas (Figura 25d). Una observación más detallada de la respuesta de cada especie sugiere que esta interacción surge de unos valores de resina en el tallo superior anormalmente altos en las plantas control de *P. pinaster* (Figura 25d).

Tabla 2. Resultados del análisis de varianza mostrando el efecto del MeJa, la especie y la interacción entre ambos factores para el crecimiento en altura (ΔH) de las plántulas de *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*, y el contenido de resina no volátil en diferentes tejidos de las mismas. Se muestran los grados de libertad (GL), los F ratios y los niveles de probabilidad asociados ($P > F$). Los valores de probabilidad significativos ($p < 0.05$) y marginalmente significativos ($p < 0.10$) se resaltan en negrita.

	GL	Resina							
		ΔH		Acículas		Tallo superior		Tallo inferior	
		F	P>F	F	P>F	F	P>F	F	P>F
SP	2	12.88	0.0001	35.47	0.0001	0.18	0.8324	10.82	0.0001
MJ	3	4.35	0.007	14.67	0.0001	2.16	0.099	1.79	0.1566
SP*MJ	6	0.81	0.5649	3.29	0.006	2.38	0.036	1.74	0.1234

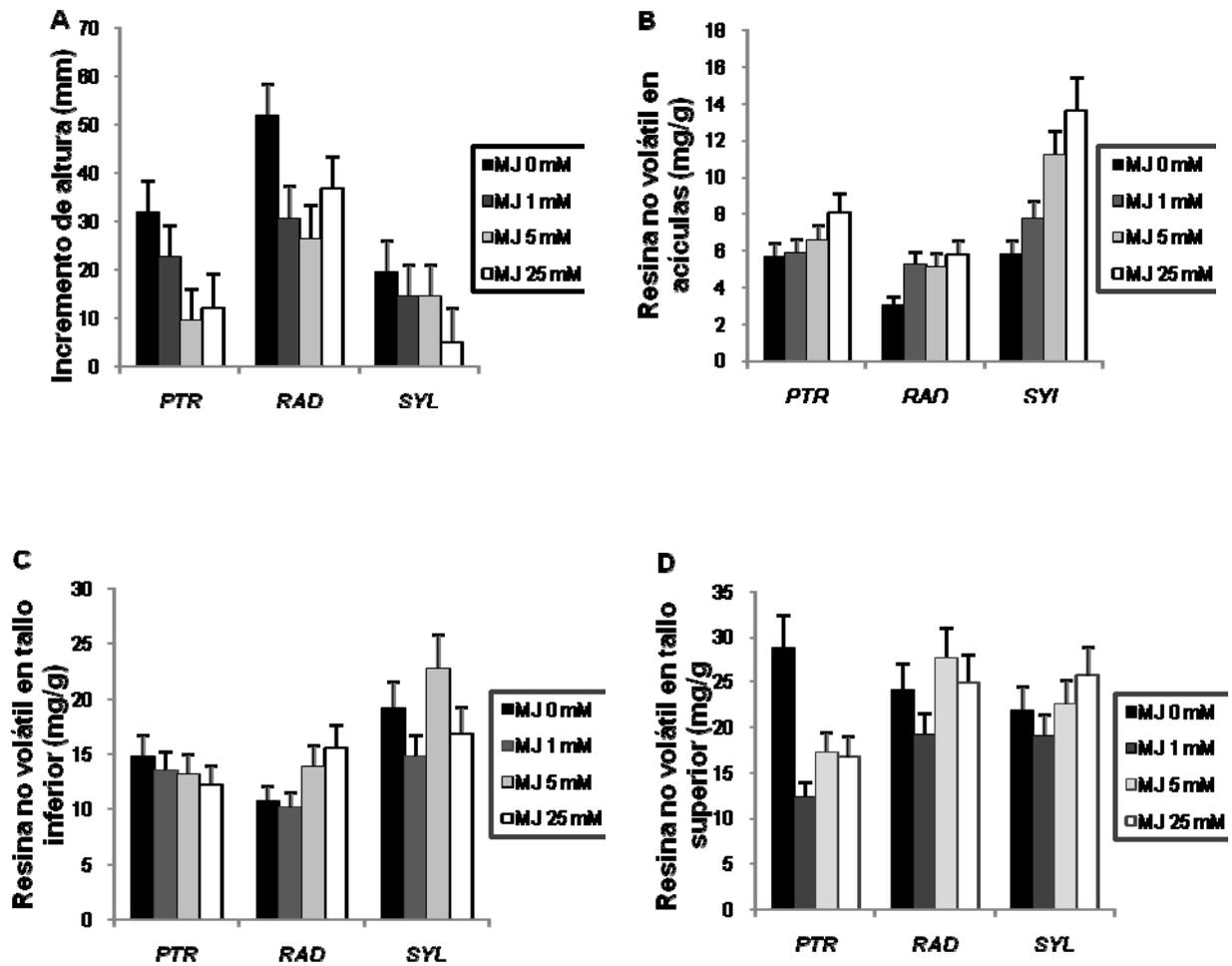


Figura 25. Efecto de la aplicación de Meja a distintas concentraciones sobre a) Incremento de altura y sobre la concentración de resina no volátil en b) acículas, c) tallo superior y d) tallo inferior en las tres especies de pino estudiadas (*P. pinaster* (PTR), *P. radiata* (RAD) y *p. sylvestris* (SYL)).

4.2.- Efecto de la aplicación de MeJa a concentraciones bajas sobre los daños de *Hylobius abietis*.

En este apartado se presentan los resultados referentes a las plantas expuestas al curculiónido *Hylobius abietis*, para poder valorar en qué medida la aplicación de MeJa a concentraciones bajas afectó al consumo del insecto en las distintas especies utilizadas.

Los resultados de los análisis de las tres variables que resumen el patrón de consumo del insecto (MOR, NMOR y MEANMOR), se muestran en la (Tabla 3). Para ninguna de las tres variables se observa un efecto significativo de la aplicación de MeJa si bien en el caso del número de mordeduras (NMOR) el efecto del MeJa es marginalmente significativo ($P=0.08$). El patrón no fue diferente entre especies tal como indica la interacción MeJa x Especie no significativa. En todos los casos se observa una tendencia a la disminución del número de mordeduras y del área total mordida (Figura 26) pero las diferencias no son estadísticamente diferentes debido a los altos errores estándar dentro de cada tratamiento.

Por el contrario, se puede observar que el insecto *H. abietis* consumió más sobre la especie *P. pinaster* frente a las otras dos, siendo *P. sylvestris* la especie con menor área mordida y menor número de mordeduras (Figura 26).

Tabla 3. Resultados del análisis de varianza del área mordida (MOR), número de mordeduras (NMOR) y área promedio de las mordeduras (MEANMOR), en las tres especies *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*. Se muestran los efectos de la aplicación de MeJa de la especie (SP) y de su interacción, indicando para cada caso los grados de libertad (GL), los F ratios y los niveles de probabilidad asociados ($P>F$). Los valores de probabilidad significativos ($p < 0.05$) y marginalmente significativos ($p < 0.10$) se resaltan en negrita.

	GL	MEANMOR		NMOR		MOR	
		F	P>F	F	P>F	F	P>F
SP	2	1.05	0.3544	9.63	0.0002	7.18	0.0014
MeJa	3	0.65	0.5844	2.34	0.0800	1.52	0.2162
SP*MeJa	6	1.45	0.2081	0.93	0.4796	1.6	0.1585
PHYL	1	0.30	0.587	3.09	0.0827	2.08	0.1537

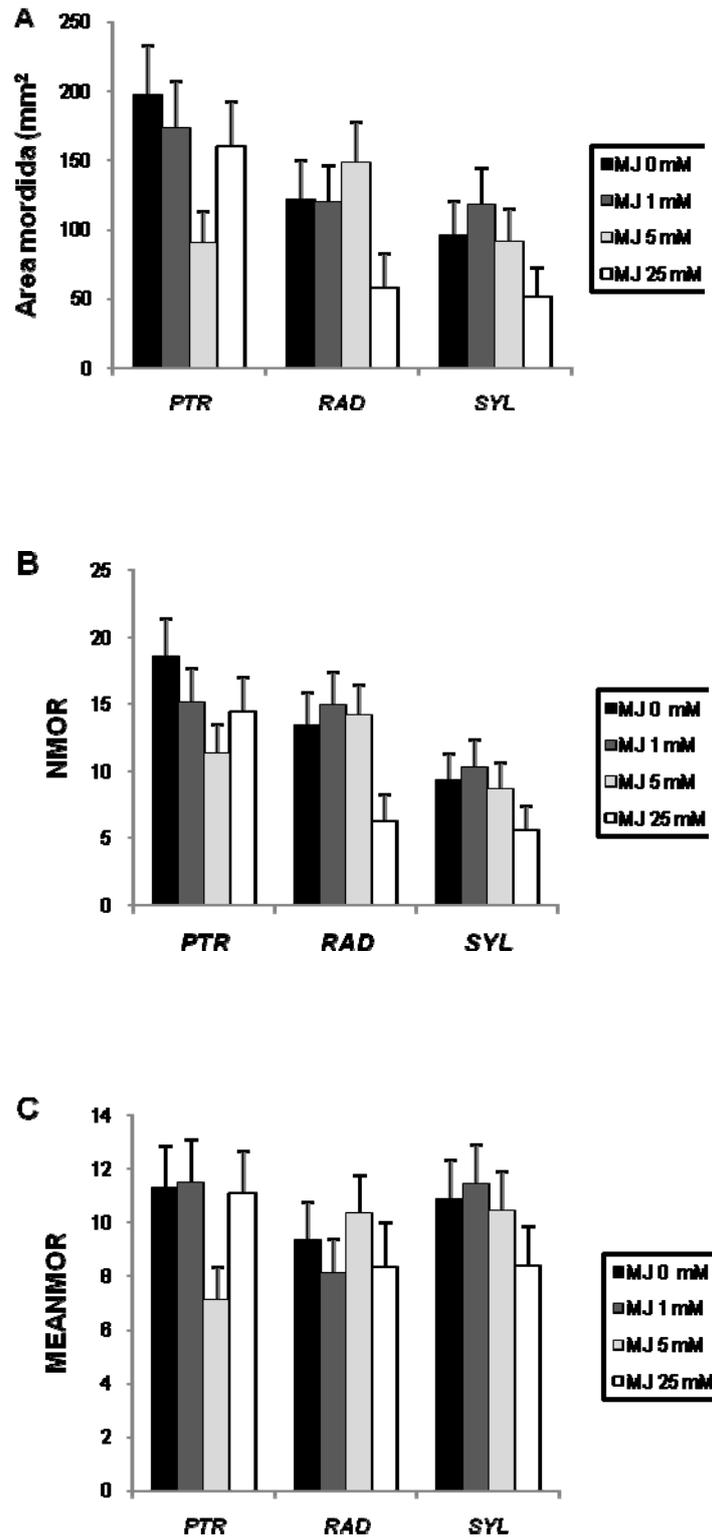


Figura 26. Efecto de la aplicación de MeJa a distintas concentraciones sobre a) Área total mordida por el insecto, b) número total de mordeduras por el insecto, c) área promedio de cada mordedura producida por *H.abietis* en las tres especies (*P. pinaster* (PTR), *P.radiata* (RAD) y *p.sylvestris* (SYL)).

4.3.- Efecto de la aplicación de MeJa a concentraciones bajas sobre el Priming de la maquinaria defensiva.

En esta sección se analiza hasta que punto, la aplicación previa de MeJa a baja concentración afecta a la capacidad de las plantas de pino de responder al consumo de *H. abietis*, incrementando la concentración de resina en sus tejidos.

Los daños provocados por el insecto solo produjeron alteraciones significativas del contenido de resinas en el caso del tallo superior de las plantas de *P. pinaster* y *P. sylvestris* (Tabla 4). En el resto de los casos no se observaron diferencias en el contenido de resina entre las plantas control cosechadas directamente y las plantas sometidas a herbivoría del insecto en los bioensayos (Tabla 4). En *P. pinaster* y *P. sylvestris*, se produjo un aumento considerable de la resina no volátil en el tallo superior en respuesta al daño. Para estas dos especies, las plantas expuestas al insecto presentaron en promedio un 30% y un 60% más de resina no volátil en el tallo superior en relación a las plantas control cosechadas directamente sin exposición al insecto (Figura 27). En ambos casos, sin embargo. La respuesta al consumo del insecto fue diferente según los pre-tratamiento de MeJa aplicados (interacción MeJa vs *Hylobius* significativa o marginalmente significativa) (Tabla 4). El patrón fue similar en las dos especies, con respuestas de incremento de la resina no-volátil en el tallo superior notablemente mayores en las plantas pre-tratadas con MeJa a concentración de 1 y 5 mM (Figura 27).

Tabla 4. Resultados del análisis de varianza mostrando el efecto de la aplicación del MeJa, de la exposición al insecto *H. abietis* (HYL) y de su interacción sobre la concentración de resina no volátil en acículas, tallo superior y tallo inferior en las tres especies estudiadas (*P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*). Se muestran los grados de libertad (GL), los F ratios y los niveles de probabilidad asociados (P>F). Los valores de probabilidad significativos (p<0.05) o marginalmente significativos (p<0.10) se resaltan en negrita.

	GL	<i>P. pinaster</i>		<i>P. radiata</i>		<i>P. sylvestris</i>	
		F	P>F	F	P>F	F	P>F
Resina en acículas							
MJ	3	7.6	0.0003	2.29	0.0900	17.2	0.0001
HYL	1	0.42	0.5191	1.51	0.2243	0.28	0.6009
MJ*HYL	3	1.16	0.3328	1.65	0.1897	0.41	0.7479
Resina en tallo superior							
MJ	3	2.26	0.093	4.01	0.012	1.31	0.2812
HYL	1	6.19	0.016	0.47	0.4975	29.2	0.0001
MJ*HYL	3	5.38	0.003	1.12	0.3485	2.60	0.0620
Resina en tallo inferior							
MJ	3	0.37	0.7775	7.39	0.0003	1.74	0.1696
HYL	1	0.04	0.8501	1.59	0.2128	0.31	0.5801
MJ*HYL	3	0.96	0.4203	0.24	0.8652	0.35	0.7882

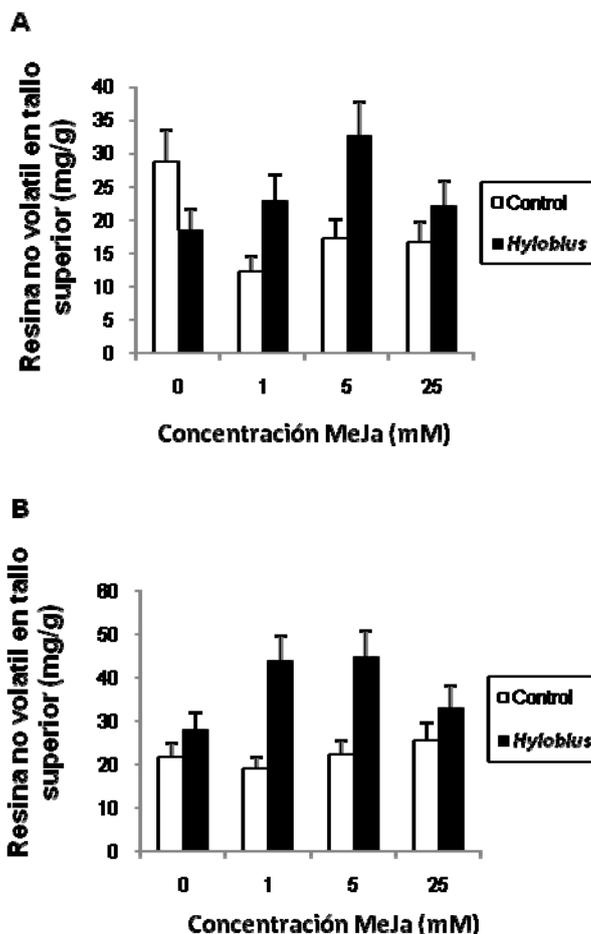


Figura 27. Efecto de la aplicación de MeJa a distintas concentraciones sobre la respuesta de plantas de a) *P. pinaster* y (b) *P. sylvestris* al consumo de *H. abietis* incrementando la resina no volátil en la parte superior del tallo.

Conviene resaltar que el contenido de resina en el tallo y el área mordida por el insecto, mostraron relaciones significativas en dos de las tres especies estudiadas. Como se puede observar en la Figura 29, la relación entre las mordeduras y la resina en el tallo inferior fue significativa en las especies *P. pinaster* y *P. radiata* mientras que en el caso de la resina en el tallo superior lo fue en *P. radiata*. En todos los casos la relación fue negativa, siendo menor el área mordida cuanto mayor era el contenido de resina en el tallo (Figura 28).

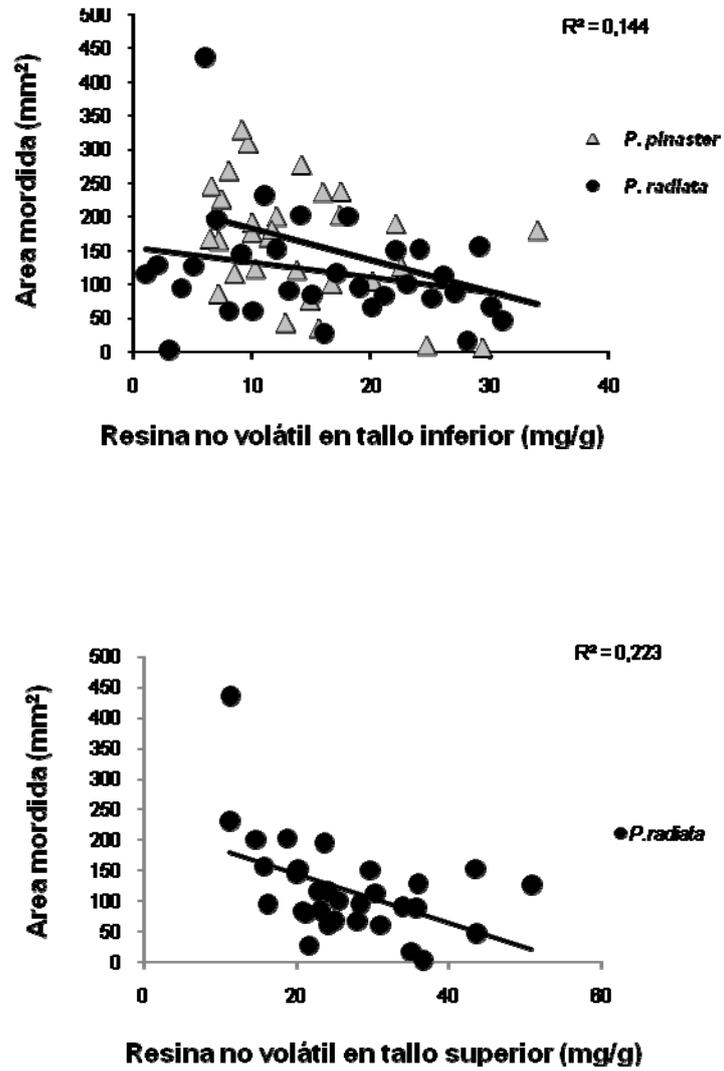


Figura 28. Relación del área mordida y la resina no volátil en a) tallo inferior y b) en tallo superior para las especies *P.pinaster* y *P.radiata*.

DISCUSIÓN



5.- DISCUSIÓN

5.1.- Respuesta a la aplicación de MeJa a bajas concentraciones

La respuesta a la aplicación de MeJa en las tres especies de pino no ha sido muy clara. En este trabajo observamos que la concentración de resina en tallo superiores e inferiores no sigue un patrón claro en respuesta a la aplicación de MeJa, y la respuesta no fue equivalente en las tres especies estudiadas. En otros trabajo previos si se observó un aumento significativo del contenido de resina en los tallos tras la aplicación de MeJa, pero por lo general las concentraciones utilizadas fueron siempre superiores a las del presente trabajo (Hejari et al 2005; Moreira et al. 2009; Sampedro et al.; 2011Zas et al. 2014). Además, es conocido que el efecto de la aplicación de MeJa depende de la edad y del estado fenológico de la planta y de las condiciones ambientales (temperatura, humedad) en el momento de la aplicación, que condicionan el grado de apertura de los estomas, y por tanto la penetración del producto (Moreira et al. 2011). En particular, en el presente trabajo se utilizaron plantas de dos savias de gran tamaño (80-100 cm de altura) lo cual pudo afectar a su sensibilidad a la aplicación de MeJa. No obstante, los resultados observados, con efectos no significativos de la aplicación de MeJa en la concentración de resina en el tallo, concuerda con nuestra hipótesis inicial de que la aplicación de MeJa a dosis bajas, más que provocar un aumento directo de defensas, modifica la capacidad de las plantas de responder a un daño real de herbivoría.

Sin embargo, el contenido de resina en las acículas si respondió a la aplicación de MeJa siguiendo un patrón dosis dependiente. A mayor concentración de MeJa aplicada, mayor concentración de resina en las acículas, lo cual concuerda con otros estudios realizados con concentraciones de MeJa, donde se observó que la aplicación de este compuesto aumenta considerablemente las concentraciones de resina en diferentes estructuras de las plantas (Hejari et al 2005; Zeneli et al. 2006; Moreira et al. 2009; Sampedro et al.; 2011Zas et al. 2014). Esta diferencia de respuesta en la concentración de resina entre acículas y tallo se puede deber a que el MeJa supuestamente penetra a través de las acículas, principalmente a través de los estomas. Es posible que el MeJa aplicado no se difundiera suficientemente en la planta, y que su efecto fuese más local, afectando sólo al tejido por donde entra en la planta. Concordando con esta idea, otros trabajos previos han encontrado una mayor sensibilidad de la aplicación del MeJa en las acículas que en el tallo, si bien por lo general la aplicación de MeJa a concentraciones mayores que las utilizas aquí, incrementa la concentración de resina en ambos tejidos (Hejari et al 2005; Zeneli et al. 2006; Moreira et al. 2009; Sampedro et al.; 2011Zas et al. 2014).

El MeJa es un compuesto volátil muy eficaz para activar las defensas de las Pinaceas frente a los ataques de algunos insectos herbívoros y hongos patógenos. Por ejemplo, trabajos anteriores han demostrado que la aplicación de MeJa protege a *P.radiata* frente al ataque de *Diploide pinea* (Gould et al. 2008) y protege a las tres especies estudiadas aquí frente al herbívoro *H. abietis* (Zas et al. 2014). Los efectos de MeJa también fueron estudiados en individuos adultos de *P. sylvestris* con resultados

positivos aumentando, entre otras la formación de canales de resina en el xilema (Heijari et al. 2005; 2008). Pero donde más se estudio sobre los efectos de MeJa es en *P. pinaster*, donde con diferentes concentraciones y tamaños de planta, se obtuvieron resultados diversos. Por ejemplo, la aplicación de una concentración de 100 mM de MeJa aumentó el contenido de resina en los tallos un 40% y redujo el consumo de *H. abietis*, en plantas de un tamaño equivalente al del presente estudio (Sampedro et al. 2009). La aplicación de una concentración de 22 mM no afecto a la concentración de azúcar y carbohidratos pero sí al crecimiento de la planta y al contenido de resina en tallos y polifenoles en acículas (Sampedro et al. 2011). Por último, la aplicación doble de una concentración de 25 mM en un intervalo de 15 días resultó muy eficaz aumentando el contenido en compuestos defensivos y reduciendo el consumo de *H. abietis* en las tres especies estudiadas aquí, en condiciones reales de campo (Zas et al. 2014). a diferencia de lo observado en estos trabajos, en el presente proyecto, la aplicación de MeJa a baja concentración (0-25 mM) no afectó al consumo del insecto en ninguna de las tres especies, si bien en todas ellas se observa una tendencia a un menor número de mordeduras y una menor área mordida en las platas tratadas con las dosis más altas. Esto concuerda con la falta de respuesta al MeJa observada en relación a la concentración de resina en el tallo y confirma nuestra hipótesis inicial.

La aplicación exógena de MeJa, también puede influir en otras funciones de la planta no relacionadas con la resistencia como el crecimiento vegetativo, el desarrollo ontogénico y la tasa fotosintética. En coníferas, algunos estudios han demostrado que la aplicación de MeJa reduce la tasa de crecimiento de las plantas (Heijari et al., 2005; Gould et al., 2008; Zas et al. 2014). Por ejemplo, Heijari et al. (2005) observaron, que con un tratamiento de 100 mM de MeJa, el crecimiento y el diámetro de las plantas de *P. sylvestris* disminuyó significativamente en comparación con un tratamiento de 10 mM de MeJa. En las plantas de nuestro experimento no se utilizaron concentraciones tan altas de MeJa (0- 25 mM), pero aún así, los resultados nos indican una disminución significativa del crecimiento en altura en las tres especies estudiadas. Esto contrasta con lo observado en estudios anteriores, donde concentraciones bajas de MeJa no modifica substancialmente el crecimiento (Moreira et al. 2011). En cualquier caso, la pérdida de crecimiento ocasionada por la aplicación de MeJa suele ser temporal y en términos generales, las plantas tratadas, al estar más defendidas y sufrir menos daños, acaban recuperando su capacidad de crecimiento y superando en tamaño a las plantas control (Zas et al. 2014). Estos resultados invitan a considerar la aplicación de MeJa como una herramienta potencial para proteger las plantas de semillero contra herbívoros y patógenos, tal y como ya se ha propuesto en trabajos anteriores (Holopainen et al. 2009; Zas et al. 2014). Sin embargo, esta no era la filosofía de este proyecto, donde más que buscar un aumento directo de la resistencia, buscamos evaluar hasta qué punto la aplicación de MeJa afecta a la capacidad de generar respuestas inducidas a un ataque de herbívoro, es decir, en qué medida de MeJa desencadene una *imprimación* de las plantas de pino (ver apartados siguientes de la discusión).

5.2 Respuesta a la herbivoría de *Hylobius abietis*

Las plantas de nuestro experimento no reaccionaron de forma evidente al ataque del insecto *H. abietis*. Solo se observó una respuesta clara en el caso de la resina en el tallo superior que aumentó de forma significativa tras el daño del curculiónido en *P. pinaster* y *P. sylvestris*. En las plantas expuestas a herbivoría la concentración de resina no volátil en el tallo superior en estas dos especies, aumentó un 30 y un 60% en comparación con las plantas que no fueron expuestas al insecto *H. abietis*.

En otros trabajos de investigación previos, la respuesta al consumo de *H. abietis* u otros herbívoros ha sido mucho más patente (Franceschi et al. 2002; Zeneli et al. 2006). Estos ataques de insectos herbívoros masticadores están asociados a un aumento del flujo de resina y otras respuestas anatómicas defensivas, que se traducen en un aumento en la resistencia a la herbivoría (Bauce et al 1994; Wainhouse et al. 2009). En particular, Sampredo et al. (2009) observaron un aumento de la resina en el tallo de *P. pinaster* de hasta 4 veces en respuesta al consumo de este insecto. No obstante, en este último trabajo la respuesta al daño del insecto se evaluó en los alrededores de la zona mordida (el insecto se confinó en un pequeño segmento del tallo, donde posteriormente se evaluó el contenido de resina no volátil). En nuestro caso el bioensayo se efectuó sobre toda la planta y el insecto actuó libremente a lo largo de todo el tallo. Con nuestro esquema de muestreo, la sección de tallo analizada puede caer cerca o lejos de una zona mordida y esta proximidad no se tuvo en cuenta en los análisis. Sin duda, la respuesta al daño del insecto es mayor en la proximidad de las heridas, lo que pudo afectar a nuestros resultados. No obstante, la respuesta fue clara al menos en el tallo superior, zona más activa en estas plántulas en pleno crecimiento. Es en esta sección donde, por tanto, hay que centrar los resultados sobre el *priming* (ver apartado siguiente).

La relación entre el área mordida y la concentración de resina no volátil en el tallo superior en las plantas de *P. pinaster* y *P. radiata* sigue el patrón esperado, es decir a mayor concentración de resina menor área mordida por el insecto, tal y como se ha observado en trabajos anteriores (Moreira et al. 2009; Zas et al. 2014). Aunque no significativa, la aplicación de MeJa también afectó al consumo del insecto, que tendieron a morder ligeramente menos en las plantas pre tratadas con MeJa.

H. abietis consumió mas área en la especie *P. pinaster* frente a las otras dos especies analizadas (*P. radiata* y *P. sylvestris*), siendo *P. sylvestris* la especie con menor área mordida y menor número de mordeduras. Esto contrasta con resultados anteriores, en los que se ha identificado a *P. sylvestris* (junto con *Picea abies*) como las especies preferidas por este insecto. Sin embargo, las plantas de *P. sylvestris* utilizadas en el presente trabajo eran más pequeñas en comparación con *P. pinaster* y *P. radiata*. Aunque el área mordida fue menor en *P. sylvestris* muchas plantas de esta especie estaban completamente mordidas, por lo que, en términos relativos, el daño fue mucho mayor.

5.3 Imprimación de defensas mediante la aplicación de MeJa

Nuestra hipótesis inicial era que el MeJa aplicado a concentración baja más que aumentar la concentración de defensas químicas y/o la resistencia efectiva frente al insecto *H. abietis*, modifica la capacidad de las plántulas de pino de reaccionar a los daños de este insecto activando defensas inducidas. La ausencia de una respuesta clara a la aplicación de MeJa en relación a la concentración de resina en el tallo y al área mordida por el insecto concuerda con esta hipótesis.

También en concordancia con nuestra hipótesis, en los dos casos donde se observó una respuesta significativa al consumo del insecto incrementando el contenido de resina en el tallo superior (*P. pinaster* y *P. Sylvestris*), se observó que este aumento fue modulado por los pre tratamientos de MeJa (interacción MJ x *Hyl* significativa en Tabla 4). Es decir, tal como predecíamos, la aplicación de MeJa, afectó a la capacidad de las plantas de reaccionar al daño de herbivoría, incrementando sus defensas. En ambos casos la respuesta fue notablemente mayor en las plantas pre tratadas con las concentraciones de MeJa más bajas (1 y 5 mM), mientras que la respuesta fue menor en las plantas tratadas con 25 mM MeJa. En las plantas pre tratadas con 1 y respectivamente con 5 mM el contenido de resina se duplicó tras la exposición a la herbivoría del insecto. El incremento en las plantas tratadas con 0 y 25 mM fue mucho más reducido o incluso no significativo (Figura 28). Esto podría estar indicando que solo las concentraciones más bajas de MeJa tuvieron un efecto de tipo *Priming*, mientras que la de 25 mM induce defensas químicas directamente y no modifica la capacidad de respuesta posterior a un daño. En los demás casos (resina en el tallo inferior y resina en acículas) no se observó un efecto claro de la herbivoría del insecto y tampoco una interacción entre la aplicación previa de MeJa y la herbivoría del insecto.

En la literatura no existen trabajos previos que hayan explorado el fenómeno del *Priming* en coníferas. Sin embargo, en algunos trabajos hay resultados relacionados. Por ejemplo, Sampedro et al. (2011) observaron un fuerte aumento de la concentración de resina en el tallo de plántulas de *P. pinaster* tras la exposición a *H. abietis*, incremento que no fue mayor en las plantas tratadas previamente con 100 mM MeJa. Sin embargo, en este trabajo la aplicación de MeJa sí indujo un fuerte incremento de la concentración de resina en las plantas, incremento que se reflejó en un menor consumo del insecto. Las plantas pre tratadas con 100 mM MeJa tenían menos resina y fueron menos dañadas, respondiendo por tanto menos al daño. Por el contrario, la respuesta al insecto en las plantas control (0mM MeJa) fue mayor debido a un mayor daño del insecto. Al final. El contenido de resina en plantas control y pre tratadas con MeJa fue similar, pues una cosa compensaba a la otra.

En otro trabajo reciente, la aplicación de 100 mM MeJa en árboles adultos de *Picea abies* sí modificó notablemente la respuesta a heridas mecánicas posteriores causadas por escolítidos (Zhao et al. 2011). En los arboles pre tratados con MeJa la

concentración de diterpenos fue del orden de 10 veces mayor en las plantas con daños que en las plantas intactas. Este aumento fue mucho menor (del orden del doble) en las plantas pulverizadas con la solución control (Zhao et al. 2011). A diferencia del presente proyecto, en este trabajo de muestreo se realizó controlando la distancia a los daños causados por los escolítidos, muestreando justo alrededor de la galería de entrada o en zonas completamente intactas.

Es importante señalar que en el presente proyecto también puede haber un conflicto semejante al comentado en relación al trabajo de Sampedro et al. (2011). Aunque los pre tratamiento de MeJa no tuvieron un efecto significativo sobre el consumo del insecto, los daños provocados por el insecto tendieron a ser menores en las plantas pre tratadas con MeJa, y, en todo caso, el insecto consumió menos cuanto mayor era el contenido de resina en los tallos (Figura 29). Es decir, por un lado el daño del insecto fue menor cuanto mayor era el contenido de resina inicial. Pero por otro, la respuesta al daño del insecto incrementando la resina es esperable que fuese mayor cuanto mayor fuese el daño causado por el insecto. Este feedback negativo complica la detección experimental del fenómeno del *Priming*. A la vista de los resultados observados en la resina superior del tallo en *P. pinaster* y *P. sylvestris*, es posible que este problema se pueda solucionar explorando el posible efecto del MeJa como imprimador de defensas aplicando concentraciones aun más bajas que las utilizadas en el presente trabajo. Un muestreo dirigido en zonas próximas a las mordeduras del insecto también ayudaría a despejar el problema

CONCLUSIÓN



6.- CONCLUSIÓN

1. En contra de lo esperado, la aplicación de MeJa en concentraciones bajas, produjo un aumento de resina no volátil en las acículas de las tres especies estudiadas (*P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*). Sin embargo, no se observaron efectos significativos en la concentración de resina no volátil en el tallo. Esto podría ser debido a que el MeJa no penetró de forma igual en los diferentes tejidos de la planta, siendo más rápido y eficaz el efecto sobre el tejido por donde se asume penetra la pulverización.
2. El efecto de la aplicación de MeJa a baja concentración no afectó significativamente el área de mordeduras y ni al número de mordidas que sufren las plantas por el herbívoro *H. abietis* en ninguna de las tres especies estudiadas.
3. La aplicación de MeJa tuvo como consecuencia una disminución en la tasa de crecimiento de las plantas en las tres especies estudiadas.
4. Las plantas de las tres especies respondieron menos a la herbivoría de *H. abietis* de lo esperado. Solo la concentración de resina no volátil en el tallo superior de las plantas de *P. pinaster* y *P. sylvestris* se incrementó de forma significativa tras la exposición a la herbivoría de este insecto.
5. De acuerdo con nuestra hipótesis inicial, en *P. pinaster* y *P. sylvestris* la respuesta a la herbivoría de *H. abietis* incrementando la resina no volátil en la parte superior del tallo fue alterada por los pre tratamientos de MeJa. La aplicación de MeJa a concentración baja (1, 5 mM) aumento notablemente la capacidad de las plantas de responder al daño del insecto aumentando la producción de resina. La concentración de 25 mM no produjo, sin embargo, este efecto. Tampoco se observaron efectos equivalente en *P. radiata* o en el contenido de resina no volátil en otros tejidos.
6. Aunque los resultados de este trabajo están sujetos a alguna incertidumbre, posiblemente derivada de algún problema metodológico, en general los resultados apuntan hacia la capacidad de la aplicación de MeJa como imprimador de la maquinaria defensiva en especies de pino, al menos en *P. pinaster* y *P. sylvestris*.

BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA

Agrawal, A.A., Strauss, S.Y., Stout, M.J., 1999. Costs of induced responses and tolerance to herbivory in male and female fitness components of wild radish. *Evolution* 53, 1093- 1104.

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

Alía, R.; Martín, S.; De Miguel, J.; Galera, R.; Agúndez, D.; Gordo, J.; Catalán, G.; Gil, L., 1996. Las regiones de procedencia de *Pinus pinaster* Ait. OA de Parques Nacionales. DGCONA, Madrid, 75 p.

Alía, R.; Moro, J.; Denis, J. B., 1997. Performance of *Pinus pinaster* provenances in Spain: interpretation of the genotype by environment interaction. *Canadian Journal of Forest Research* 27:1548-1559.

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

Estiarte M., Filella I., Serra J. and Penuelas J. 1994. Effects of nutrient and water stress on leaf phenolic content of peppers and susceptibility to generalist herbivore *Helicoverpa armigera* (Hubner) *Oecologia* 99: 387-391.

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

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

Gould, N., Reglinski, T., Spiers, M. y Taylor, J. T. (2008). Physiological trade-offs associated with methyl jasmonate - induced resistance in *Pinus radiata* *Canadian Journal of Forest Research* 38: 677-684.

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

- Heijari, J., Nerg, A.-M., Kainulainen, P., Vuorinen, M., Holopainen, J.K., 2008. Long-term effects of exogenous methyl jasmonate application on Scots pine (*Pinus sylvestris*) 42 needle chemical defence and diprionid sawfly performance Entomologia Experimentalis et Applicata 128, 162-171.
- Honkanen, T., Haukioja, E. y Kitunen, V. (1999). Responses of *Pinus sylvestris* branches to simulated herbivory are modified by tree sink/source dynamics and by external resources. Functional Ecology 13(1): 126-140.
- Lombardero, M. J., Ayres, M. P., Lorio, P. L. y Ruel, J. J. (2000). Environmental effects on constitutive and inducible resin defences of *Pinus taeda* Ecology Letters 3 329 -339.
- Karban, R. and I. T. Baldwin (1997). Induced responses to herbivory. Chicago, The University of Chicago Press.
- Moreira, X., L. Sampedro, A. Solla and R. Zas (2008). "Alterations of the resin canal system of *Pinus pinaster* seedlings after fertilization of a healthy and of a *Hylobius abietis* attacked stand." Trees Structure and Function 22(6): 771-777.
- Moreira X, Sampedro L, Zas R. 2009. Defensive responses of *Pinus pinaster* seedlings to exogenous application of methyl jasmonate: Concentration effect and systemic response. **Environmental and Experimental Botany** 67: 94-100
- Moreira X, Sampedro L, Zas R (2011). Methyl jasmonate as chemical elicitor of induced responses and anti-herbivory resistance in young conifer trees. In: Merillon JM and Ramawat KG (eds) Plant defence: Biological control. Progress in Biological Control. Springer Netherlands. Vol. 12, pp 345-362.
- Nordhem, H. and G. Nordlander (1994). "Olfactory oriented migration through soil by root-living *Hylobius abietis* (L.) larvae (Col., Curculionidae)." Journal of Applied Entomology 117: 457-462.
- Koricheva, J., Nykonen, H. y Gianoli, E. (2004). Meta-analysis of Trade-offs among Plant Antiherbivore Defenses: Are Plants Jacks-of-All-Trades, Masters of All? The American Naturalist 163: 64 -75.
- Sampedro, L., X. Moreira, P. Martins and R. Zas (2009). "Growth and nutritional response of *Pinus pinaster* after a large pine weevil (*Hylobius abietis*) attack." Trees Structure and Function 23: 1189-1197.
- Sampedro, L., X. Moreira and R. Zas (2011). "Costs of constitutive and jasmonate induced pine tree chemical defences emerge only under low nutrient availability." Journal of Ecology 99: 818-827.

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

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

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

van Akker, 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.

Wainhouse D (2004). *Hylobius abietis* - host utilisation and resistance. In: Lieutier F, Day KR, Battisti A, Gregoire J-P and Evans HF (eds) *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*. Kluwer Academic Publishers: The Netherlands, pp 365-379

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

Zas, R., Pichel, F., Martins, P. y Fernyez-Lopez, J. (2006). Fertilization x genotype interaction in *Pinus radiata* open pollinated families planted in three locations in Galicia (NW Spain). *New Forest* 32 (3): 253-263.

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

Zas R, Niklas Björklund, Göran Nordlander, César Cendán, Claes Hellqvist, Luis Sampedro. (2014). Exploiting jasmonate-induced responses for field protection of conifer seedlings against a major forest pest, *Hylobius abietis*. *Forest Ecology and Management* 313, 212-223

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

Zhao T, Borg-Karlson A-K, Erbilgin N, Krokene P (2011). Host resistance elicited by methyl jasmonate reduces emission of aggregation pheromones by the spruce bark beetle, *Ips typographus*. *Oecologia* 167: 691-699.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todas a las personas que me ayudaron a realizar el proyecto de fin de carrera (Rafa Luis, Cesar, Luz, Rocío, Patricia, Michel y Beatriz. En especial agradecerles este proyecto a los directores (Rafa y Luis), con ellos aprendí muchas cosas y me han demostrado que son unos grandiosos profesionales y fantásticos compañeros. También quiero tener un agradecimiento especial a Beatriz Diz, que me ha animado y ayudado mucho.

Quiero agradecer el apoyo que me han dado mis padres, mis hermanos, Katia, Jose, Loli y Sofía. Gracias a sus ánimos y a sus empujones he podido terminar uno de mis sueños que comenzó hace 5 años.

¡GRACIAS!