



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-455

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

1 **Efecto de la disponibilidad de luz en la interacción entre el curculiónido *Hylobius abietis* y**
 2 ***Pinus pinaster*. intensidad del daño, respuestas defensivas de las plantas y variación entre**
 3 **procedencias**

4 **SUÁREZ-VIDAL, E.¹, LÓPEZ-GOLDAR, X.¹, ZAS R.¹, SAMPEDRO, L.¹**

5
 6 ¹ Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC. Apdo. 28, Pontevedra, 36143, Galicia, España).

7
 8
 9 **Resumen**

10
 11 La producción de defensas químicas en los pinos es costosa y debe balancearse con la inversión
 12 en otras funciones vitales. Cambios ambientales que alteren el proceso fotosintético, como la
 13 falta de luz, podrían afectar la capacidad defensiva de las plantas frente a herbívoros. En
 14 trabajos previos se observó que el daño por *Hylobius abietis*, importante herbívoro en la etapa
 15 juvenil de *Pinus pinaster*, es mayor en oscuridad. Nuestro objetivo es conocer por qué la
 16 disponibilidad de luz modifica el resultado de la interacción planta-insecto, algo que podría
 17 deberse a restricciones fisiológicas en la planta o al hábito nocturno del insecto. Para ello
 18 expusimos pinos de tres procedencias sometiendo planta y/o insecto a luz u oscuridad durante
 19 6 días en un diseño factorial completo con muestreos destructivos, estudiando las respuestas de
 20 la planta y el consumo del insecto. La privación de luz sobre la planta no afectó a la intensidad de
 21 la respuesta defensiva ($P=0.616$); el daño por el insecto fue mayor cuando éste se encontraba
 22 en condiciones de oscuridad ($P=0.003$) y difirió significativamente entre procedencias ($P=0.044$).
 23 Estos resultados sugieren un efecto directo de la luz el comportamiento del insecto, sin
 24 restricciones fisiológicas defensivas de la planta en oscuridad.

25
 26 **Palabras clave**

27 Herbivoría, privación de luz, defensas inducidas, carbohidratos, variación genética.

28
 29
 30 **1. Introducción**

31
 32 El almacenamiento y producción de resina y compuestos fenólicos es el principal
 33 mecanismo defensivo de las coníferas. Se trata de un sistema defensivo “cuantitativo”, ya que,
 34 de forma general, sigue un patrón dosis-dependiente, es decir, a mayor concentración de estos
 35 compuestos tóxicos, mayor es la resistencia contra plagas y patógenos (Zas y Sampedro., 2015).
 36 En respuesta a los daños ocasionados por insectos y patógenos los pinos, como otras plantas,
 37 pueden incrementar la concentración de sus defensas químicas, lo que se conoce como
 38 “defensas inducidas”. Terpenos y fenoles son compuestos carbonados costosos de producir, por
 39 ello, la inversión en defensas químicas debe estar equilibrada con la energía destinada al resto
 40 de las funciones vitales, como crecer, reproducirse y la tolerancia a otros estreses. Las defensas
 41 inducidas suponen, de hecho, una estrategia de ahorro de recursos, ya que la síntesis de
 42 defensas se ejecuta sólo cuando es realmente necesaria. Sin embargo, la síntesis de defensas
 43 inducidas también es costosa para la planta, y requiere de gran cantidad de recursos carbonados
 44 (SAMPEDRO et al 2011). Cualquier limitación en el suministro de carbono, como la falta de luz o
 45 el cierre de estomas ante un evento de sequía (propio de especies isohídricas como los pinos)
 46 podría, por tanto, reducir la capacidad para generar defensas inducidas. Conocer hasta qué
 47 punto la síntesis de defensas inducidas depende de la disponibilidad de fotosintatos de reciente
 48 síntesis resulta esencial para comprender la capacidad de hacer frente a múltiples estreses, algo
 49 que se espera que sea especialmente crítico en circunstancias ambientales cambiantes.

50 En un trabajo previo (LÓPEZ-GOLDAR et al., 2016) se observó que tanto el daño causado
 51 por el curculiónido *H.abietis* sobre los pinos como la producción de resina por la planta, fue

52 mayor cuando ambos (planta e insecto) fueron sometidos a oscuridad. Sin embargo, estos
53 resultados no aclaran en qué medida la alteración de la actividad fotosintética, debida a
54 restricciones de luz, podría condicionar las respuestas fisiológicas de la planta en respuesta a la
55 herbivoría, ni hasta qué punto la mayor actividad del insecto en condiciones de oscuridad se
56 debe a cambios fisiológicos en la planta, como se ha demostrado en otros sistemas (ARIMURA et
57 al., 2008; DANIELLE et al., 2012; KIM et al., 2011; SHIOJIRI et al., 2006), ya que los tratamientos
58 de luz y oscuridad fueron aplicados a la totalidad de la planta e insecto de forma simultánea.

59 En este trabajo exploramos estas cuestiones en diferentes procedencias de *P. pinaster*
60 expuestos a *H. abietis*, curculiónido comedor del floema y corteza que causa importantes daños
61 en el tallo de las plantas, causando el anillamiento y muerte de las mismas. Para ello, realizamos
62 un experimento bajo condiciones controladas con un diseño factorial en el que se cruzaron dos
63 tratamientos de disponibilidad de luz (luz natural / oscuridad) aplicados sobre la planta o sobre
64 el insecto en un diseño factorial completo.

65 66 2. Objetivos

67
68 El objetivo de este trabajo es conocer hasta qué punto la privación de luz altera el
69 resultado de la interacción pino-curculiónido, y si dicha alteración es debida a un cambio de
70 comportamiento del insecto, del estado fisiológico de la planta en ausencia de luz y fotosíntesis o
71 a efectos interactivos de ambos factores.

72 La hipótesis principal es que si las respuestas generadas por el pino frente al ataque del
73 insecto dependen de la actividad fotosintética de la planta, la restricción de luz limitará la
74 capacidad de los pinos de responder al daño causado por el insecto. Por el contrario, si la
75 respuesta de plantas en condiciones de luz fuese similar a la de las plantas en condiciones de
76 oscuridad indicaría la ausencia de limitaciones fisiológicas defensivas en falta de luz y sugeriría
77 que las diferencias observadas deberían derivarse de un efecto directo de la luz sobre el
78 comportamiento del insecto.

79 3. Metodología

80
81 Plantas de *Pinus pinaster* Ait. de tres años de edad y tres procedencias (Galicia-Costa,
82 Soria-Burgos y Marruecos) fueron expuestas a herbivoría experimental por el insecto curculiónido
83 *H. abietis*, y sometidas a dos factores principales: luz sobre la planta y luz sobre el insecto, en un
84 diseño factorial completo replicado en 6 bloques. Cada uno de estos factores constó de dos
85 niveles: luz natural y oscuridad completa, como se ilustra en la figura 1.

86 Para los tratamientos de herbivoría, un macho y una hembra de peso conocido fueron
87 recluidos en una caja de madera de 7 x 4 x 3 cm con los laterales de plástico transparente
88 provistas de un bebedero, cortando previamente las acículas en la zona de la caja. Para los
89 tratamientos de privación de luz al insecto, la caja se recubrió con dos capas de cinta adhesiva
90 negra, permaneciendo los insectos en las plantas con luz en la caja transparente. Para restringir
91 la luz a la planta se emplearon bolsas de plástico agrícola negro, cubriendo las plantas control
92 expuestas a la luz con una bolsa transparente de la misma galga. Como control sin herbivoría se
93 estableció un conjunto idéntico de plantas provistas de cajas pero sin insectos. Las plantas
94 fueron mantenidas durante 6 días con los tratamientos de herbivoría y luz correspondientes en
95 un invernadero en la Misión Biológica de Galicia (CSIC) bajo condiciones controladas de luz,
96 humedad y temperatura.

97
98
99
100

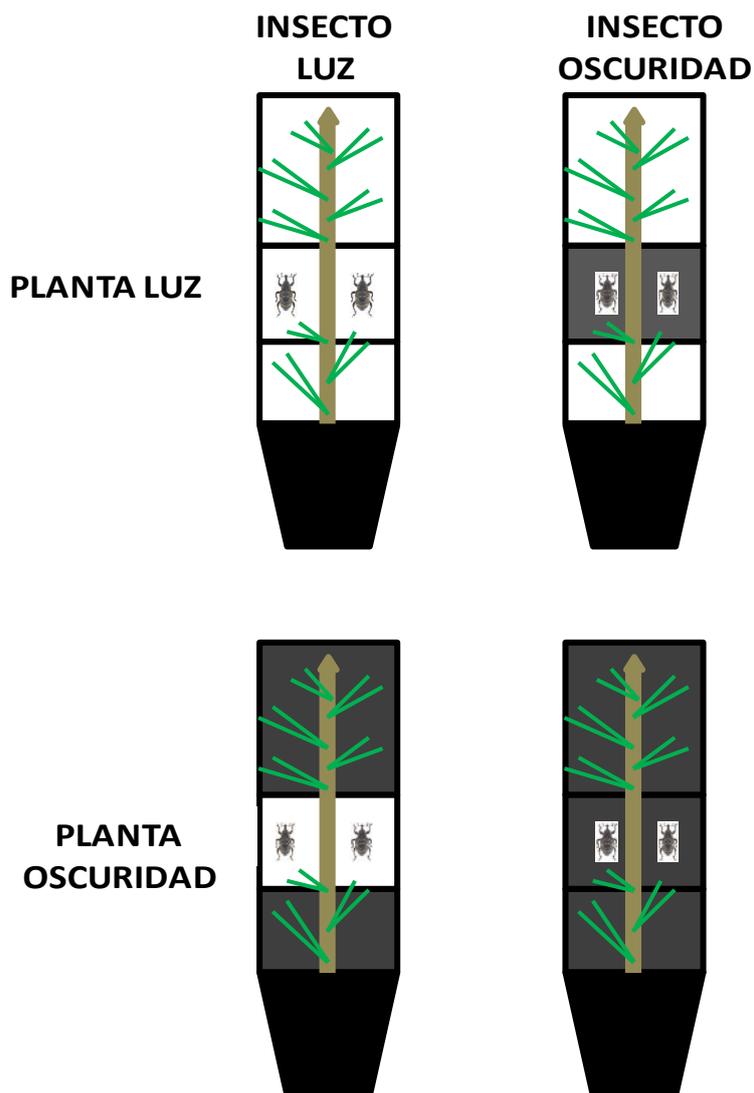


Figura 1. Tratamientos cruzados de luz en planta e insecto.

101
102
103
104
105
106
107
108
109

A los 6 días se retiraron los insectos y se cosecharon las plantas. El área mordida por el insecto se determinó mediante un film adherente que se pegó al tallo (Fig. 2), en el que se marcaron las mordeduras de la corteza, y que posteriormente fue escaneado y sometido a análisis de imagen con el software Image ProPlus®.

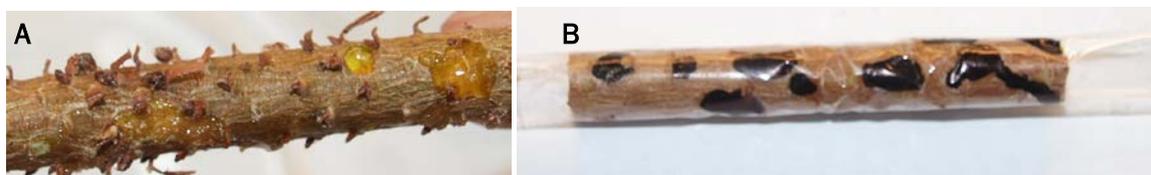


Figura 2. (A) Exudación de resina tras el daño causado por el curculiónido *H. abietis* en el tallo y (B) delimitación del área mordida en la parte experimental del tallo para su posterior análisis con el software Image ProPlus®.

110
111
112
113

114 A continuación se procedió a la extracción de la resina la parte experimental del tallo-con
 115 hexano y la concentración de su fracción no volátil (mayormente diterpenos) se determinó
 116 gravimétricamente en balanza de precisión tras la evaporación del extractante (MOREIRA et al.,
 117 2009). Los azúcares solubles totales y almidón se extrajeron con etanol y HCl respectivamente, y
 118 su concentración se determinó espectrofotométricamente con antrona en ácido sulfúrico
 119 (HANSEN & MOLLER., 1975).

120 Los datos se analizaron mediante un ANOVA con tres factores fijos (población, luz en el
 121 insecto y luz en la planta) y un factor aleatorio (bloque) utilizando el procedimiento Proc Mixed de
 122 SAS. Cuando los residuos del modelo no fueron normales, las variables dependientes se
 123 transformaron mediante $\log(x+1)$ para conseguir la normalidad.

124

125 4. Resultados

126

127 *Efecto de la restricción de luz en planta e insecto sobre los daños causados por éste:*

128

129 Los resultados obtenidos muestran que los insectos comieron más cuando estuvieron en
 130 oscuridad, produciendo una mayor área mordida (tabla 1). No encontramos un efecto
 131 significativo de la restricción de luz en la planta sobre la intensidad de alimentación del insecto (p
 132 = 0.859), pero sí encontramos diferencias significativas entre procedencias (p = 0.044) en el
 133 daño causado por el insecto, con un mayor consumo en las plantas de Marruecos (figura 3)
 134 respecto a Galicia-Costa y Soria-Burgos.

135

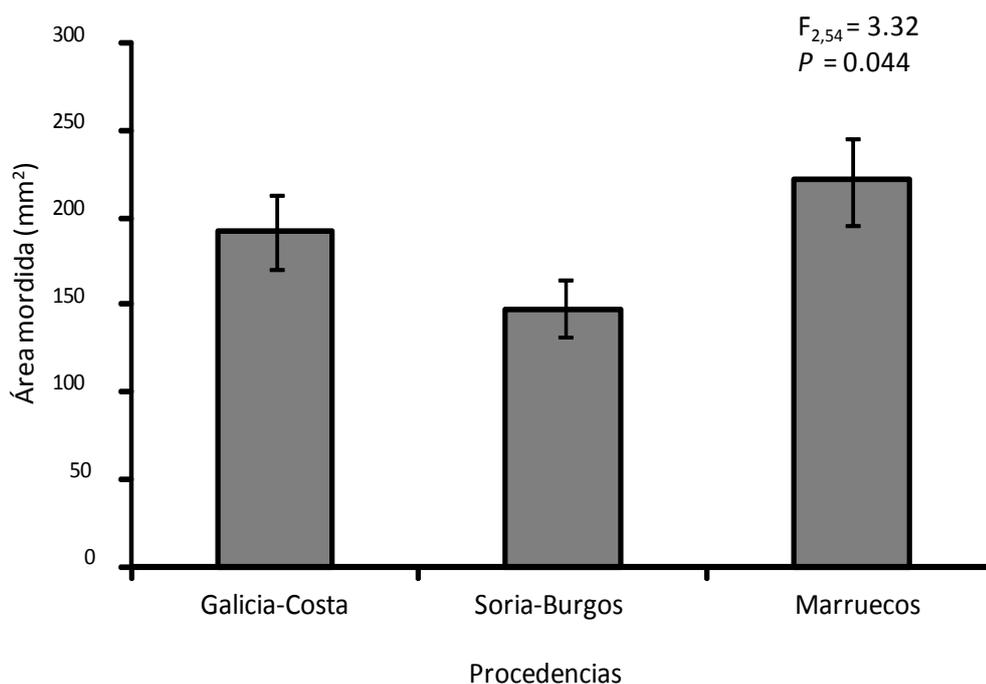
136 *Tabla 1. Efecto de los tratamientos cruzados de luz sobre la planta o sobre el insecto en el área mordida (mm²)*
 137 *por H. abietis. Media ± E.S. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de luz del*
 138 *insecto y las n.s las diferencias no significativas de los tratamientos de luz en las plantas.*

139

	Insecto en luz (área mordida, mm ²)	Insecto en oscuridad (área mordida, mm ²)	Efecto de la luz sobre el insecto
Planta en luz	157.95 ± 20.3	218.73 ± 28.14	**
Planta en oscuridad	143.26 ± 18.49	230.30 ± 29.67	**
Efecto de la luz en la planta	n.s.	n.s.	

140

141



142

143

144

Figura 3. Daño causado por *H. abietis* en las tres procedencias estudiadas (Galicia-Costa, Soria-Burgos y Marruecos) de *Pinus pinaster*. Media \pm E.S.

145

146

Efecto de los tratamientos de luz en planta e insecto sobre la respuesta de la planta:

147

148

149

150

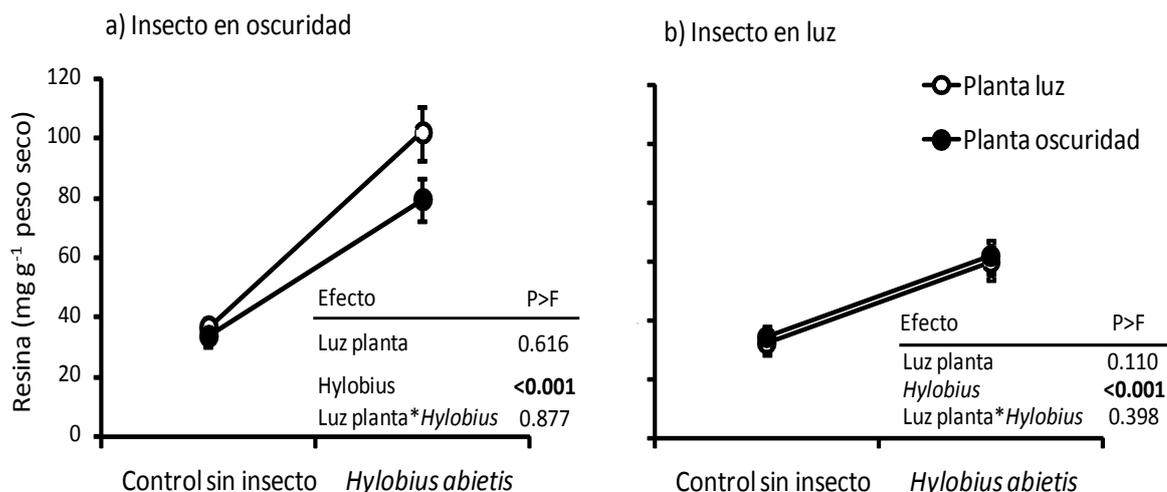
151

152

La exposición al insecto provocó un claro incremento de la concentración de resina en la parte experimental del tallo respecto a las plantas control sin insecto (Figura 4). El incremento de resina fue mayor cuando el insecto estuvo sometido a oscuridad (Figura 4), no habiendo diferencias en función del tratamiento de luz en la planta. Al igual que con los daños, la producción de defensas inducidas fue diferente entre procedencias (figura 5), siguiendo el mismo patrón que el del daño.

153

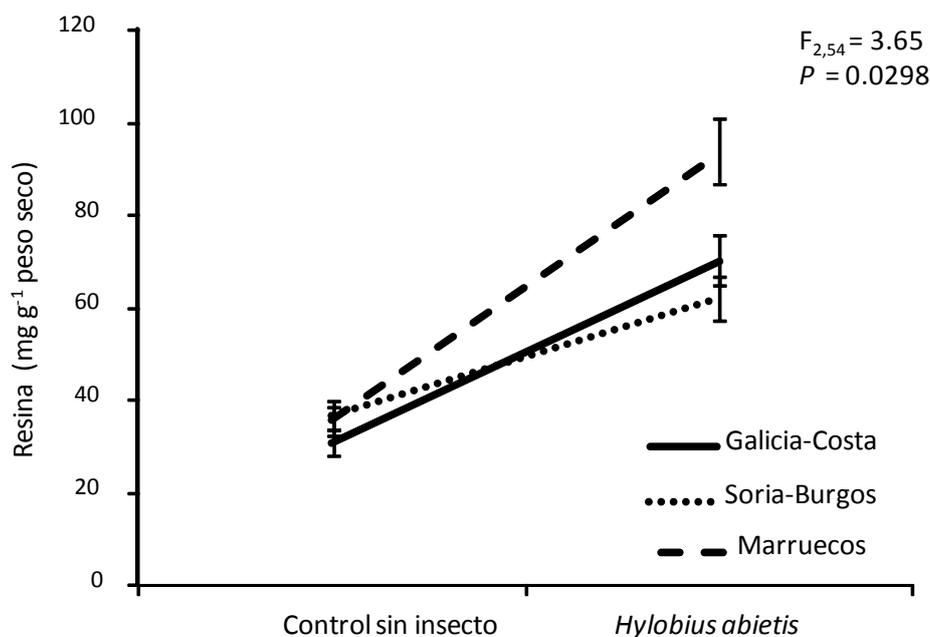
154



155

156 *Figura 4. Efecto de la exposición al insecto H. abietis durante 6 días sobre la concentración de resina no volátil*
 157 *(mg g⁻¹ peso seco) en pinos de tres años de edad con el insecto en oscuridad (a) o en luz (b) para los diferentes niveles*
 158 *de luz en la planta (planta en luz puntos blancos, planta en oscuridad puntos negros). Medias ± E.S.*

159



160

161 *Figura 5. Concentración de resina no volátil (mg g⁻¹ peso seco) en los tratamientos control y herbivoría para las*
 162 *tres procedencias estudiadas (Galicia-Costa, Soria-Burgos y Marruecos). Media ± E.S.*

163

164 *Efecto de los diferentes tratamientos de luz en planta e insecto en las reservas:*

165 Se observó una disminución significativa de la concentración de azúcares solubles a los
 166 seis días de exposición al insecto, aunque no encontramos diferencias significativas entre
 167 tratamientos de luz en planta e insecto. Asimismo, los tratamientos no generaron diferencias
 168 significativas en la concentración de almidón.

169

170 5. Discusión

171
172 Nuestros resultados descartan la hipótesis de partida en la que planteábamos que la
173 respuesta defensiva en los pinos frente a este insecto podría deberse a limitaciones fisiológicas
174 defensivas en ausencia de fotosíntesis o posibles efectos indirectos mediados por cambios
175 fisiológicos en la planta en relación al régimen de luz. Al descartar esta idea, y vista la ausencia
176 de interacción entre los efectos de la privación de luz en insecto y en la planta, los resultados del
177 presente trabajo sugieren que el hábito de consumo preferente en oscuridad depende de un
178 efecto directo de la luz sobre el comportamiento del insecto. Un patrón de alimentación más
179 activo de este insecto en oscuridad ya ha sido descrito anteriormente en invernadero por LÓPEZ-
180 GOLDAR et al. (2016) y también in vitro por FEDDERWITZ et al (2014).

181 Por otro lado, nuestros resultados proporcionan evidencias de que la producción de resina
182 inducida en respuesta al ataque por el insecto no está restringida en ausencia de fotosíntesis, y
183 que, por tanto, el origen de los compuestos carbonados empleados en la síntesis de resina
184 inducida podría partir de otras fuentes de carbono distintas de los fotosintatos de reciente
185 síntesis, como carbohidratos de almacén, a pesar de que no encontramos un descenso
186 significativo en la concentración de almidón en los tejidos analizados.

187 Por otro lado, se observó que la procedencia más atacada fue la de Marruecos. Este
188 hecho podría estar relacionado con que este origen no se encuentra dentro del rango actual de
189 distribución natural del insecto (Europa y Asia, SCOTT & KING, 1974). Podríamos especular que si
190 los pinos de este origen no han evolucionado en presencia de este insecto, podrían carecer de un
191 sistema de defensa efectivo, carecer de mecanismos de reconocimiento del daño específicos, o
192 bien que la reacción defensiva no resultase tan eficaz como en otras poblaciones que hayan
193 evolucionado en su presencia (como Galicia-Costa y Soria-Burgos). Estas diferencias abren las
194 puertas a profundizar en el estudio de mecanismos de resistencia en poblaciones marginales,
195 que no hayan coevolucionado con el insecto.

196

197

198 6. Conclusiones

199

200 Con estos resultados se descarta la hipótesis de partida; la planta no ve mermada su
201 capacidad defensiva ante la privación de luz y la consecuente inanición de carbono.

202 Se corrobora, como ya se había demostrado en trabajos anteriores, que el insecto se
203 alimenta más en condiciones de oscuridad que en luz.

204 Las procedencias incluidas en el estudio difieren en la susceptibilidad al daño por el
205 insecto, que se alimentó con más intensidad en las plantas de origen Marroquí.

206

207 7. Agradecimientos

208

209 Este trabajo se ha realizado con fondos de los proyecto de investigación AGL2012-
210 40151-C03-01 (FENOPIN) y AGL2015-68274-C3-2-R (FUTURPIN), ambos financiados por el
211 Ministerio de Economía y Competitividad y cofinanciados con fondos FEADER. XLG disfrutó de
212 una ayuda FPI del Ministerio de Economía y Competitividad y ESV de una ayuda FPU del
213 Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Los autores agradecen la ayuda prestada en el
214 procesado y análisis de muestras por Helena Pazó, Silvana Poceiro, Nuria Fernández y Roi
215 Martínez.

216

217
218 **8. Bibliografía**

- 219
220 ARIMURA, G., KÖPKE, S., KUNERT, M., VOLTE, V., DAVID, A., BRAND, P., BOLAND, W.
221 2008. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves: IV. Diurnal and
222 nocturnal damage differentially initiate plant volatile emission. *Plant Physiol* 146: 965-
223 973.
- 224
225 DANIELLE, G., WASSIM CHEHAB, E., MIN-VENDITTI, A., BRAAM, J., COVINGTON, M.F. 2012.
226 *Arabidopsis* synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior.
227 *PNAS* 109: 4674-4677.
- 228
229 FEDDERWITZ, F.; BJORKLUND, N.; NINKOVIC, V.; NORLANDER, G. 2014. Diel behavior and
230 time budget of the adult pine weevil *Hylobius abietis*. *Physiol Entomol* 39: 103-110.
- 231
232 HANSEN, J. AND MOLLER, I. 1975. Percolation of starch and soluble carbohydrates from
233 plant tissue for quantitative determination with anthrone. *Anal. Biochem* 68: 87-94.
- 234
235 KIM, S.G., YON, F., GAQUEREL, E., GULATI, J., BALDWIN I.T. 2011. Tissue specific diurnal
236 rhythms of metabolites and their regulation during herbivore attack in a native tobacco
237 *Nicotiana attenuata*. *PLoS ONE* 6(10): e26214.
- 238
239 LÓPEZ-GOLDAR, X.; SAMPEDRO, L.; ZAS, R. 2016. Carbon starvation by light deprivation
240 does not constrain the ability of young pines to produce induced chemical defenses in
241 response to a bark-chewing herbivore. *EEB* 130: 141-150.
- 242
243 MOREIRA, X., SAMPEDRO, L., ZAS, R. 2009. Defensive responses of *Pinus pinaster*
244 seedlings to exogenous application of methyl jasmonate: concentration and systemic
245 response. *EEB* 67: 94-100.
- 246
247 SAMPEDRO, L.; MOREIRA, X.; ZAS, R. 2011. Costs of constitutive and herbivore-induced
248 chemical defenses in pine trees emerge only under low nutrient availability. *J. Ecol* 99:
249 818-827.
- 250
251 SCOTT, T.M. & KING, C.J. 1974. The large pine weevil and black pine beetles. *Forestry*
252 *Commission Leaflet* 58. London, HMSO.
- 253
254 SHIOJIRI, K.; OZAWA, R.; TAKABAYASH, J. 2006. Plant volatiles rather than light,
255 determine the nocturnal behavior of a caterpillar. *PLoS Biol* 4(6): e164.
- 256
257 ZAS ARREGUI, R.; SAMPEDRO, L. 2015. Resistencia de los pinos a plagas y
258 enfermedades: nuevas oportunidades de control fitosanitario. *Cuadernos de la Sociedad*
259 *Española de Ciencias Forestales* 39: 259-273.
- 260