



8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

Cataluña | Catalunya - 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022

ISBN 978-84-941695-6-4

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



Nuevos estimulantes alternativos al ácido sulfúrico en la práctica resinera

LÓPEZ RODRÍGUEZ, R.¹, RODRÍGUEZ GARCÍA, A.^{1,2}, MICHAVILA PUENTE-VILLEGAS, S. ^{1,3}, RUBIO PEREZ, F.¹, RODRÍGUEZ DOMÍNGUEZ, A.¹ y GIL SÁNCHEZ, L.¹

¹ Departamento de Sistemas y Recursos Naturales. Universidad Politécnica de Madrid.

² Fundación Centro de Servicios y Promoción Forestal y de su Industria de Castilla y León.

³ Departamento de Genética Molecular de Plantas. Centro Nacional de Biotecnología. CSIC.

Resumen

El uso de estimulantes en la práctica resinera es clave para prolongar el flujo de resina e incrementar la producción. En España, el estimulante más utilizado es una pasta compuesta por ácido sulfúrico, como principio activo, y escayola. El uso de ácido sulfúrico es controvertido por tres razones: seguridad en el trabajo, corrosión y daño a los árboles y porque deja un residuo en la resina que es problemático para la industria química. En este trabajo testamos estimulantes alternativos basados en ethrel, ácido salicílico y ácido cítrico y los comparamos con la pasta tradicional basada en ácido sulfúrico y la pasta tradicional brasileña. Utilizamos como controles árboles sin resinar y árboles resinados sin estimulante. Nuestro objetivo es evaluar el efecto en la producción de resina, el crecimiento y el estado fisiológico del árbol.

La producción de resina fue ligeramente superior en los pinos estimulados con ácido cítrico, sin bien el ethrel y el ácido salicílico mostraron producciones similares a los de la pasta tradicional por lo que podrían ser buenos candidatos para sustituirla. Todos los estimulantes utilizados tuvieron un efecto negativo en el crecimiento, pero no en el estado hídrico de la planta ni en su conductancia estomática.

Palabras clave

Pinus pinsaster, resinación, producción de resina, pastas estimulantes, ácido sulfúrico, ácido salicílico, Ethrel, ácido cítrico.

1. Introducción

La resina es una mezcla compleja de monoterpenos, diterpenos y sesquiterpenos, que se produce en el interior de las células epiteliales que rodean los canales resiníferos y se almacena en el lumen de los mismos y constituye una de las principales líneas de defensa de las coníferas en respuesta a perturbaciones abióticas o bióticas. Cuando se produce un daño mecánico, la resina contenida en el interior de los canales se libera, solidificándose en contacto con el aire al evaporarse los terpenos más volátiles, incrementándose así la concentración de los de mayor peso molecular (diterpenos y ácidos resínicos), que forman una barrera física y química frente a los agentes externos (TRAPP & CROTEAU, 2001).

La extracción de resina por parte del hombre es una práctica antigua que data de la prehistoria, aunque no es hasta principios del siglo XVIII cuando se industrializa el proceso. Durante el primer tercio del siglo XX, la necesidad de productos derivados de la resina aumentó considerablemente debido a su importancia como materia prima en la fabricación de material bélico. Países como Alemania y Rusia impulsaron líneas de investigación enfocadas al desarrollo de estimulantes químicos para incrementar el flujo de resina y evitar su cristalización. Investigaciones a las que poco después se uniría Estados Unidos (NÁJERA Y ANGULO & RIFÉ LAMPRECHT, 1951). Se formularon mezclas de ácidos fuertes, algunas bases y sales que aplicadas a una herida (pica) recién efectuada incrementaban en gran medida la cantidad de miera segregada por el árbol. Los resultados fueron tan prometedores que hasta desarrolló un método nuevo de resinación, pica

de corteza, mucho menos invasivo y que requería menos esfuerzo físico por parte del resinero, que ha llegado hasta nuestros días.

En España, la adopción de esta metodología supuso un proceso largo y complejo que terminó a finales de los años 60, coincidiendo con los años de máximo esplendor del sector, debido, entre otras razones, a la reticencia de los resineros a abandonar el método tradicional, sistema Hugues, frente a la pica de corteza (BERLANGA SANTAMARÍA, 1999; NÁJERA Y ANGULO, 1961). Los primeros estimulantes que se utilizaron tenían como base ácido sulfúrico, que se aplicaba de forma líquida cada 6-7 días. Para solventar parte de los problemas de seguridad para el resinero que conllevaba trabajar con ácido sulfúrico líquido, surgieron las primeras pastas sólidas, mezclando el ácido sulfúrico con caolinita ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) y cloruro de calcio (CaCl_2) (SOLÍS & ZAMORANO, 1974). Se consigue además así alargar el periodo entre picas hasta los 14 días. En la actualidad la caolinita y el cloruro cálcico han sido sustituidos por el yeso, para evitar los vapores tóxicos que emitían estos dos compuestos en exposiciones prolongadas. Esta pasta es la que todavía se utiliza mayoritariamente en España y comúnmente se conoce como pasta tradicional. Sin embargo, el uso de ácido sulfúrico en el monte es controvertido debido a tres razones principalmente: i) la ya citada de seguridad para el resinero, porque se trata de un ácido fuertemente corrosivo capaz de quemar la piel y causar problemas pulmonares si se inhala, ii) dañino para el árbol, quemando grandes áreas de xilema, afectando a su fisiología y devaluando el valor de la madera, iii) residuo no deseado para la industria química de transformación. Es por ello que en la última década se viene trabajando en el desarrollo de nuevas pastas estimulantes alternativas.

Las pastas estimulantes contienen mayoritariamente un compuesto ácido que funciona estimulando el flujo y reduciendo la cristalización y un material portador para proporcionar adhesión sobre la herida. A nivel anatómico, el ácido actúa reduciendo la turgencia de las células epiteliales del canal resinífero, que aumenta su tamaño, liberándose la resina más fácilmente. La resina también fluye mejor porque sus ácidos no cristalizan. Además, el ácido induce la síntesis de proteínas de defensa frente a patógenos y a consecuencia de su capacidad oxidativa, al interaccionar con el tejido vegetal se terminan generando especies reactivas de oxígeno, lo que conlleva una mayor extensión del daño y la consiguiente prolongación del flujo de resina (MCREYNOLDS & KOSSUTH, 1984; RODRIGUES-CORRÊA et al., 2012; SILVERMAN et al., 2005). Las formulaciones más nuevas, y cuya utilización se ha extendido ampliamente por la Península Ibérica en los últimos años, incluyen Ethrel (también conocido como CEPA, ácido 2-cloroetilfosfónico), un precursor de etileno que estimula la producción y el flujo de resina. El etileno es una hormona gaseosa que entre otras cosas participa en el crecimiento radial del árbol, fomentando la formación de canales resiníferos y alterando los patrones anatómicos de las traqueidas (HUDGINS & FRANCESCHI, 2004a; YANG, 1969).

Aparte del Ethrel, en los últimos años se han probado otros principios activos de diversa índole tales como fitohormonas: auxinas (RODRIGUES et al., 2008); ácido salicílico (RODRIGUES & FETT-NETO, 2009) o su sal ácido benzoico (RODRIGUES-CORRÊA & FETT-NETO, 2013) y jasmonatos (DE GEYTER et al., 2012; HUDGINS et al., 2004; HUDGINS & FRANCESCHI, 2004b; JUNKES et al., 2019a); o adyuvantes como hierro, potasio o cobre (RODRIGUES-CORRÊA & FETT-NETO, 2013).

Pinus pinaster Ait. es una de las especies arbóreas que mayor extensión ocupa en España y la única que se resina en la actualidad. Tras el auge de la industria de la resina en los años 60 se inició un acusado declive marcado por la competencia con países como China, Indonesia o Brasil. Si a esto le sumamos la poca valoración social, el abandono rural, la jubilación de los resineros y el bajo precio en el mercado del producto, se llegó casi al total abandono de la actividad a finales de los 90 (MUÑOZ, 2006; PICARDO & PINILLOS, 2013). En los últimos 20 años, sin embargo, la producción de resina prácticamente se ha triplicado en relación con los valores de 1999 (MITECO, 2021). El impulso de iniciativas europeas para valorizar los productos forestales no maderables, la

búsqueda de alternativas laborales en el mundo rural y la necesidad de sustituir productos derivados del petróleo han supuesto el resurgir del sector.

2. Objetivos

El objetivo de este estudio fue la selección precoz de nuevos estimulantes, alternativos al ácido sulfúrico, para la producción de resina en *Pinus pinaster*. Para ello se testaron durante dos años consecutivos pastas estimulantes con distintos principios activos en plántulas de *Pinus pinaster* para comparar sus efectos en la producción de resina y en el estado fisiológico de la planta. Las pastas de las que se obtengan resultados prometedores, tanto en producción como en afección al árbol, servirán como pastas candidatas para ensayar en pinos adultos.

3. Metodología

Material vegetal y tratamientos

Se realizaron dos experimentos en veranos consecutivos, 2019 y 2020, con plántulas de *Pinus pinaster* de cinco savias el primer año y de tres savias el segundo en las instalaciones de la ETSI de Montes, Forestal y del Medio Natural de la UPM en Madrid. Las plántulas se cultivaron en macetas de 3 l con una mezcla de sustrato de turba y perlita (70:30, v:v) y se fertilizaron con un fertilizante de liberación lenta (Osmocote Plus Standard, 15:9:12 (N:P:K)) una vez al año. Las plántulas se mantuvieron a capacidad de campo durante todo el experimento.

El primer año se probaron cuatro pastas estimulantes (los porcentajes se corresponden con el porcentaje en masa): tradicional (35.5% de agua destilada, 34.2% de ácido sulfúrico comercial (pureza del 98%) y 30.3% de sulfato de calcio hemihidratado o yeso); ethrel (60.5% de agua destilada, 13.8% de ácido sulfúrico (pureza del 98%), 10,8% de cáscara de arroz, 5,5% de sílice HDK-N20, 3.9% de vaselina, 2.8% de Ethrel, 1.7% de Arquad 2HT-75 (cloruro de bi(alquil sebo hidrogenado) dimetil amonio), 1% de Nonil fenol 9 Molar); ácido salicílico (50% de agua destilada, 25.0% de ácido sulfúrico comercial (pureza del 98%), 19% de salvado de trigo, 5% de propilenglicol y 1% de ácido salicílico) y ácido cítrico (40% de ácido cítrico, 33.5% de agua destilada, 26% de bentonita de calcio y 0,5% de propilenglicol). El segundo año, además de los cuatro estimulantes anteriores, se probó la pasta brasileña pretta (50.4% ácido sulfúrico comercial (pureza del 98%), 33.4% de agua destilada y 16.2% cascara de arroz triturada). Al mismo tiempo, se incluyeron dos tratamientos control, control sin herida (sin realización de pica) y control con herida (realizando las mismas picas pero sin aplicar la pasta estimulante).

Cada tratamiento se aplicó a 18-19 plántulas, siendo el total de pinos utilizados de 114 en el primer ensayo y de 120 en el segundo. Los ejemplares se distribuyeron en filas paralelas en dirección norte-sur. En cada fila se alternó el orden de los tratamientos para minimizar las diferencias ambientales entre tratamientos.

El primer año el experimento duró un mes. A mediados de agosto de 2019 se realizó una herida circular (pica) a 10 cm sobre el suelo con un sacabocados de 1 cm de diámetro quitando corteza, floema y cambium. Inmediatamente después, se rellenó la herida con pasta estimulante en todos los tratamientos excepto el control (Fig. 1). Se utilizaron microtubos de polipropileno de 2 ml para almacenar la resina extraída, previamente pesados, y parafilm para su sellado. A los tubos se les realizó un bisel con el objetivo de garantizar la correcta adhesión al tronco (Fig. 1). Los tubos se recogieron a mediados de septiembre. El segundo año el experimento duró tres meses, julio, agosto y septiembre, realizándose tres picas en cada árbol, una cada tres semanas. Para minimizar el efecto de la pica anterior, las heridas se realizaron con una distancia de 5 cm entre sí y siguiendo un

patrón espiralado en el tronco (Fig. 1). Los tres tubos de cada árbol se recogieron a finales de septiembre.

Crecimiento y mediciones fisiológicas

En el primer experimento solo se midió el diámetro basal de las plántulas al inicio del experimento. En el segundo, en cambio, se realizaron mediciones de altura total y diámetro basal al principio y al final del experimento para evaluar el efecto de los tratamientos en el crecimiento absoluto y el crecimiento relativo a lo largo de la campaña de resinación.

El estado hídrico de la planta y su capacidad fotosintética se evaluaron midiendo el potencial hídrico al mediodía (Ψ) y la conductancia estomática (gs), respectivamente, antes de la realización de cada pica en el segundo experimento y al finalizar el mismo en los dos experimentos. Las mediciones se realizaron en 6 plántulas por tratamiento. Para las mediciones de potencial hídrico se recogieron acículas de la parte superior de la copa, se sellaron en bolsas de plástico y se guardaron en una nevera a 4°C hasta su medición en laboratorio con una cámara de presión (modelo 1000, PMS Instrument Company) durante las dos horas siguientes a su recogida. La conductancia estomática se midió con un porómetro (modelo SC-1, Decagon Devices Inc.) en tres braquiblastos soleados de la parte superior de la copa.

Producción de resina

Al final de los dos experimentos, se recogieron los tubos y se pesaron con el parafilm, ya que parte de la resina quedó adherida al mismo. La resina extraída se calculó sustrayendo al peso total el peso del tubo y del parafilm (resina extraída, RE). A continuación, se realizó la extracción de resina interna del tronco (RI), modificando el protocolo de Moreira et al., (2009). Para ello, con la ayuda de unas tijeras de podar, se cortó la parte del tronco en la que se encuentran las picas más 5 cm por debajo de la primera pica y 5 cm por encima de la última. Este segmento fue de unos 20cm aproximadamente en el segundo ensayo y de 10 cm en el primer ensayo. Cada segmento se dividió a continuación en rodajas de aproximadamente 5 mm de espesor y se guardó en tubos previamente etiquetados y pesados en congelador a -80°C hasta su análisis. Para extraer la resina interna, una vez descongelada la muestra, se cubrieron los discos con hexano, se introdujeron los tubos en un baño de ultrasonidos a 20°C durante 15 min y se dejaron reposar durante 24 horas a temperatura ambiente bajo la campana de gases. El extracto se filtró a través de un filtro GFF. Se repitió toda la etapa de extracción y se evaporó el disolvente hasta sequedad bajo la campana de gases a temperatura ambiente durante aproximadamente una semana. El precipitado resinoso resultante se pesó con una balanza de precisión (RI). El total de resina extraída (RT) se calculó como la suma de RE y RI.

Análisis estadístico

El efecto de la herida y de los estimulantes tanto en la producción de resina como en las mediciones fisiológicas y en el crecimiento relativo de las plantas entre el inicio y el final del segundo experimento se realizó con un ANOVA de un factor, tras comprobar la normalidad y homocedasticidad de los datos. En el caso de la producción de resina, se utilizó el diámetro basal de las plántulas al inicio del experimento como covariante. Para evaluar el efecto del tratamiento en los parámetros fisiológicos del segundo ensayo, se realizó un ANOVA de medidas repetidas. Cuando se encontraron diferencias significativas, las medias se compararon con un test LSD de Fisher. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre RE, RI, RT y las variables fisiológicas y de crecimiento. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico STATISTICA 8.0 (Statsoft Inc.).

4. Resultados

Crecimiento y parámetros fisiológicos

El efecto de la herida y las pastas estimulantes en el crecimiento a lo largo de la campaña de resinación se evaluó solo en 2020. La altura media de las plántulas al iniciar el ensayo fue de $105 \pm 3,5$ cm y su diámetro medio de $13 \pm 0,8$ mm, no encontrando diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, al finalizar el ensayo, se observó un mayor crecimiento tanto absoluto como relativo en altura en las plantas control, que en el resto de tratamientos. Las plantas que no se habían resinado crecieron de media $7,8 \pm 1,1$ cm, mientras que, en el resto de tratamientos, el crecimiento en altura medio fue de $3,7 \pm 1,2$ cm. En cuanto al crecimiento en diámetro, las plántulas estimuladas con Ethrel y ácido cítrico crecieron en diámetro casi el doble ($3 \pm 0,3$ mm) que las control y las estimuladas con ácido sulfúrico y la pasta pretta ($1,7 \pm 0,3$ mm).

En el experimento realizado en 2019 solo con una pica, no se observó ningún efecto significativo de los tratamientos sobre la conductancia estomática (gs) y sólo un efecto marginal ($P<0.10$) en el potencial hídrico (Ψ). La gs varió entre $234 \text{ mmol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ en el tratamiento salicílico y $287 \text{ mmol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ en el tratamiento con ethrel. El Ψ osciló entre -0,8 MPa en el tratamiento salicílico y -1,4 MPa en el tratamiento con ácido sulfúrico. En 2020 observamos un aumento de la gs entre la medición inicial $196 \pm 12 \text{ mmol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ y la medición tras la primera pica $341 \pm 12 \text{ mmol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, momento en el que se alcanza el valor máximo de gs (Fig. 2). Tras la segunda y la tercera pica, la gs disminuye progresivamente, hasta un valor de $253 \pm 10 \text{ mmol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ antes de la cosecha final. Al igual que en el experimento de 2019 no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Solo se encontraron diferencias en Ψ entre las plantas control y el resto de tratamientos tras la primera pica. Los valores más bajos de este parámetro de midieron tras la primera y la tercera pica, alcanzándose valores de $-1,3 \pm 0,1$ MPa (Fig. 2).

Producción de resina

En ambos experimentos encontramos diferencias significativas entre la producción total de resina (RT) de las plantas control (sin estimulantes-sin heridas) y las plantas heridas o estimuladas (Fig. 3). El primer año, las plantas heridas produjeron tres veces más resina que las plantas control (un promedio de 556 mg en plantas heridas en comparación con 170 mg de resina en las control). El segundo año, con tres picas durante la campaña, las plantas control produjeron 162 mg de resina frente a los 575 mg de las plantas heridas sin estimulante y los 1.449 mg de las estimuladas con Ethrel (Fig. 3).

Si bien el primer año, las plántulas estimuladas con ácido cítrico y ácido salicílico fueron las más productivas, en el segundo experimento se obtuvieron mayores producciones de resina con Ethrel y ácido salicílico (Fig. 3). Las diferencias en producción se debieron mayoritariamente a la resina extraída (RE) en el primer experimento, pero a la resina interna que permanecía en la planta (RI) en el segundo (Fig. 3). Si bien la producción de resina interna casi fue cinco veces mayor en 2020 que en 2019, en parte debido a la mayor longitud del tallo utilizada el segundo año para la extracción, la resina extraída fue significativamente mayor el primer año, a pesar de haberse realizado solo una pica (Fig. 3). En 2019 las plántulas estimuladas con ácido cítrico y ácido salicílico produjeron un 15% más de RT y un 19% más de RE que las estimuladas con ácido sulfúrico. Solo encontramos diferencias marginales ($p = 0,11$) entre tratamientos para RI, siendo las plántulas tratadas con Ethrel las que acumularon más resina interna (Fig. 3). En 2020 los tratamientos de Ethrel y salicílico no fueron diferentes del tratamiento con ácido sulfúrico, pero sí mostraron valores mayores de RT y RI que el tratamiento con ácido cítrico y los dos tratamientos control (Fig. 3).

En el segundo experimento observamos que la producción de resina aumenta ligeramente con el número de picas (Fig. 4). En la primera pica se obtuvieron las producciones de RE más bajas en todos los tratamientos, pero fue la única pica en la que encontramos diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el más productivo el cítrico y el control con herida el menos productivo (Fig. 4). Señalar que al recoger los tubos con la RE al final del experimento observamos que en muchas plántulas la primera y la segunda herida habían cicatrizado, impidiendo la salida de más resina (Fig. 5).

Por último, encontramos que el diámetro basal de las plántulas afectó significativamente a la producción de resina: árboles con mayor diámetro basal produjeron mayor cantidad tanto de RT como de RI en ambos experimentos (ver Michavila Puente-Villegas et al., 2021, material suplementario).

5. Discusión

El resultado de nuestros dos ensayos de microrresinación parece indicar que el uso de nuevos estimulantes en la práctica resinera, alternativos al ácido sulfúrico, parece factible. Las plántulas estimuladas con ácido salicílico fueron más productivas que las estimuladas con pasta tradicional en ambos experimentos. El Ethrel parece ser también una alternativa prometedora cuando se alarga la duración del ensayo. Si bien la acción de herir al árbol supone a una disminución del crecimiento en altura de las plántulas, Ethrel y ácido cítrico incrementan el crecimiento diametral. En las plántulas resinadas con los estimulantes con más contenido de ácido sulfúrico observamos áreas de quemado longitudinales extensas (Fig. 5), lo que pensamos que a largo plazo podría afectar no solo a la calidad de la madera, sino al estado fisiológico del individuo.

Las plántulas que más crecieron durante el segundo ensayo fueron las del tratamiento control sin herida, indicando que las sucesivas picas provocaron una ralentización del crecimiento en altura de la planta, viéndose el diámetro menos afectado por el efecto de la herida, pero sí por el estimulante utilizado. La pasta de Ethrel libera etileno al ponerse en contacto con el tejido. El etileno es una hormona gaseosa que estimula no solo la formación de canales resiníferos, como discutiremos más adelante, sino el crecimiento diametral (ABELES et al., 2012). Por el contrario, las plántulas estimuladas con las pastas con mayor proporción de ácido sulfúrico, tradicional y pasta pretta, mostraron un crecimiento menor en diámetro, evidenciando el efecto negativo del ácido en la fisiología del árbol. Los ácidos de pH muy bajo y con gran poder oxidativo, como el sulfúrico, aparte de suponer un riesgo en la salud de los trabajadores que los emplean, provocan daños en los tejidos del árbol que se manifiestan no solo en una necrosis del cambium, sino en un cambio de color de la madera expuesta al ácido (Fig. 5).

En estudios previos con *P. pinaster* se ha observado que herir repetidamente el fuste de árboles adultos disminuye la conductancia hidráulica del árbol, reduciendo la disponibilidad de agua para la transpiración, afectando por tanto la conductancia estomática (gs), sin afectar al potencial hídrico (ψ) (RIPULLONE et al., 2007). En casos extremos de daño, como por ejemplo cuando se anilla por completo el tallo, también se ha observado una fuerte disminución de gs incluso cuando el anillado resultó en un incremento de la conductancia hidráulica (López et al., 2015). Sin embargo, en ninguno de nuestros experimentos se apreciaron diferencias entre tratamientos ni en la gs ni en ψ , a pesar de las diferencias observadas entre fechas. Las variaciones de estas dos variables a lo largo del periodo de estudio podrían ser debidas a las distintas condiciones ambientales, tanto de temperatura como de déficit de presión de vapor a lo largo del verano, y a la distinta ontogenia de las hojas. Aparentemente ni infligir una herida del tamaño de las picas realizadas, ni el uso de estos estimulantes durante 1-3 meses afectaron al estado hídrico de las plantas, bien por el pequeño daño en el tallo y la menor duración de nuestros experimentos, bien por la homeostasis del ψ , comúnmente encontrada en especies isohídricas típicas como los pinos (RIPULLONE et al., 2007).

La producción de resina se vio afectada en ambos experimentos no solo por el estimulante utilizado, sino también por el diámetro basal del árbol. Esta relación entre tamaño y producción se ha constatado en ensayos de campo con árboles adultos. Árboles más vigorosos, con copas más densas y mayores crecimientos de área basimétrica producen en general más resina (MCDOWELL et al., 2007; RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2014). Estos árboles pueden movilizar más fácilmente sus reservas de carbono para fortalecer su sistema defensivo con la formación de mayor número de canales resiníferos o sintetizando más resina en los ya existentes (KANE & KOLB, 2010; LOMBARDERO et al., 2000; RUEL et al., 1998). En estudios anatómicos del xilema a lo largo de la vida de árboles adultos, se ha visto que el vigor afecta de manera determinante al número de canales resiníferos que forma de manera constitutiva el árbol, de tal manera que en los años de mayores crecimientos se producen más canales resiníferos (LÓPEZ et al., 2021).

En el experimento efectuado en 2020 observamos, como sucede en la resinación en campo de una masa de árboles adultos, una tendencia ascendente de la resina extraída (RE) con el tiempo (RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2015), si bien la variabilidad entre árboles fue muy alta (Fig. 4). La producción de la primera pica se asocia a la liberación de la resina contenida en los canales resiníferos ya existentes, debido principalmente a la acción combinada de la herida y del ácido. En las siguientes picas, y como consecuencia del efecto combinado de la herida y los estimulantes, se induce, a través de una compleja red de vías celulares de señalización reguladas por fitohormonas como el etileno, el jasmonato o el ácido salicílico (ABELES et al., 2012; DE GEYTER et al., 2012; PER et al., 2018; YAMAMOTO et al., 2020) y a la generación de especies reactivas de oxígeno (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011), un incremento en la formación de canales resiníferos traumáticos y la estimulación de la producción de resina en los ya existentes (RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2015). Si bien creemos que la mayor parte de esta resina permaneció en el interior de la plántula (RI) en nuestro experimento (Fig. 3). A pesar de que los viales de las dos primeras picas estuvieron en la planta más tiempo, al recogerlos para pesar la RE, observamos que muchas de las heridas habían cicatrizado completamente, impidiéndose así la salida de más resina (Fig. 5). El hecho de que en el segundo experimento utilizáramos plántulas más jóvenes, de tres savias frente a las cinco savias del primer experimento, con un metabolismo más activo y tal vez mejor capacidad de cicatrización (GERSHENZON, 1994) y menor presión en los canales resiníferos (RISSANEN et al., 2021) junto con el inicio del segundo experimento casi un mes y medio antes que el primero, cuando los árboles estaban aún creciendo podría explicar en parte la menor cantidad de RE en el segundo experimento (ZAS et al., 2020a), a pesar del mayor número de picas, pero la mayor producción de resina total (RT).

Las plántulas estimuladas con ácido salicílico estuvieron en ambos experimentos entre las más productivas (Fig. 3), bien por una mayor cantidad de RE en el primer experimento o por un valor mayor de RI en el segundo. En el caso del ácido cítrico, observamos que fue el estimulante que permitió extraer la mayor cantidad de resina en ambos experimentos, pero la RI no difirió de las plántulas heridas sin estimulante. Una respuesta opuesta la encontramos en las plántulas estimuladas con Ethrel, que favoreció la acumulación de RI seguramente, como sucede con el ácido salicílico, por su papel como estimulador en la formación de canales y en la activación del sistema defensivo de la planta (ABELES et al., 2012; HUDGINS & FRANCESCHI, 2004b). El Ethrel libera etileno cuando se pone en contacto con tejidos con pH mayor de 3,5 (FUSATTO, 2006). El etileno estimula la síntesis de resina (RODRIGUES-CORRÊA et al., 2012) y la formación de canales (PEROTTI et al., 2015). Si bien parece que, con la formulación actual de la pasta, no somos capaces de extraerla adecuadamente.

Aunque nuestros resultados parecen indicar que las técnicas de evaluación temprana pueden ser útiles a la hora de testar distintos compuestos de manera rápida y mucho más económica, la escasa producción de resina, junto con nuestros propios resultados y los de otros autores

comparando estimulantes en planta pequeña y planta adulta (JUNKES et al., 2019b) nos obligan a ser cautos. Los árboles jóvenes tienen un metabolismo más activo e invierten más reservas en crecimiento y cicatrización que en síntesis de resina (GERSHENZON, 1994). Además, la red interconectada de canales resiníferos axiales y radiales en plántulas es mucho más simple que en árboles adultos por lo que los estimulantes podrían tener mucho más efecto en estos últimos (JUNKES et al., 2019b).

6. Conclusiones

El uso de nuevos estimulantes de resinación parece ser factible. Si bien parece que la eliminación en su totalidad del ácido sulfúrico en la formulación de las pastas no parece ser del todo posible, al menos con los estimulantes que hemos probado, sí lo es su reducción, como demuestran las producciones obtenidas con la pasta con ácido salicílico o la de Ethrel. Además, estos resultados son consistentes con los de ensayos recientes, como los realizados en masas de *Pinus merkusii* (LUKMANDARU et al., 2020), que mostraron resultados prometedores en la producción de resina al aplicar formulaciones con una concentración muy baja de ácido sulfúrico (3.3%) y Ethrel (4.1 - 8.3%), mejores incluso que para mayores concentraciones de ácido sulfúrico e independientemente de la presencia o ausencia de Ethrel (ABELES et al., 2012; PER et al., 2018; RODRIGUES et al., 2008).

Además, el ácido sulfúrico, a consecuencia de su poder oxidante, su fuerte acidez y la elevada concentración a la que se emplea en la pasta tradicional y la pretta, provoca, tras una exposición prolongada en contacto con los tejidos vegetales, un “quemado” químico que se manifiesta en la madera, con cambios de color y malformaciones de las traqueidas. Son por tanto los principios activos constituidos por hormonas vegetales e implicados en los mecanismos de defensa de la planta, ácido salicílico y Ethrel, los que tienen mayor potencial de cara al desarrollo e innovación de nuevos estimulantes (ABELES et al., 2012; PER et al., 2018; RODRIGUES & FETT-NETO, 2009). Por un lado, estimulan la formación de nuevos canales resiníferos, y por extensión, la producción de resina. Por otro lado, mediante la activación de los mecanismos de defensa de la planta, estimulan la síntesis de resina en los canales ya existentes.

Otro factor de gran interés sería el de mejorar la capacidad de extraer la resina de la planta, bien mediante la aplicación de nuevas técnicas de resinación o bien mediante la mejora e innovación de las ya existentes.

Finalmente, un campo de estudio prometedor, pero que ha de acometerse con cautela, es el de establecer modelos predictivos de la capacidad productiva de los individuos y procedencias bajo el uso de ciertos estimulantes a partir de su evaluación mediante la aplicación de técnicas de microrresinación, ya sea mediante su estudio en plántula (MICHAVILA PUENTE-VILLEGAS et al., 2021) o en masas adultas (ZAS et al., 2020b)

7. Agradecimientos

Nos gustaría agradecer a David León y Carlos Guadaño del Centro de Recursos Genéticos de Puerta de Hierro y a Juan Luis Peñuelas del serranillo por proporcionarnos las plantas. También agradecer a David Medel y Jorge Pallarés su ayuda con el cuidado y establecimiento de los ensayos. Este proyecto ha sido financiado por los proyectos europeos Interreg Sudoe SustForest Plus (SOE2/P5/E0598) y GREENRESIN del EIT-Climate KIC (190706).

8. Bibliografía

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, M.; 2012. Ethylene in Plant Biol,: Second Edition. Academic press. 1- 414. San Diego.
- BERLANGA SANTAMARÍA, A.; 1999. La industria resinera en Guadalajara. Un siglo de historia (1889-1989). Excma Diputación Provincial de Guadalajara. 21-37. Guadalajara.
- DE GEYTER, N.; GHOLAMI, A.; GOORMACHTIG, S.; GOOSSENS, A.; 2012. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci*, 17: 349–359.
- FUSATTO, A.; 2006. Pastas estimulantes em sistemas de resinagem de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. Dissertação de Mestrado. 108-210. Piracicaba.
- GERSHENZON, J.; 1994. Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *J Chem Ecol*, 20: 1281–1328.
- HUDGINS, J. W.; CHRISTIANSEN, E.; FRANCESCHI, V. R.; 2004. Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. *Tree Physiol*, 24: 251–264.
- HUDGINS, J. W.; FRANCESCHI, V. R.; 2004a. Methyl jasmonate-induced ethylene production is responsible for conifer phloem defense responses and reprogramming of stem cambial zone for traumatic resin duct formation. *Plant Physiol* 135: 2134–2149.
- HUDGINS, J. W.; FRANCESCHI, V. R.; 2004b. Methyl Jasmonate-Induced Ethylene Production Is Responsible for Conifer Phloem Defense Responses and Reprogramming of Stem Cambial Zone for Traumatic Resin Duct Formation. *Plant Physiol* 135: 2134–2149.
- JUNKES, C. F. de O.; DUZ, J. V. V.; KERBER, M. R.; WIECZOREK, J.; GALVAN, J. L.; FETT, J. P.; FETT-NETO, A. G.; 2019a. Resinosis of young slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) as a tool for resin stimulant paste development and high yield individual selection. *Ind Crop Prod*, 135: 179–187
- JUNKES, C. F. de O.; DUZ, J. V. V.; KERBER, M. R.; WIECZOREK, J.; GALVAN, J. L.; FETT, J. P.; FETT-NETO, A. G.; 2019b. Resinosis of young slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) as a tool for resin stimulant paste development and high yield individual selection. *Ind Crop Prod*, 135: 179–187.
- KANE, J. M.; KOLB, T. E.; 2010. Importance of resin ducts in reducing ponderosa pine mortality from bark beetle attack. *Oecol*, 164: 601–609.
- KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J.-C.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W.; 2011. Reactive oxygen species in plants: Their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust J Crop Sci*, 5: 709–725.

LOMBARDERO, M. J.; AYRES, M. P.; LORIO JR, P. L.; RUEL, J. J.; 2000. Environmental effects on constitutive and inducible resin defences of *Pinus taeda*. *Ecol Lett*, 3: 329–339.

LÓPEZ, R.; CANO, F. J.; RODRÍGUEZ-CALCERRADA, J.; SANGÜESA-BARREDA, G.; GAZOL, A.; CAMARERO, J. J.; ROZENBERG, P.; GIL, L.; 2021. Tree-ring density and carbon isotope composition are early-warning signals of drought-induced mortality in the drought tolerant Canary Island pine. *Agr Forest Meteorol*, 310: 108634.

LUKMANDARU, G.; AMRI, S.; SUNARTA, S.; LISTYANTO, T.; PUJIARTI, R.; WIDYORINI, R.; 2020. Oleoresin yield of *Pinus merkusii* trees from East Banyumas. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 449: 012024.

MCDOWELL, N. G.; ADAMS, H. D.; BAILEY, J. D.; KOLB, T. E.; 2007. The role of stand density on growth efficiency, leaf area index, and resin flow in southwestern ponderosa pine forests. *Can J Forest Res*, 37: 343–355.

MCREYNOLDS, R. D.; KOSSUTH, S. v; 1984. CEPA in Sulfuric Acid Paste Increases Oleoresin Yields¹. *Southern Journal of Applied Forestry* 8: 168–172.

MICHAVILA PUENTE-VILLEGAS, S.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; RUBIO, F.; GIL, L.; LÓPEZ, R.; 2021. Salicylic and citric acid as promising new stimulants for resin tapping in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *For Syst*, 29: eSC07

MITECO; 2021. Anuario de Estadística Forestal 2019. MITECO. 115-118. Madrid.

MOREIRA, X.; SAMPEDRO, L.; ZAS, R.; 2009. Defensive responses of *Pinus pinaster* seedlings to exogenous application of methyl jasmonate: Concentration effect and systemic response. *Environ Exp Bot*, 67: 94–100.

MUÑOZ, L. H.; 2006. El antiguo oficio de resinero. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General Técnica. 5-16. Madrid.

NÁJERA Y ANGULO, F.; 1961. Sistema de resinación de pica de corteza estimulado con ácido sulfurico: normas de aplicación. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias y Servicio de La Madera. 2-35. Madrid.

NÁJERA Y ANGULO, F.; RIFÉ LAMPRECHT, M. P.; 1951. Resinación con estimulantes químicos. Estudio general y experiencias realizadas en los pinares españoles. I. Ácido clorhídrico. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias y Servicio de La Madera. 7-38. Madrid.

PER, T. S.; KHAN, M. I. R.; ANJUM, N. A.; MASOOD, A.; HUSSAIN, S. J.; KHAN, N. A.; 2018. Jasmonates in plants under abiotic stresses: Crosstalk with other phytohormones matters. *Environ Exp Bot*, 145: 104–120.

PEROTTI, J. C.; DA SILVA RODRIGUES-CORRÊA, K. C.; FETT-NETO, A. G.; 2015. Control of resin production in *Araucaria angustifolia*, an ancient South American conifer. *Plant Biol*, 17: 852–859.

PICARDO, Á.; PINILLOS, F.; 2013. La resinación en España y en el mundo en 2013: Situación y perspectivas. II Simposio Internacional de Resinas Naturales. Centro de Publicaciones del MAGRAMA. 30-53. Madrid.

RIPULLONE, F.; GUERRIERI, M. R.; NOLE', A.; MAGNANI, F.; BORGHETTI, M.; 2007. Stomatal conductance and leaf water potential responses to hydraulic conductance variation in *Pinus pinaster* seedlings. *Trees* 21: 371–378.

RISSANEN, K.; HÖLTTÄ, T.; BÄCK, J.; RIGLING, A.; WERMELINGER, B.; GESSLER, A.; 2021. Drought effects on carbon allocation to resin defences and on resin dynamics in old-grown Scots pine. *Environ Exp Bot*, 185: 104410.

RODRIGUES, K. C. S.; AZEVEDO, P. C. N.; SOBREIRO, L. E.; PELISSARI, P.; FETT-NETO, A. G.; 2008. Oleoresin yield of *Pinus elliottii* plantations in a subtropical climate: Effect of tree diameter, wound shape and concentration of active adjuvants in resin stimulating paste. *Ind Crop Prod*, 27: 322–327.

RODRIGUES, K. C. S.; FETT-NETO, A. G.; 2009. Oleoresin yield of *Pinus elliottii* in a subtropical climate: Seasonal variation and effect of auxin and salicylic acid-based stimulant paste. *Ind Crop Prod*, 30: 316–320.

RODRIGUES-CORRÊA, K. C. da S.; DE LIMA, J. C.; FETT-NETO, A. G.; 2012. Pine oleoresin: tapping green chemicals, biofuels, food protection, and carbon sequestration from multipurpose trees. *Forest Ecol Manag*, 1: 81–93.

RODRIGUES-CORRÊA, K.; FETT-NETO, A.; 2013. Seasonality and chemical elicitation of defense oleoresin production in field-grown slash pine under subtropical climate. *Theor Exp Plant Phys*, 25: 56–61.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; LÓPEZ, R.; MARTÍN, J. A.; PINILLOS, F.; GIL, L.; 2014. Resin yield in *Pinus pinaster* is related to tree dendrometry, stand density and tapping-induced systemic changes in xylem anatomy. *Forest Ecol Manag*, 313: 47–54.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; MARTÍN, J. A.; LÓPEZ, R.; MUTKE, S.; PINILLOS, F.; GIL, L.; 2015. Influence of climate variables on resin yield and secretory structures in tapped *Pinus pinaster* Ait. in central Spain. *Agr Forest Meteorol*, 202: 83–93.

RUEL, J. J.; AYRES, M. P.; LORIO PETER L, Jr.; 1998. Loblolly pine responds to mechanical wounding with increased resin flow. *Can J Forest Res*, 28: 596–602.

SILVERMAN, F. P.; PETRACEK, P. D.; FLEDDERMAN, C. M.; JU, Z.; HEIMAN, D. F.; WARRIOR, P.; 2005. Salicylate Activity. 1. Protection of Plants from Paraquat Injury. *J Agr Food Chem*, 53: 9764–9768.

SOLÍS, W.; ZAMORANO, J. L.; 1974. Características y utilización de la «pasta IFIE» como estimulante de resinación. *Hoja técnica INIA*. 10-12. Madrid.

TRAPP, S.; CROTEAU, R.; 2001. DEFENSIVE RESIN BIOSYNTHESIS IN CONIFERS. *An Rev Plant Phys Plant Mol Biol*, 52: 689–724.

YAMAMOTO, F.; IWANAGA, F.; AL-BUSAIDI, A.; YAMANAKA, N.; 2020. Roles of ethylene, jasmonic acid, and salicylic acid and their interactions in frankincense resin production in *Boswellia sacra* Flueck. trees. *Scientific Reports* 10: 16760.

YANG, S.; 1969. Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. *Plant Physiol* 44: 1203.

ZAS, R.; QUIROGA, R.; TOUZA, R.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, C.; SAMPEDRO, L.; LEMA, M.; 2020a. Resin tapping potential of Atlantic maritime pine forests depends on tree age and timing of tapping. *Ind Crop Prod*, 157: 112940.

ZAS, R.; TOUZA, R.; SAMPEDRO, L.; LARIO, F. J.; BUSTINGORRI, G.; LEMA, M.; 2020b. Variation in resin flow among Maritime pine populations: relationship with growth potential and climatic responses. *Forest Ecol Manag*, 474: 118351.

Figuras



Figura 1. Detalle de la metodología para microrresinación (de izquierda a derecha y de arriba abajo) realización de la pica con sacabocados, detalle de la pica, aplicación pasta estimulante, pica con pasta, sellado con parafilm y realización de la tercera pica.

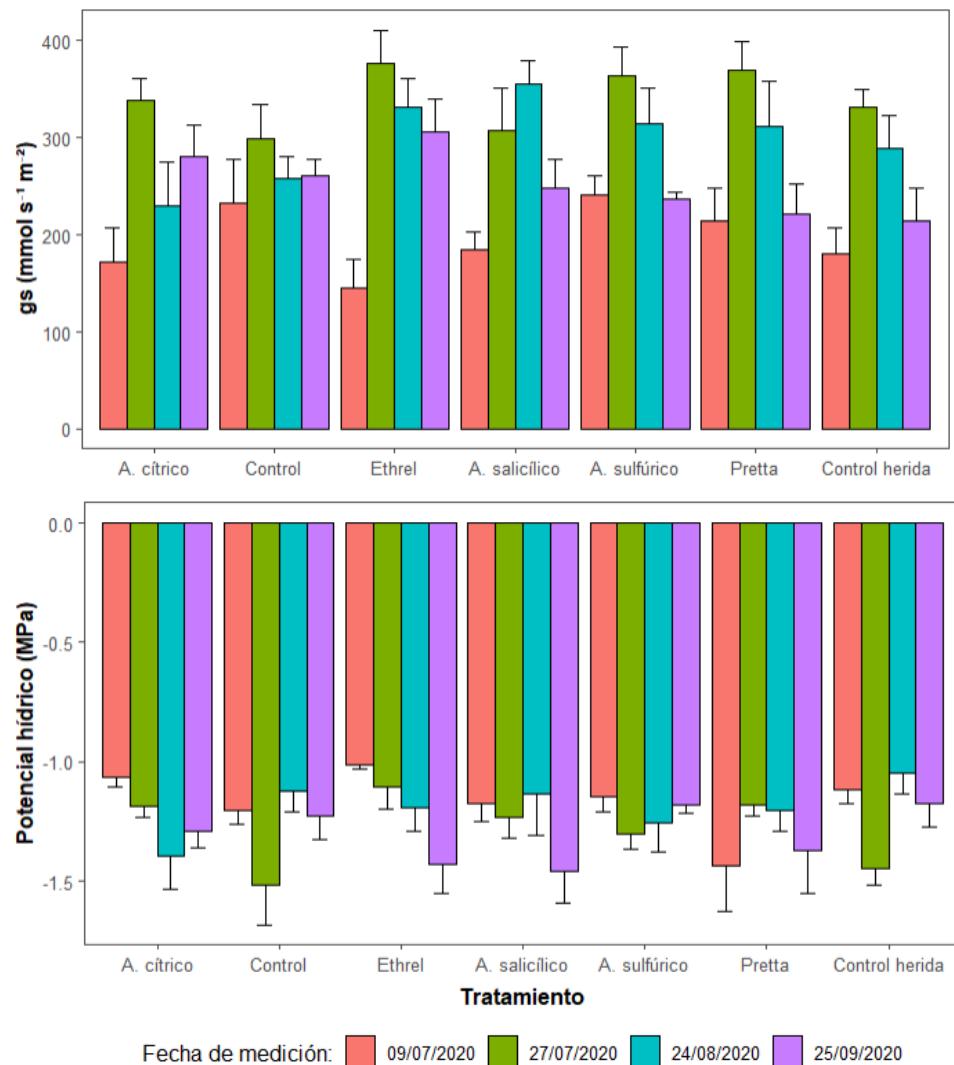


Figura 2. Conductancia estomática (arriba) y potencial hídrico (abajo) a lo largo del experimento de microrresinación realizado en 2020 con cinco pastas estimulantes y dos tratamientos control, uno sin herida y otro realizando la pica de resinación pero sin aplicación de estimulante.

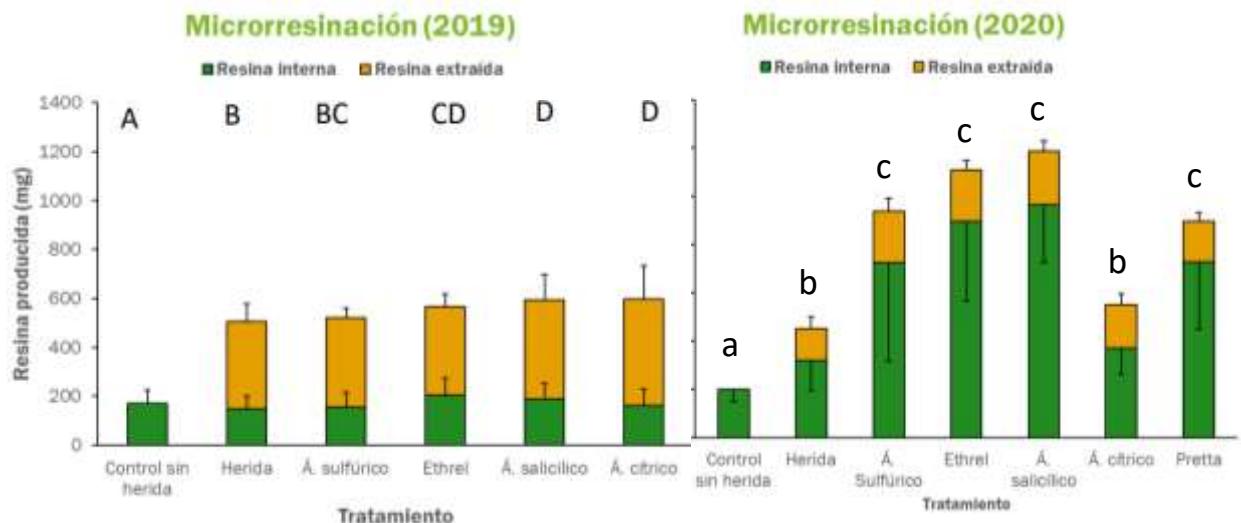


Figura 3. Producción de resina en los experimentos de microrresinación de 2019 y 2020. En verde la resina que permaneció en el interior de la planta, resina interna y en amarillo la resina extraída en los viales de resinación. Las letras mayúsculas se corresponden a diferencias en la producción de resina total. Las letras minúsculas se corresponden con diferencias en la resina interna.

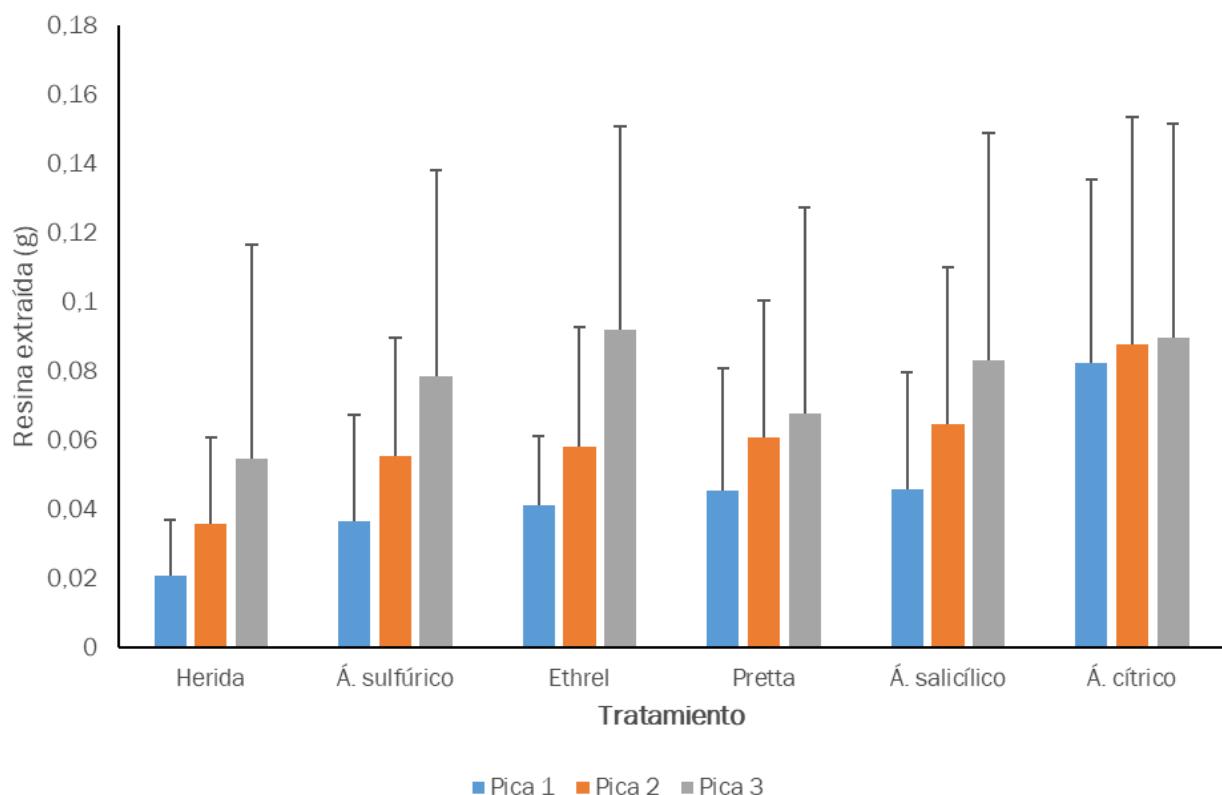


Figura 4. Resina extraída en cada una de las picas realizadas en el experimento de microrresinación del año 2020 con cinco pastas estimulantes y dos tratamientos control, uno sin herida y otro realizando la pica de resinación pero sin aplicación de estimulante.



Figura 5. Detalle de la herida de la primera pica cicatrizada al finalizar el experimento (izquierda). Fendas y quemado del tallo producidos por las pastas con alta concentración de ácido sulfúrico.