Producto: Caracterización de los efectos de formulaciones innovadoras de pasta estimulante sobre la producción de resina y el estado de la planta en condiciones controladas.

Actividad: Ensayo en condiciones controladas de formulaciones de pasta estimulante sobre plántula de *Pinus Pinaster* y sus efectos en la producción y estado de la planta.

Entregables:

- Dossier técnico del ensayo de caracterización de estimulantes de la resinación.
- Estudio comparativo de estimulantes inductores de la resinación en condiciones de cultivo controlado.
- Presentación de resultados.

Proyecto cofinanciado por el Programa Interreg Sudoe a través del Fondo Europeo de Desarrollo

2.18.1. Dosier técnico del ensayo de caracterización de estimulantes de la resinación

Producto 2.12. Caracterización de los efectos de formulaciones innovadoras de pasta estimulante sobre la producción de resina y el estado de la planta en condiciones controladas

Actividad. 2.18. Ensayo en condiciones controladas de formulaciones de pasta estimulante sobre plántula de Pinus pinaster y sus efectos en la producción y estado de la planta

Autores: Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes Forestal y del Medio Natural

Fecha: agosto 2021

Proyecto cofinanciado por el Programa Interreg Sudoe a través del Fondo Europeo de Desarrollo

Tabla de contenido

Introducción 2

Estimulantes químicos 2

Ácidos 2

Fitohormonas 3

Objeto del proyecto 5

Descripción de los trabajos realizados 5

Fundamento del estudio, diseño experimental y metodología empleada 5

Resultados 6

Introducción

Estimulantes químicos

Existen distintos tipos de estimulantes químicos que, tras su aplicación, fomentan la producción de resina mediante diferentes mecanismos de actuación que varían en función del principio activo que constituye la base de su composición.

Ácidos

El ácido interacciona con la pared celular de los canales resiníferos, generando así un incremento de su tamaño y facilitando la liberación de resina. Además, la fluencia de esta sustancia se ve facilitada por la presencia del ácido, ya que inhibe parcialmente el fenómeno de cristalización (Rodrigues-Corrêa *et al*, 2008). En el caso de los ácidos de menor pH (con mayor poder oxidativo), 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 (Rodrigues-Corrêa *et al*, 2012; Rodríguez-García *et al*, 2015).

Figura 1. Detalle del quemado del pino tras la aplicación de un estimulante con ácido sulfúrico. Fuente: extraído de *Pine oleoresin: tapping green chemicals, biofuels, food protection, and carbon sequestration from multipurpose trees* (Rodrigues-Corrêa, 2012).

Ácido sulfúrico (H_2SO_4): se trata de un ácido mineral fuerte y un oxidante fuerte. En medio acuoso, se disocia de acuerdo con dos equilibrios, siendo miscible en agua para todos los grados de concentración (Young, 1949):

1) $H_2SO_4 + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + HSO_4^-$ pKa1 = ácido fuerte
2) $HSO_4^- + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + SO_4^{2-}$ pKa2 = 1,99

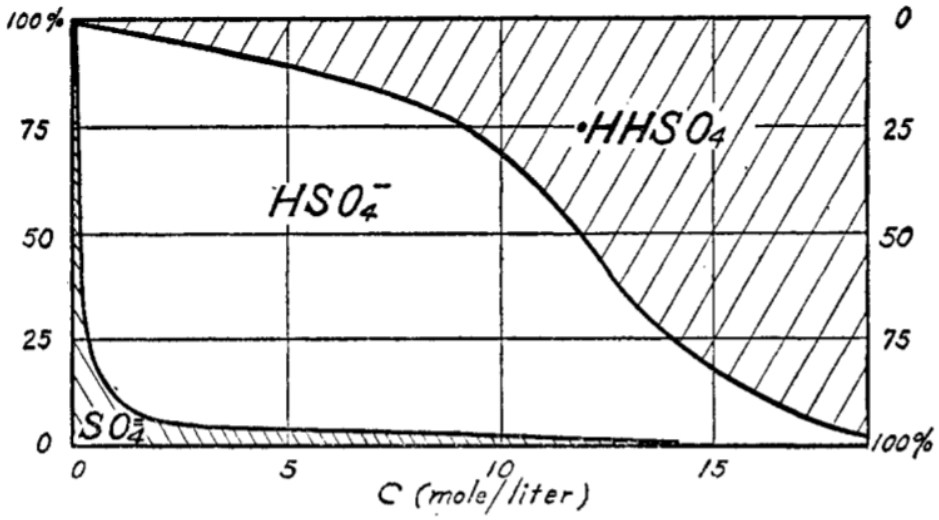


Figura 2. Fracciones de ácido sulfúrico presente como ácido sin disociar, como ion bisulfato, y como ion sulfato (Fuente: extraído de Young T.F., 1949).

En soluciones muy diluidas, casi todo el ácido se encuentra disociado en forma de iones sulfato e hidrógeno. Conforme se incrementa la concentración de ácido, las especies presentes pasan a ser iones bisulfito e hidrógeno. En disoluciones muy concentradas, casi todo el ácido se encuentra en su forma sin disociar. Por esta razón, el ácido sulfúrico diluido actúa como un ácido diprótico, es decir, es capaz de liberar hasta dos iones H^+. En base a estas propiedades, es capaz de formar sulfatos y bisulfatos con aquellos compuestos con los reacciona (Young *et al*, 1949).

Por otro lado, sus características de higroscopicidad se deben, principalmente, a que la entalpía (o calor) de reacción del H_2SO_4 anhidro con el agua es muy exotérmica (Khalizov *et al*, 2009), lo que significa que tiene mucha tendencia a progresar cuando se ponen en contacto las dos sustancias, formando durante el proceso los siguientes hidratos: el monohidrato (H_2SO_4*H_2O), el dihidrato (H_2SO_4*$2H_2O$), el trihidrato (H_2SO_4*$3H_2O$), el tetrahidrato (H_2SO_4*$4H_2O$) y el hexahidrato (H_2SO_4*$6{,}5H_2O$).

Consecuencia de su poder oxidante, su fuerte acidez y la concentración, relativamente elevada, a la que se emplea, da lugar, tal y como se ha mencionado antes, a un "*quemado*" químico que se manifiesta en la madera tras una exposición prolongada al ácido (Michavila *et al*, 2019).

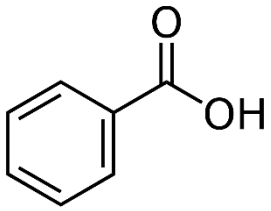
Figura 3. Izquierda: aplicación de la pasta tradicional. Derecha: detalle de madera quemada y no quemada. Fuente: cedido por Michavila S., 2019.

Ácido clorhídrico (HCl): se trata de un ácido mineral fuerte y un oxidante fuerte. En medio acuoso, se disocia de acuerdo al siguiente equilibrio, siendo miscible en agua para todos los grados de concentración:

1) $HCl + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + Cl^-$ pKa = ácido fuerte

A efectos prácticos, se puede suponer que, para un amplio rango de concentraciones, el ácido se disocia totalmente en iones cloruro e hidrógeno (Matsumoto *et al*, 1996). Por esta razón, el ácido clorhídrico actúa como un ácido monoprótico fuerte, es decir, es capaz de liberar hasta un ion H^+. En base a estas propiedades, es capaz de formar cloruros con aquellos compuestos con los reacciona.

Consecuencia de su poder oxidante, su fuerte acidez y la concentración, relativamente elevada, a la que se emplea, podría llegar a ocasionar daños similares a las pastas basadas en ácido sulfúrico.

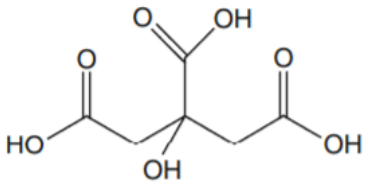


Ácido benzoico ($C_7H_6O_2$): se trata de un ácido orgánico débil, y por tanto presenta menor poder oxidativo que los ácidos anteriores. En medio acuoso, se disocia de acuerdo al siguiente equilibrio, siendo parcialmente miscible en agua (Laguerie *et al*, 1976) a una atmósfera de presión y 25º C de temperatura (solubilidad de 3.44 g/L):

1) $C_6H_5CO_2H + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + C_6H_5CO_2^-$ pKa = 4,19

Al ser un ácido débil monoprótico, las moléculas de ácido en disolución no se encuentran totalmente disociadas, por lo que las distintas especies presentes contribuyen a ejercer un efecto tampón en el medio. Además, como ya se ha mencionado, la mayor limitación de este ácido es su grado de miscibilidad con el agua, lo que dificulta la preparación de pastas, así como su aplicabilidad y permeabilidad en la planta, al mismo tiempo que es capaz de actuar como precursor del ácido salicílico ($C_7H_6O_3$), una fitohormona cuyo mecanismo de actuación es explicado más adelante.

Por lo demás, al ser menos corrosivo y presentar una menor fortaleza ácido-base, ocasionaría, en principio, daños mucho menores en las plantas a las que fuera aplicado con éxito.



Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$): se trata de un ácido orgánico débil, y por tanto presenta menor poder oxidativo que los ácidos clorhídrico y sulfúrico. En medio acuoso, se disocia de acuerdo tres equilibrios de disociación, siendo muy miscible (Laguerie *et al*, 1976) en agua a una atmósfera de presión y 25,1 ºC de temperatura (solubilidad de 208 g ácido monohidratado/100g de agua):

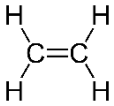
1) $C_6H_8O_7 + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + C_6H_7O_7^-$ pKa1 = 3,13
2) $C_6H_7O_7^- + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + C_6H_6O_7^{2-}$ pKa2 = 4,76
3) $C_6H_6O_7^{2-} + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + C_6H_5O_7^{3-}$ pKa3 = 6,40

Al ser un ácido débil poliprótico, las moléculas de ácido no se encuentran totalmente disociadas, por lo las distintas especies presentes contribuyen a ejercer un efecto tampón en el medio. Aún son necesarios estudios adicionales para determinar la viabilidad de este ácido como alternativa a las principales pastas comerciales.

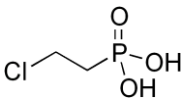
Fitohormonas

Posiblemente, este grupo sea el que presente mayores posibilidades de cara al desarrollo e innovación de nuevos estimulantes capaces de inducir respuestas metabólicas y anatómicas en la planta, ya que son capaces, por un lado, de fomentar 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, se puede fomentar la expresión de las familias génicas responsables de la biosíntesis de resina, lo que también provocaría un aumento en su producción.

En general, su gran limitación se debe a que los mecanismos actuales de aplicación de estos principios activos no logran permear en suficiente concentración al interior de las plantas, por lo que no llegan a inducirse los efectos deseados.



Etileno(C_2H_4): a temperatura ambiente y una atmósfera de presión, esta sustancia aparece en forma gaseosa, siendo incolora y presentando un gusto y olor dulce. Es más ligero que el aire, fácilmente inflamable, pudiendo retroceder la ignición a la fuente de la fuga, lo que supone un riesgo adicional. Además, en caso de una exposición prolongada al fuego o al calor del recipiente que lo almacena, éste puede explotar violentamente y salir despedido, por lo que ha tenerse cuidado no solo durante su uso, sino también durante su transporte y almacenamiento (Howard, 1996).



Aunque es parcialmente soluble en agua (131 mg/L), debido a su elevado precio, a su condición de gas, y las dificultades de aplicación, se emplea el **ácido 2-cloroetilfosfónico ($C_2H_6ClO_3P$)**, o etefón, como alternativa, constituyendo un precursor del etileno, que es formado de acuerdo con el siguiente mecanismo a partir de valores de pH de 3,5 (Yang, 1969):

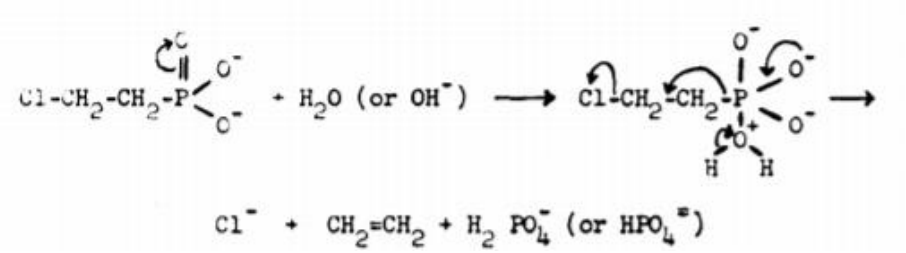
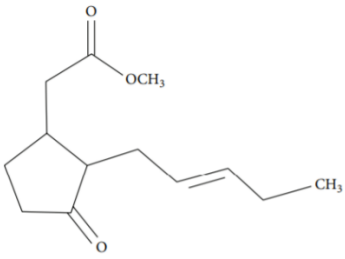


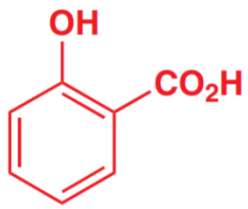
Figura 4. Mecanismo de disociación del etefón para la formación de etileno (medio neutro o básico). Fuente: extraído de Yang S. F., 1969.

El mecanismo de actuación del etileno es complejo, pues se encuentra implicado en un gran número de rutas metabólicas, pero puede resumirse de acuerdo a la siguiente información: esta molécula se encuentra implicada en la señalización de mecanismos de estrés inducido, que fomentan la expresión de las familias génicas responsables de la biosíntesis de mono- y diterpenos. Contribuye también al crecimiento radial, fomentando la presencia de canales resiníferos y alterando los patrones anatómicos de las traqueidas (Celedon, 2019).

Auxinas y giberelinas: estas fitohormonas intervienen en un considerable número de procesos relacionados con el desarrollo de la planta a lo largo de su ciclo vital, pudiendo actuar también como mensajeros intercelulares, estando también relacionadas con las respuestas al crecimiento. De esta manera, contribuyen a la formación de canales resiníferos al tiempo que promueven la expresión del gen del ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (enzima implicada en la biosíntesis de etileno). Debido a su elevado coste, se emplean productos sintéticos capaces de emular sus efectos (Rodrigues-Correa *et al*, 2013).



Jasmonatos (metil jasmonato $C_{13}H_{20}O_3$): se trata de una fitohormona derivada de lípidos vegetales que contribuye a la regulación de procesos del desarrollo de la planta, como puede ser la maduración y senescencia del fruto, al mismo tiempo que actúa en respuesta al estrés biótico y abiótico. Además, induce la transcripción del gen ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico, que interviene en la biosíntesis de etileno. Incrementa a su vez la biosíntesis de mono y diterpenos en hoja y tallo, al tiempo que promueve la activación celular y la formación de canales resiníferos traumáticos en el xilema (Rodrigues-Correa *et al*, 2013).



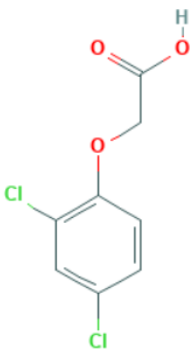
Ácido salicílico ($C_7H_6O_3$): actúa como mediador en respuestas asociadas con patógenos, favoreciendo la activación de mecanismos de defensa de la planta frente a sus predadores. Además de su condición como fitohormona, este compuesto es un ácido carboxílico que presenta el siguiente equilibrio ácido base (Rodrigues-Correa *et al*, 2013):

1) $C_7H_6O_3 + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + C_7H_5O_3^-$ pKa = 2,97

Herbicidas

Los herbicidas generalmente son compuestos químicos que se emplean en las explotaciones agrarias para controlar el crecimiento de hierbas no deseadas, incrementando de esta manera la producción del cultivo primario. En su mayoría, son moléculas pequeñas que no suelen presentar una toxicidad directa, pero que, debido a su estructura molecular, son capaces de inhibir sitios de unión específicos de enzimas y proteínas, alterando de esta manera rutas metabólicas y fisiológicas esenciales para la vida de las plantas. En función de la tipología de su mecanismo de actuación, se clasifican en selectivos y no selectivos (Song, 2014).

El potencial interés de estos compuestos reside en el funcionamiento de su mecanismo de acción, ya que son capaces, a concentraciones y dosis controladas, de alterar favorablemente rutas metabólicas que inducen un incremento en la producción de resina:



2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético: $C_8H_6Cl_2O_3$): este herbicida selectivo está basado en la estructura molecular de las auxinas (fitohormonas naturales), es uno de los más importantes y extendidos por su efectividad y reducido coste (Serbent *et al*, 2019). Aplicado en concentración suficiente, es capaz de atacar de manera específica a las plantas dicotiledóneas, y aunque su mecanismo de actuación aún no se conoce completamente, su funcionamiento se basa en interferir con los procesos fisiológicos de las plantas en tres etapas: en primer lugar, provoca una estimulación anormal del crecimiento, iniciando la expresión de ciertas familias génicas. En segundo lugar, se inhibe el crecimiento anormal provocando respuestas fisiológicas como el cierre de estomas y la producción de especies reactivas de oxígeno, para finalmente provocar senescencia, muerte celular y necrosis de tejidos (Song, 2014; Serbent *et al*, 2019).

En el caso de las coníferas, aplicado en concentración controlada, es capaz de fomentar la producción de resina de manera similar al caso de la auxina, estimulando la formación de canales resiníferos y la expresión de gen del ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (enzima implicada en la biosíntesis de etileno) (Rodrigues-Correa *et al*, 2013).

Productos derivados de hongos y animales

Por último, hay presentes polímeros naturales aparentemente inertes capaces de activar los mecanismos defensivos de las especies del género *Pinus*. Normalmente, la base de su funcionamiento se debe a que la planta reconoce estas sustancias como el inicio de una infección de un hongo, lo que provoca que ésta trate de responder a la "infección" (Rodrigues-Correa *et al*, 2013).

Chitosan ($C_{56}H_{103}N_9O_{39}$): se trata de un compuesto similar a la quitina y presente en el exoesqueleto de algunos insectos, así como en las paredes celulares de varias especies de hongos. Su presencia y detección por las plantas induce respuestas que fomentan la activación de mecanismos de defensa como parte de mecanismos de respuesta frente a la detección de patógenos (Klepzig & Strom, 2011).

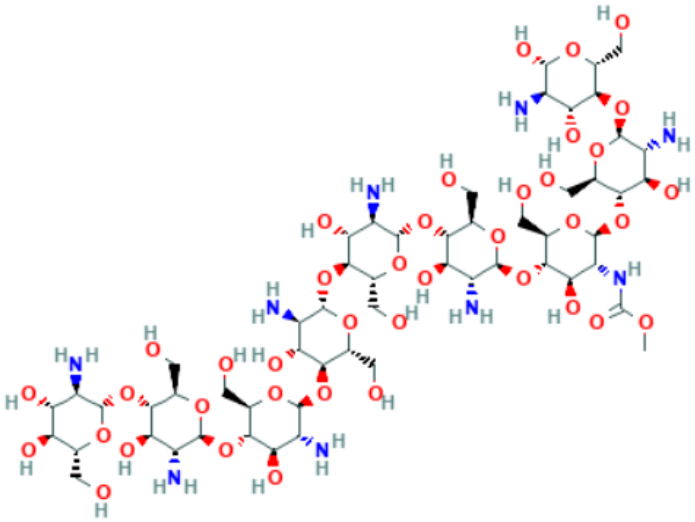


Figura 5. Propuesta estructural para el polímero de chitosán

Objeto del proyecto

El presente proyecto busca establecer unas directrices orientadas a la cuantificación de diferencias en la composición de pastas comerciales aplicadas actualmente en la resinación de masas forestales.

Para ello, se acude a unas de las principales características que definen a todas las pastas: su acidez expresada mediante el valor de su pH.

En función del valor de este parámetro se puede cuantificar la presencia de ácidos fuertes, ya que éstos serán, como consecuencia de sus altos coeficientes de disociación, los principales responsables de la presencia de iones hidronio en el medio y, por tanto, de bajos pHs. Además, mediante la valoración de estas disoluciones con NaOH [0.1 M], se puede en primer lugar detectar la presencia de sustancias capaces de ejercer un efecto tampón sobre el medio, y en segundo lugar, cuantificar la cantidad de sustancias responsables de su acidez.

Por tanto, este estudio supone el punto de partida para el desarrollo y establecimiento de una metodología innovadora, sencilla y de fácil aplicación capaz de asegurar un control de calidad aplicado a los estimulantes químicos empleados en la resinación, y que además, combinada con técnicas espectroscópicas, podría llegar a ser capaz de lograr una trazabilidad en esta clase de productos.

Descripción de los trabajos realizados

Fundamento del estudio, diseño experimental y metodología empleada

La composición de las pastas es muy diversa y varía en función del tipo de estimulante empleado. Por lo que en primer lugar es necesario idear un protocolo de actuación que permita asegurar una adecuada comparación entre ellas.

Teóricamente, en un medio homogéneo, el pH de una fracción de muestra (alícuota), es el pH de la disolución madre de la que proviene. Si a esto le sumamos que la fracción ácida es soluble en agua, sería posible realizar una extracción sólido – líquido, de tal manera que logremos captar todo el ácido en una fase acuosa de nuestra elección.

Para ello, se pesa una cantidad conocida de pasta en un vaso de precipitados previamente tarado, se disuelve en un volumen conocido de agua desionizada, se filtra y lleva a enrase con este mismo disolvente en un matraz aforado de vidrio de 50 ml de capacidad, constituyendo así una solución madre de la que partir en nuestros análisis.

Una fracción de dicha disolución madre de volumen conocido (alícuota) se toma en un vaso de precipitados de 50 mL de capacidad, para en primer lugar, medir su pH mediante el uso de un pHmétro. Posteriormente, partiendo de una disolución de NaOH (0.1 M), se valora mediante pHmetro e indicador (fenolftaleína), para cuantificar la cantidad exacta de ácidos presentes en el medio.

De esta manera, conociendo el valor de nuestras diluciones y la composición exacta de las pastas, podemos detectar desviaciones significativas en la composición de estas en caso de que darse.

Resultados

Se presenta en primer lugar un resumen con los valores de pH de las extracciones realizadas:

Tabla 1. Vf: Volumen final al que se ha llevado la exracción de pasta tras el filtrado en mililitros; pH: valores medios de pH medidos; s (pH): desviación estándar en las medidas de pH.

Síntesis de las variables químicas medidas para los estimulantes a estudio				
Principio activo	**Código**	**Vf (mL)**	**pH**	**s (pH)**
Ácido sulfúrico	SuAlm19	50	0,89	0,05
Ácido salicílico	SaHue19	50	0,95	0,04
Pretta	PrHue19	50	0,76	0,01
Ethrel	EtAlm19	50	1,21	0,03
Ácido cítrico	CiGal19	50	2,42	0,01

Y finalmente el valor de las concentraciones de ácidos caracterizadas con las valoraciones, que son consistentes con los valores de pH obtenidos;

Tabla 2. Va; Volumen de la disolución valorada en mililitros; Vb: Volumen de base empleada para realizar la valoración en mililitros; Cacidos: Concentración de los compuestos ácidos presentes en el medio tras la valoración con la base empleada en Molar.

Resumen química				
Principio activo	**Código**	**Va (mL)**	**Vb (mL)**	**C_{acidos} (M)**
Ácido sulfúrico	SuAlm19	50	16,63	0,13
Ácido salicílico	SaHue19	50		
Pretta	PrHue19	50		
Ethrel	EtAlm19	50	15,3	0,122
Ácido cítrico	CiGal19	50		

De esta manera, conociendo el valor de nuestras diluciones y la composición exacta de las pastas, podemos en primer lugar, evaluar el grado de precisión de las determinaciones realizadas, y en segundo lugar, el nivel de desviación entre lo teórico y lo experimental.

Por último, los tratamientos empleados se basan en los siguientes principios activos:

- Tratamiento mediante estimulante tradicional, con ácido sulfúrico (H_2SO_4) como principio activo.
- Tratamiento mediante estimulante basado en Ethrel, con etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico) como principio activo (menor o igual al 5% en masa) y ácido sulfúrico (20% en masa).

- Tratamiento mediante estimulante químico con ácido salicílico como principio activo.
- Tratamiento control, consistente en aplicación del método de pica de corteza pero sin aplicación de estimulante químico.

Los materiales necesarios para la fabricación y las metodologías de elaboración de las pastas se detallan a continuación.

Pasta tradicional, basada en la pasta Zeta (Zamorano, 1983):

Materiales:

Disolución de ácido sulfúrico comercial (98%)

Agua destilada

Sulfato de calcio hemihidratado

Vaso de precipitados de vidrio de 2 litros

Varilla de vidrio

Metodología:

Para la fabricación de 920.6 gramos de pasta, en primer lugar, obtenemos 500 mL de una disolución de ácido sulfúrico al 37.5% en masa. Para ello, partiendo del ácido sulfúrico comercial (98%), diluimos 1 parte de ácido con 3 de agua (en volumen). Conviene recordar que esta reacción es muy exotérmica, por lo que ha de realizarse con cautela, pudiendo llegar a ser necesario emplear un baño de hielo en cuyo interior se depositaría el vaso de precipitados con el agua, a la que poco a poco, se le adicionaría el ácido. Es importante recalcar que siempre se ha de adicionar el ácido sobre cantidad suficiente de agua, pues en caso de no hacerlo así, y como consecuencia de la violencia de la reacción, podría salpicarnos ácido concentrado, poniendo en riesgo nuestra integridad física y nuestra salud.

Una vez obtenida la disolución de ácido a 37.5% en masa, adicionamos 280 gramos de sulfato de calcio hemihidratado en tandas de 50 gramos, removiendo constantemente con una varilla de vidrio para asegurar una correcta homogeneidad de la pasta. En este punto, la concentración de ácido sulfúrico en la pasta es del 26% en masa. Es importante tener en cuenta que no haber suficiente ácido presente en la pasta, el sulfato de calcio hemihidratado puede fraguar por efecto del agua, lo que supondría un grave inconveniente.

Es en este momento cuando es necesario comprobar la textura de la pasta. Para ello, sumergimos la varilla de vidrio y la extraemos. Si la pasta ni escurre ni gotea, es que hemos alcanzado la textura deseada. En caso de no ser así, adicionaremos más escayola (o agua) para conseguir que la pasta alcance la textura apropiada.

Finalmente se envasa, preferentemente en un envase opaco a la luz. Para ello, envasamos en bote de polietileno traslúcido, con obturador y tapón, y recubrimos el envase con papel de aluminio. Se etiqueta con el número de lote y la fecha. La pasta se utiliza durante un máximo de un mes. Una vez transcurrido el mes, si queda algo se desecha y se elabora otro lote.

Pasta con base de Ethrel:

Materiales:

Disolución de ácido sulfúrico comercial (98%)

Agua destilada

Ethrel

Serrín

Silica HDK-N20

Nonil fenol 9M

Vaselina líquida (glicerol)

Detergente con cloruro de di(sebo hidrogenado)dimetilamonio

Vaso de precipitados de vidrio de 2 litros

Varilla de vidrio

Metodología:

Para la fabricación de 363.5 gramos de pasta, en primer lugar, añadimos 50g del ácido sulfúrico comercial (98%) sobre 220g de agua. Tal y como se ha mencionado en el punto anterior, conviene ser cuidadosos a la hora de realizar esta dilución. A continuación, añadimos 40g de serrín, seguidos de 20 gramos de sílice (Silica HDK-N20), 3.5g de Nonil fenol 9M, 14g de vaselina líquida y 6g de cualquier detergente que presente cloruro de di(sebo hidrogenado)dimetilamonio como principio activo, removiendo constantemente con una varilla de vidrio. A continuación, comprobamos la textura de la pasta. Para ello, sumergimos la varilla de vidrio y la extraemos. Si la pasta ni escurre ni gotea, es que hemos alcanzado la textura deseada. En caso de no ser así, adicionaremos más de serrín (o sílice) o agua para conseguir que la pasta alcance la textura apropiada.

Finalmente se envasa, preferentemente en un envase opaco a la luz. Para ello, envasamos en bote de polietileno traslúcido, con obturador y tapón, y recubrimos el envase con papel de aluminio. Se etiqueta con el número de lote y la fecha. La pasta se utiliza durante un máximo de un mes. Una vez transcurrido el mes, si queda algo se desecha y se elabora otro lote.

Pasta con base de ácido salicílico

Materiales:

Disolución de ácido sulfúrico comercial (98%)

Ácido salicílico

Agua destilada

Propilenglicol

Salvado de trigo

Vaso de precipitados de vidrio de 2 litros

Varilla de vidrio

Metodología:

Para 1000g de pasta, poner 520 mL de agua en un vaso de precipitados de vidrio, preparar un baño de hielo y colocar el vaso de precipitados de vidrio en su interior, luego agregar lentamente 136 mL (d = 1.83 g / cm3 equivalente a 250g) de ácido sulfúrico (98%) . Esta reacción es muy exotérmica, por lo que se ha de agregar el ácido con cuidado.

Antes de añadir los 170g de salvado de trigo, es necesario homogeneizarlo, pero si se puede, es preferible molerlo. En caso no hacerlo así, la heterogeneidad del sustrato puede modificar la consistencia final de la pasta. Luego, mientras el vaso de precipitados de vidrio con ácido y agua aún sigue caliente, se extrae del baño de hielo y se deposita sobre una superficie limpia, añadiendo lentamente 100g de salvado de trigo, y el resto en dos tandas, removiendo constantemente con una varilla de vidrio.

Una vez adicionado todo el salvado, introducimos una batidora de mano y mezclamos la pasta hasta conseguir una textura homogénea. En este paso es importante evitar introducir aire en la pasta y limpiar inmediatamente la cuchilla de la batidora, pues el ácido de la mezcla podría ser capaz de corroer los metales que la componen si lo dejásemos actuar el tiempo suficiente.

Al día siguiente, cuando la mezcla de ácido, paja y agua esté a temperatura ambiente, se mezcla en un mortero (o similar) 10g de ácido salicílico con 1 o 2 mL de alcohol etílico (96º) para comenzar a disolverlo. Luego, se agregan los 50 g (d = 1.035 g / cm3 equivalente a 48.3 mL) de propilenglicol para disolver totalmente el ácido salicílico. En este momento, agregar el contenido de mortero a la pasta, mezclando constantemente con una varilla de vidrio, hasta que la mezcla sea homogénea. A continuación, comprobamos la textura de la pasta. Para ello, sumergimos la varilla de vidrio y la extraemos. Si la pasta ni escurre ni gotea, es que hemos alcanzado la textura deseada. En caso de no ser así, adicionaremos más salvado (o agua) para conseguir que la pasta alcance la textura apropiada.

Finalmente se envasa, preferentemente en un envase opaco a la luz. Para ello, envasamos en bote de polietileno traslúcido, con obturador y tapón, y recubrimos el envase con papel de aluminio. Se etiqueta con el número de lote y la fecha. La pasta se utiliza durante un máximo de un mes. Una vez transcurrido el mes, si queda algo se desecha y se elabora otro lote.

Bibliografía

Celedon, J. M., & Bohlmann, J. (2019). Oleoresin defenses in conifers: chemical diversity, terpene synthases and limitations of oleoresin defense under climate change. New Phytologist, 224(4), 1444-1463.

Howard, P. H. (1996). Handbook of physical properties of organic chemicals. CRC press.

Klepzig, K. D., & Strom, B. L. (2011). Effects of a commercial chitosan formulation on bark Beetle (Coleoptera: Curculionidae) resistance parameters in loblolly pine. Journal of Entomological Science, 46(2), 124-134.

Laguerie, C., Aubry, M., & Couderc, J. P. (1976). Some physicochemical data on monohydrate citric acid solutions in water: solubility, density, viscosity, diffusivity, pH of standard solution, and refractive index. Journal of Chemical and Engineering Data, 21(1), 85-87

Matsumoto, K., & Tanaka, H. (1996). Formation and dissociation of atmospheric particulate nitrate and chloride: an approach based on phase equilibrium. Atmospheric Environment, 30(4), 639-648.

Nájera y Angulo, F., & Rifé Lamprecht, M. P. (1951). Resinación con estimulantes químicos. Estudio general y experiencias realizadas en los pinares españoles. I. Acido clorhídrico.

Nájera y Angulo, F. (1961). Sistema de resinación de pica de corteza estimulado con ácido sulfurico: normas de aplicación.

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. Industrial Crops and Products, 27(3), 322-327.

Rodrigues, K. C., & 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. Industrial Crops and Products, 30(2), 316-320.

Rodrigues, K. C., Apel, M. A., Henriques, A. T., & Fett-Neto, A. G. (2011). Efficient oleoresin biomass production in pines using low cost metal containing stimulant paste. biomass and bioenergy, 35(10), 4442-4448.

Rodrigues-Corrêa, K. C. D. S., de Lima, J. C., & Fett-Neto, A. G. (2012). Pine oleoresin: tapping green chemicals, biofuels, food protection, and carbon sequestration from multipurpose trees. Food and Energy Security, 1(2), 81-93.

Rodrigues-Corrêa, K. C., de Lima, J. C., & Fett-Neto, A. G. (2013). Oleoresins from pine: production and industrial uses. Natural products. Berlin: Springer, 4037-4060.

Serbent, M. P., Rebelo, A. M., Pinheiro, A., Giongo, A., & Tavares, L. B. B. (2019). Biological agents for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide degradation. Applied microbiology and biotechnology, 103(13), 5065-5078.

SOLÍS, W. 1968. “Experiencias de resinación con el sistema de espina de pescado con el cepillo Mazek sobre Pinus pinea”. Comunicaciones del IFIE n. 2, 10 p.

Solís, W., & Zamorano, J. L. (1974). Características y utilización de la «pasta IFIE» como estimulante de resinación. Hoja técnica INIA.

Song, Y. (2014). Insight into the mode of action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) as an herbicide. Journal of integrative plant biology, 56(2), 106-113.

Yang, S. (1969). Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. Plant Physiology, 44(8), 1203.

Entregable 2.18.2. Presentación de resultados

Actividad. 2.18. Ensayo en condiciones controladas de formulaciones de pasta estimulante sobre plántula de Pinus pinaster y sus efectos en la producción y estado de la planta

Producto 2.12. Caracterización de los efectos de formulaciones innovadoras de pasta estimulante sobre la producción de resina y el estado de la planta en condiciones controladas

Autores: Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes Forestal y del Medio Natural

Fecha: noviembre 2021

www.sust-forest.eu

SOCIOS | PATERNAIRES | PARCEIROS | PARTNERS

Proyecto cofinanciado por el Programa Interreg Sudoe a través del Fondo Europeo de Desarrollo

Contenido

EVENTOS 3

Octubre 2019 Mejora de la producción resinera mediante mejora genética: familias grandes productores. 3

Noviembre 2019 tercera asamblea general del proyecto presentación en Lisboa 4

Diciembre 2019. Jornada de resineros. Presentación en Coca 5

Septiembre 2020 cuarta asamblea general del proyecto. On line 6

Octubre 2021 Jornadas internacionales El resinero: el futuro de un oficio, del 4 al 5 octubre en el Teatro Palacio de la Audiencia de Soria. 7

Noviembre 2021. SEMINARIO PARA LA MEJORA DE PRODUCCIÓN DE RESINA EN PINUS PINASTER AITON. Pontevedra 8

PUBLICACIONES 9

GRADO EN INGENIERÍA FORESTAL. PROYECTO FIN DE GRADO. 9

Puente-Villegas, S. M., García, A. R., Rubio, F., Gil, L., & Lopez, R. (2020). Salicylic and citric acid as promising new stimulants for resin tapping in maritime pine (Pinus pinaster Ait.). *Forest Systems*, *29*(3), eSC07-eSC07. 9

EVENTOS

Octubre 2019 Mejora de la producción resinera mediante mejora genética: familias grandes productores.

Centro Forestal Sequero Coca (Segovia), jueves 24 de octubre de 2019. Jornada de transferencia (*Science-to-Practice event)*

Santiago Michavilla, Rosana López y Aida Rodriguez presentan algunos de los resultados del ensayo de pastas estimulantes durante este evento organizado por el proyecto Incredible

Jornada de transferencia - Science to practice event

Programa provisional, 24 de octubre de 2019	
9:00	***Recepción en el Centro Forestal del Sequero***
9:30	***Bienvenida, apertura, presentación de INet y jornada*** M. Bragado (Junta de Castilla y León) y J. Calvo (CESEFOR)
9:40	***Prospección y selección de grandes productores de resina como progenitores de familia*** R. Alía (INIA-CIFOR/iuFOR)
9:50	***Evaluación y catalogación de materiales de base seleccionados para la producción de resina*** J. Tranque (Junta de Castilla y León)
10:00	***Expectativas de los gestores forestales al uso de los materiales genéticos mejorados*** M. Bragado (Junta de Castilla y León), F. Pinillos (TRAGSA)
10:10	***Ensayo de estimulantes en pinares en resinación según gradient climático: campaña 2018*** R. López y A. Rodriguez (UPM)
10:20	***Perspectivas futuras en estimulantes en el marco un nuevo Proyecto del Climate KIC*** R. López y A. Rodriguez (UPM)
10:30	***Técnica del taladro basal*** S. Michavila (UPM)
10:40	**Pausa café**
11:00	**Trabajo en grupos**
11:40	**Plenario**
12:00	***Visita de un ensayo de taladro basal (Coca)*** E. Maroto Conde y A. de Pablos Escolar (Junta de Castilla y León)
13:00	***Visita a una repoblación por fajas con planta procedente de planta mejorada***. Angel Luís Peña, Eduardo Villacorta (Junta de Castilla y León)
14:00	**Comida**
16:00	***Visita del Banco Clonal y la parcela de progenies (Carbonero el Mayor)*, hasta las 17:00 h** Angel Luís Peña, Eduardo Villacorta (Junta de Castilla y León)

Contacto e inscripción:
María Pasalodos, pasalodos.maria@inia.es

Jornada de transferencia - Science to practice event

Mejora de la producción resinera mediante mejora genética: familias de grandes productores

Centro forestal Sequero de Coca

Antecedentes:

La mejora genética del pino negral, *Pinus pinaster*, iniciada en el siglo XX, permite incrementar la producción de resina tanto en calidad como en cantidad, así como aumentar la resiliencia de los pinares ante escenarios de cambio climático frente a factores bióticos y abióticos. Pero para continuar el programa de mejora genética a largo plazo hay que resolver algunas cuestiones del plan de trabajo:

- Demandas de la industria en términos de cantidad y calidad de resina.
- Recursos disponibles para el programa.
- Sistemas silvícolas adaptados a los nuevos materiales.

Los pinares de negral en los arenales de la Meseta Norte entre Segovia y Valladolid constituyen una zona estratégica para la producción de resina en España, donde durante el siglo XX se han llevado a cabo diferentes actividades de mejora en relación con la selección de árboles plus, su caracterización, cruzamientos y evaluación genética. Recientemente, se han establecido las primeras plantaciones con materiales seleccionados obtenidos.

En la jornada de transferencia del día 24 de octubre, analizaremos diferentes factores relacionados con la mejora genética forestal y las perspectivas futuras para mejorar la producción de resina en la zona.

Objetivo general:

Se quiere transmitir el potencial de los programas de mejora genética al sector de la resina, para el fortalecimiento de su competitividad y la adaptación a las condiciones climáticas futuras, analizando y discutiendo con los participantes las actividades desarrolladas por la Junta de Castilla y León en colaboración con el CESEFOR, el INIA y la UPM.

Dirigido a:

Grupos de interés del sector de la resina y de la cadena de suministro de planta forestal: propietarios y gestores forestales, técnicos, resineros, industria, investigación.

Objetivos específicos:

La jornada ofrecerá información y un espacio de reflexión y discusión sobre:

I. las iniciativas de I+D+i en curso sobre la resina
II. la red de evaluación y ensayo de resinación SustForestResinLab
III. la mejora genética forestal orientado a la resina: experiencias en *Pinus pinaster* o *Pinus elliottii* en Brasil
IV. las estrategias para la producción de material forestal de reproducción mejorado para futuros pinares en resinación más productivos y resilientes
V. el suministro de planta y la silvicultura adaptada de los materiales mejorados
VI. las perspectivas y necesidades futuras.

Visita de campo:

Noviembre 2019 tercera asamblea general del proyecto presentación en Lisboa

Asistimos en Lisboa estos días a la 3ª asamblea general del proyecto en la que desde UPM presentamos algunos de nuestros más recientes trabajos

Third Project Meeting – Second General Assembly

INIAV facilites, 20 to 21 November 2019

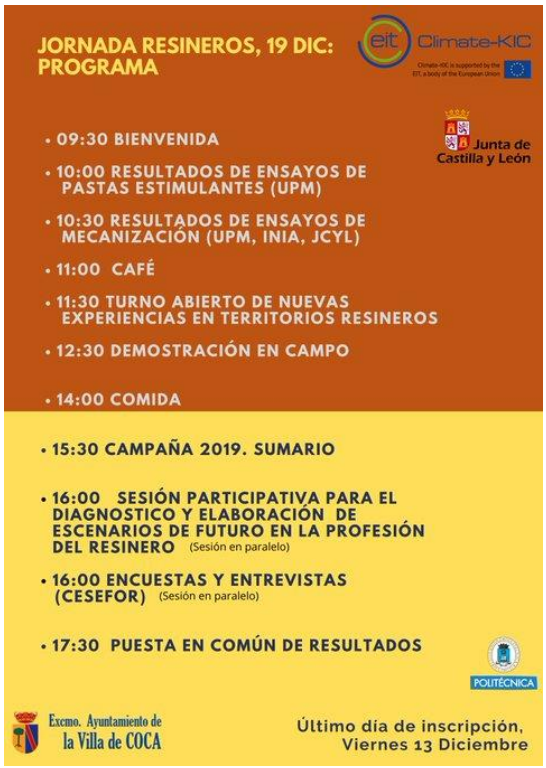
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P.
Avenida da República Portugal, Oeiras, Portugal

Working language: English

Day 1 – Wednesday 20 November – Technical Meeting			
Time	**Session**	**By**	**For**
8:30 – 9:00	Registration of the participants	INIAV	All
9:00 – 9:10	Welcome and logistics.	INIAV	All
9:10 – 11:10	Worktable 1: European Network of Resin Territories - Web-Site presentation (10 min) - Proença-a-Nova Statement presentation (20 min) - Draft statutes revision and discussion (80 min) - Next actions (10 min)	PROENÇA-A-NOVA & CESEFOR	All
11:10 – 11:30	Coffee break (20 min)		
11:30 – 11:50	Socio-labour characterisation of the SUDOE resin tapper population. Work progress.	INIAV	All except worktable 2
11:50 – 12:10	Success stories and good entrepreneurship practices of the resin tapper multifunctional activity.	PENELA	All except worktable 2
11:30 – 12:10 Parallel	Worktable 2: Analysis of the territorial system of the SUDOE regions with a high resin potential. Inventory standardization.	CESEFOR	CRPF & INIAV.
	Worktable 3:		

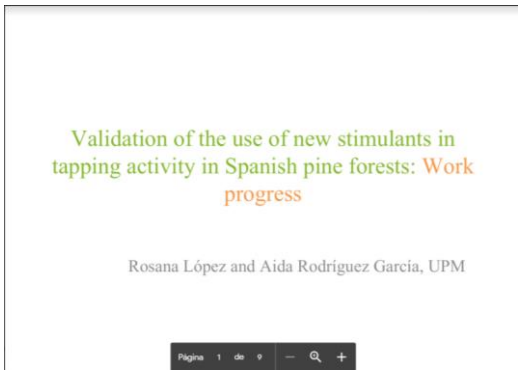
Diciembre 2019. Jornada de resineros. Presentación en Coca

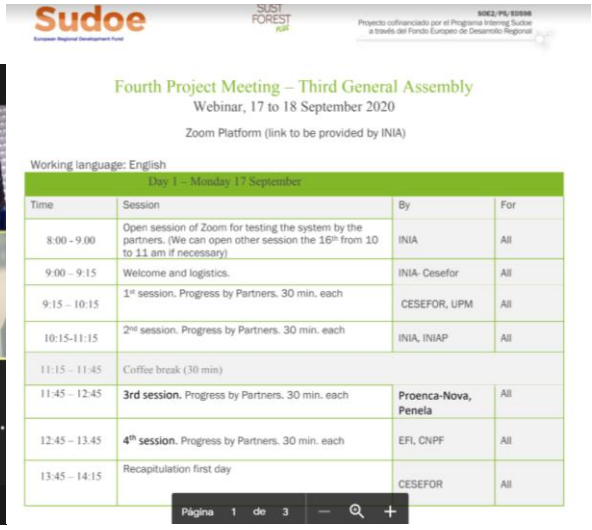
El 19 de diciembre se celebra la Jornada Encuentro para la reflexión sobre la situación actual del sector resinero, dentro del marco del proyecto GREENRESIN, financiado por Climate-Kic en Coca (Segovia). Es una actividad del proyecto donde Aida Rodriguez y Santiago Michavilla presentaron los avances en el estudio de pastas estimulantes



Septiembre 2020 cuarta asamblea general del proyecto. On line

En esta asamblea se presentaron los primeros resultados del ensayo en condiciones controladas de 2019 y el diseño de 2020 por Rosana López.





Octubre 2021 Jornadas internacionales El resinero: el futuro de un oficio, del 4 al 5 octubre en el Teatro Palacio de la Audiencia de Soria.

Se presentaron los resultados de la Universidad Politécnica de Madrid a lo largo del estudio de nuevos estimulantes. Se destaca la utilidad de técnicas de microrresinacion para el ensayo de nuevas formulaciones, la buena rentabilidad de la pasta salicílica y la similar productividad de pasta *ethrel* frente a la pasta tradicional en periodos de picas de 15 días.

Noviembre 2021. SEMINARIO PARA LA MEJORA DE PRODUCCIÓN DE RESINA EN PINUS PINASTER AITON. Pontevedra

El objetivo de este seminario es el de presentar los avances en los trabajos de mejora genética y selvícola de *Pinus pinaster* y analizar las propuestas de actividades que mejoran la coordinación y avance en los programas de evaluación, selección y gestión de las masas productoras de resina. En el Rosana López presentó algunos de los resultados del ensayo de estimulantes en condiciones controladas

PROGRAMA

Sesión 1. 11:00 a 13:00 horas. *Mejora genética para la producción de resina*

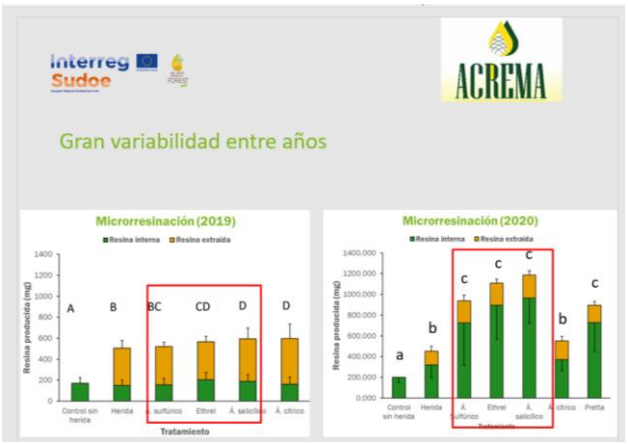
- Estrategia de mejora (*R. Alia*).
- Evaluación de genotipos (*R. Zas, L. Sampedro*)
- Evaluación precoz (*R. Lopez*)
- Materiales seleccionados en CYL (*J. Tranque*)
- Plan Nacional de mejora (*F. Pérez*)
- Discusión sobre sobre prioridades y coordinación de actuaciones. 1 hora (moderador: *J. Majada*)

Temas propuestos: Objetivos y zonas de mejora, métodos de selección y evaluación, propagación y obtención de material de reproducción, coordinación de actuaciones.

Sesión 2. 15:00 a 17:00 horas. *Mejora selvícola para la producción de resina*

- Variación temporal y espacial en la producción (*A. Rodriguez*)
- Factores relacionados con la producción (*R. Zas, L. Sampedro*)
- Métodos de extracción (*J. Majada*)
- Implantación de masas resineras de alta producción (*R. Alia*)
- Discusión sobre prioridades y coordinación de actuaciones. 1 hora (*moderador: S.Mutke*)

Temas propuestos: Métodos de extracción, monitorización de la producción resinera, modelos selvícolas para masas productoras de resina.

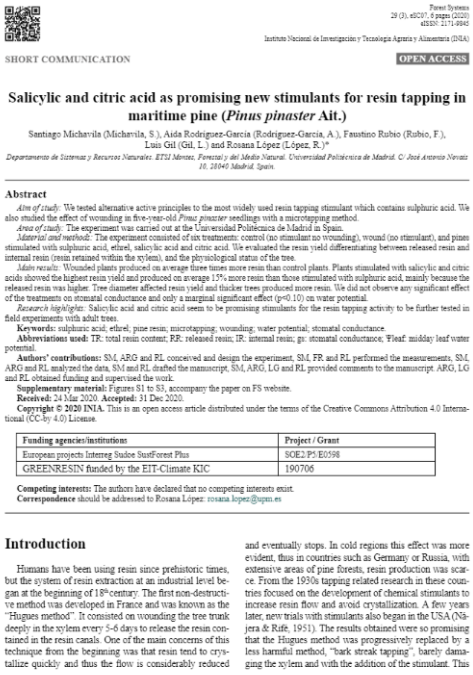


PUBLICACIONES

GRADO EN INGENIERÍA FORESTAL. PROYECTO FIN DE GRADO.

Ensayo de microrresinación con pastas estimulantes en *Pinus pinaster*. Análisis de la producción de resina y cambios en los factores fisiológicos y dendrométricos de la planta. Fin de grado. Septiembre 2021. Ana Rodríguez Domínguez

Puente-Villegas, S. M., García, A. R., Rubio, F., Gil, L., & Lopez, R. (2020). Salicylic and citric acid as promising new stimulants for resin tapping in maritime pine (Pinus pinaster Ait.). *Forest Systems*, *29*(3), eSC07-eSC07.



Forest Systems
29 (3), eSC07, 9 pages (2020)
eISSN: 2171-9845
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

SHORT COMMUNICATION

OPEN ACCESS

Salicylic and citric acid as promising new stimulants for resin tapping in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.)

Santiago Michavila (Michavila, S.), Aida Rodríguez-García (Rodríguez-García, A.), Faustino Rubio (Rubio, F.), Luis Gil (Gil, L.) and Rosana López (López, R.)*

Departamento de Sistemas y Recursos Naturales. ETSI Montes, Forestal y del Medio Natural. Universidad Politécnica de Madrid. C/ José Antonio Novais 10. 28040 Madrid. Spain.

Abstract

Aim of study: We tested alternative active principles to the most widely used resin tapping stimulant which contains sulphuric acid. We also studied the effect of wounding in five-year-old *Pinus pinaster* seedlings with a microtapping method.

Area of study: The experiment was carried out at the Universidad Politécnica de Madrid in Spain.

Material and method: The experiment consisted of six treatments: control (no stimulant no wounding), wound (no stimulant), and pines stimulated with sulphuric acid, ethrel, salicylic acid and citric acid. We evaluated the resin yield differentiating between released resin and internal resin (resin retained within the xylem), and the physiological status of the tree.

Main results: Wounded plants produced on average three times more resin than control plants. Plants stimulated with salicylic and citric acids showed the highest resin yield and produced on average 15% more resin than those stimulated with sulphuric acid, mainly because the released resin was higher. Tree diameter affected resin yield and thicker trees produced more resin. We did not observe any significant effect of the treatments on stomatal conductance and only a marginal significant effect ($p<0.10$) on water potential.

Research highlights: Salicylic acid and citric acid seem to be promising stimulants for the resin tapping activity to be further tested in field experiments with adult trees.

Keywords: sulphuric acid; ethrel; pine resin; microtapping; wounding; water potential; stomatal conductance.

Abbreviations used: TR: total resin content; RR: released resin; IR: internal resin; gs: stomatal conductance; Yleaf: midday leaf water potential.

Authors' contributions: SM, ARG and RL conceived and design the experiment, SM, FR and RL performed the measurements, SM, ARG and RL analyzed the data, SM and RL drafted the manuscript, SM, ARG, LG and RL provided comments to the manuscript. ARG, LG and RL obtained funding and supervised the work.

Supplementary material: Figures S1 to S3, accompany the paper on FS website.

Received: 24 Mar 2020. **Accepted:** 31 Dec 2020.

Copyright © 2020 INIA. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-by 4.0) License.

Funding agencies/institutions	Project / Grant
European projects Interreg Sudoe SustForest Plus	SOE2/P5/E0598
GREENRESIN funded by the EIT-Climate KIC	190706

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Correspondence should be addressed to Rosana López: rosana.lopez@upm.es

Introduction

Humans have been using resin since prehistoric times, but the system of resin extraction at an industrial level began at the beginning of 18th century. The first non-destructive method was developed in France and was known as the "Hugues method". It consisted on wounding the tree trunk deeply in the xylem every 5-6 days to release the resin contained in the resin canals. One of the main concerns of this technique from the beginning was that resin tend to crystallize quickly and thus the flow is considerably reduced and eventually stops. In cold regions this effect was more evident, thus in countries such as Germany or Russia, with extensive areas of pine forests, resin production was scarce. From the 1930s tapping related research in these countries focused on the development of chemical stimulants to increase resin flow and avoid crystallization. A few years later, new trials with stimulants also began in the USA (Nájera & Rife, 1951). The results obtained were so promising that the Hugues method was progressively replaced by a less harmful method, "bark streak tapping", barely damaging the xylem and with the addition of the stimulant. This

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA DE MONTES, FORESTAL Y DEL MEDIO NATURAL

GRADO EN INGENIERÍA FORESTAL

PROYECTO FIN DE GRADO

ENSAYO DE MICRORRESINACIÓN CON PASTAS ESTIMULANTES EN *PINUS PINASTER*. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE RESINA Y CAMBIOS EN LOS FACTORES FISIOLÓGICOS Y DENDROMÉTRICOS DE LA PLANTA.

FIN DE GRADO

ANA RODRÍGUEZ DOMÍNGUEZ

2021

Rosana López Rodríguez **Aida Rodríguez García**

1

2.18.3. Estudio comparativo de estimulantes inductores de la resinación en condiciones de cultivo controlado

Producto 2.12. Caracterización de los efectos de formulaciones innovadoras de pasta estimulante sobre la producción de resina y el estado de la planta en condiciones controladas

Actividad. 2.18. Ensayo en condiciones controladas de formulaciones de pasta estimulante sobre plántula de Pinus pinaster y sus efectos en la producción y estado de la planta

Autores: Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes Forestal y del Medio Natural

Fecha: agosto 2021

Proyecto cofinanciado por el Programa Interreg Sudoe a través del Fondo Europeo de Desarrollo

Tabla de contenido

Introducción 3
Objetivos 5
Metodología 5
Material vegetal y tratamientos 5
Crecimiento y mediciones fisiológicas 9
Producción de resina 9
Análisis estadístico 10
Resultados 11
Crecimiento y parámetros fisiológicos 11
Producción de resina 12
Discusión 15
Conclusiones 17
Agradecimientos 17
Bibliografía 18

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 de 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 ($Al_2Si_2O_5(OH)_4$) 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; K. C. da S. 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 (K. 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 (K. 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.

Objetivos

La caracterización de los efectos de distintas formulaciones estimulantes supone una de las mejoras para el sector más demandada desde el colectivo resinero, clave de la rentabilidad de la actividad resinera, en la seguridad laboral y con mejores perspectivas de implementarse en la práctica. Los avances en los últimos años han supuesto una mejora importante en los compuestos, aunque presentan algunos inconvenientes como el coste de adquisición. Por otra parte, algunas aplicaciones de la resina natural exigen la ausencia de ácidos, que a día de hoy son denominador común de los estimulantes utilizados en la Península Ibérica. En este sentido, el testeo en condiciones controladas de nuevas formulaciones más económicas y/o con menores concentraciones de ácidos con antecedentes de éxito plantea una vía de mejora indudable. Los destinatarios principales de la acción serán los resineros, las empresas vinculadas a la producción y desarrollo de pastas de estimulación y las sociedades cooperativas y empresas que se dediquen a la resinación.

Este trabajo busca el establecimiento de los potenciales incrementos en producción y/o mejoras en el ratio coste-beneficio; un avance hacia el establecimiento de formulaciones concretas para la normalización y profesionalización de esta fase del aprovechamiento, la disminución del riesgo laboral y mejora de la calidad del producto al limitar o eliminar el uso de ácidos, contribuyendo todos estos puntos al objetivo específico del proyecto Mejorar las condiciones laborales del resinero.

Por último, el control sobre el estado fitosanitario de las plantas bajo el efecto de las distintas formulaciones contribuyendo a asegurar la sostenibilidad del aprovechamiento. Los resultados obtenidos serán aplicables y reproducibles a diferentes escalas

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.

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 (Figura 1).

Figura 1: Instalación de los individuos de estudio en la ETSI de Montes Forestal y del Medio Natural

Los ejemplares de *Pinus pinaster* con los que se ha contado para la realización del ensayo proceden de plántulas de la Serranía de Guadalajara (Figura 2), son de 3 savias. Se seleccionaron ejemplares con los criterios para la elección que fueron escoger los ejemplares con mayor altura y diámetro con el fin de obtener mayores cantidades de resina, puesto que, a mayor diámetro, mayor posibilidad de que existan canales resiníferos en su interior.

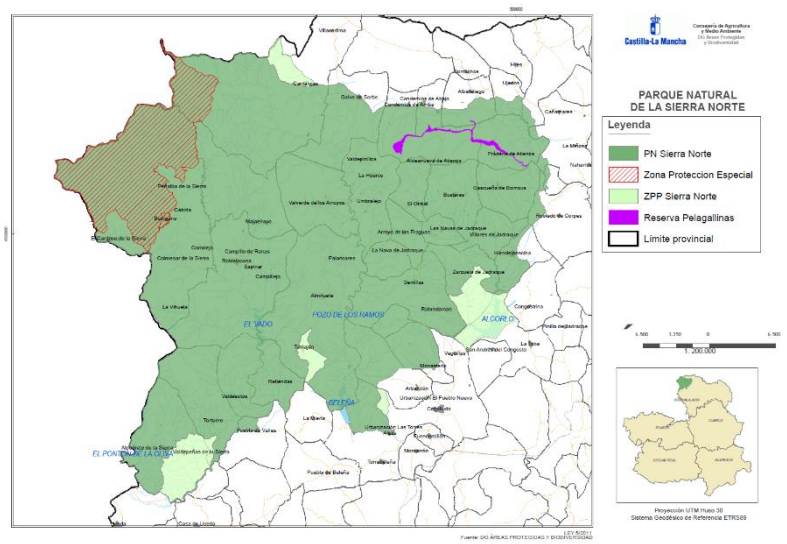


Figura 2: Localización de la Serranía de Guadalajara. (DG Áreas protegidas y Biodiversidad, 2011)

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). (Figura 3)

Figura 3: Pastas de estimulación usada en el ensayo

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. 4). 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. 4). 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. 4). Los tres tubos de cada árbol se recogieron a finales de septiembre.

Figura 4. 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.

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 4ºC 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 (Figura 5).

Figura 5: cámara de presión (modelo 1000, PMS Instrument Company) y porómetro (modelo SC-1, Decagon Devices Inc.)

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 -80ºC 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 20ºC 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 (Figura 6).

Figura 6: Recogida y análisis de muestras de madera para la extracción de resina

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 covariable. 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).

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 ± 3,5 cm y su diámetro medio de 13 ± 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 ± 1,1 cm, mientras que, en el resto de tratamientos, el crecimiento en altura medio fue de 3,7 ± 1,2 cm. En cuanto al crecimiento en diámetro, las plántulas estimuladas con Ethrel y ácido cítrico crecieron en diámetro casi el doble (3 ± 0,3 mm) que las control y las estimuladas con ácido sulfúrico y la pasta pretta (1,7 ± 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 mmol s-1 m-2 en el tratamiento salicílico y 287 mmol s-1 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 ± 12 mmol s-1 m-2 y la medición tras la primera pica 341 ± 12 mmol s-1 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 ± 10 mmol s-1 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 ± 0,1 MPa (Fig. 7).

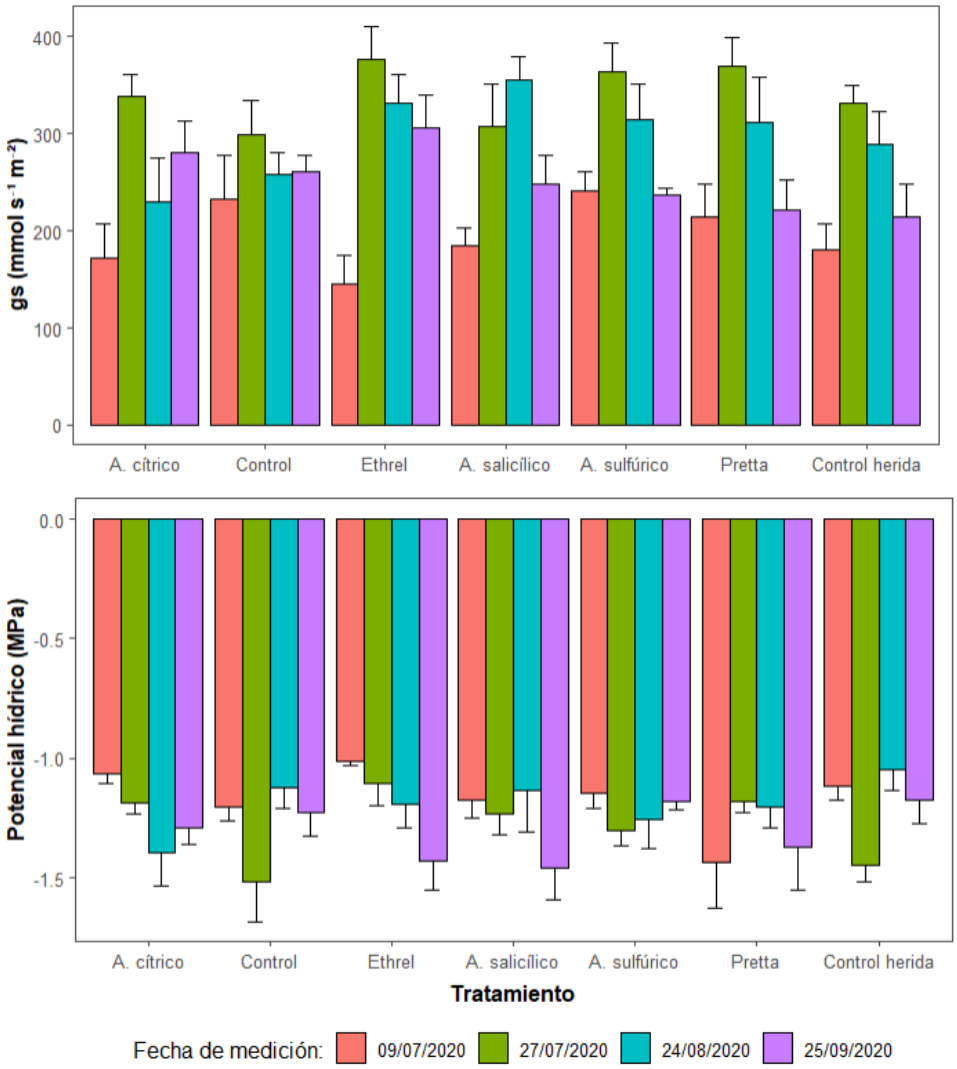


Figura 7. Conductancia estomática (arriba) y potencial hídrico (abajo) a lo largo del experimento de microrresinación realizado en 2020 con cinco pastas estimulantes y dos tratamientos control, uno sin herida y otro realizando la pica de resinación pero sin aplicación de estimulante.

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. 8). 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. 8).

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. 8). 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. 8). 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. 8). 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. 8).

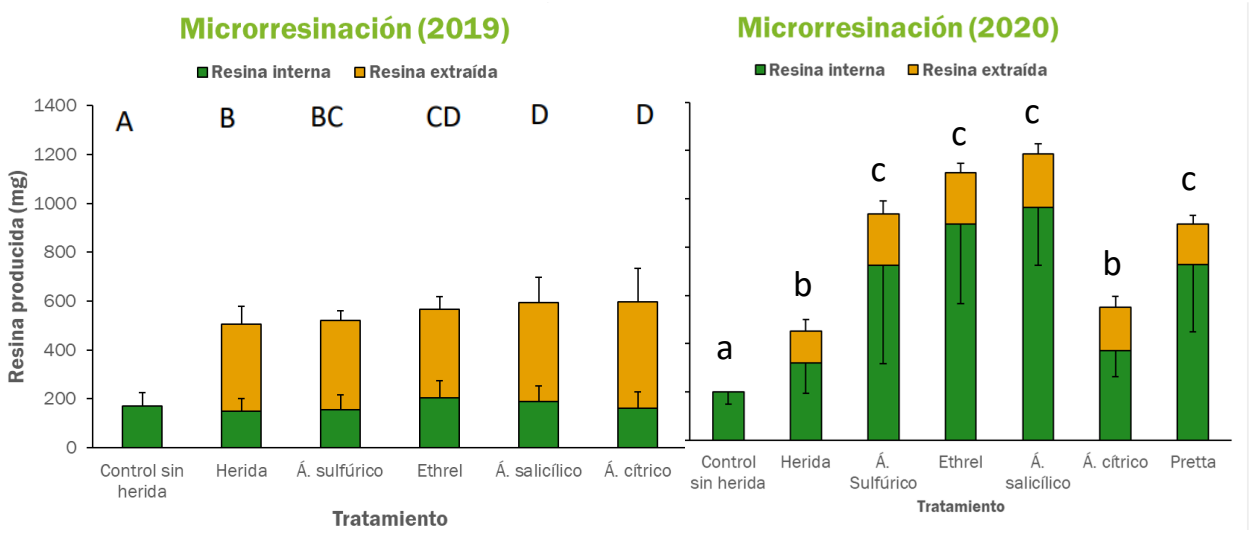


Figura 1. Producción de resina en los experimentos de microrresinación de 2019 y 2020. En verde la resina que permaneció en el interior de la planta, resina interna y en amarillo la resina extraída en los viales de resinación. Las letras mayúsculas se corresponden a diferencias en la producción de resina total. Las letras minúsculas se corresponden con diferencias en la resina interna.

En el segundo experimento observamos que la producción de resina aumenta ligeramente con el número de picas (Fig. 9). 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. 9). 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. 10).

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).

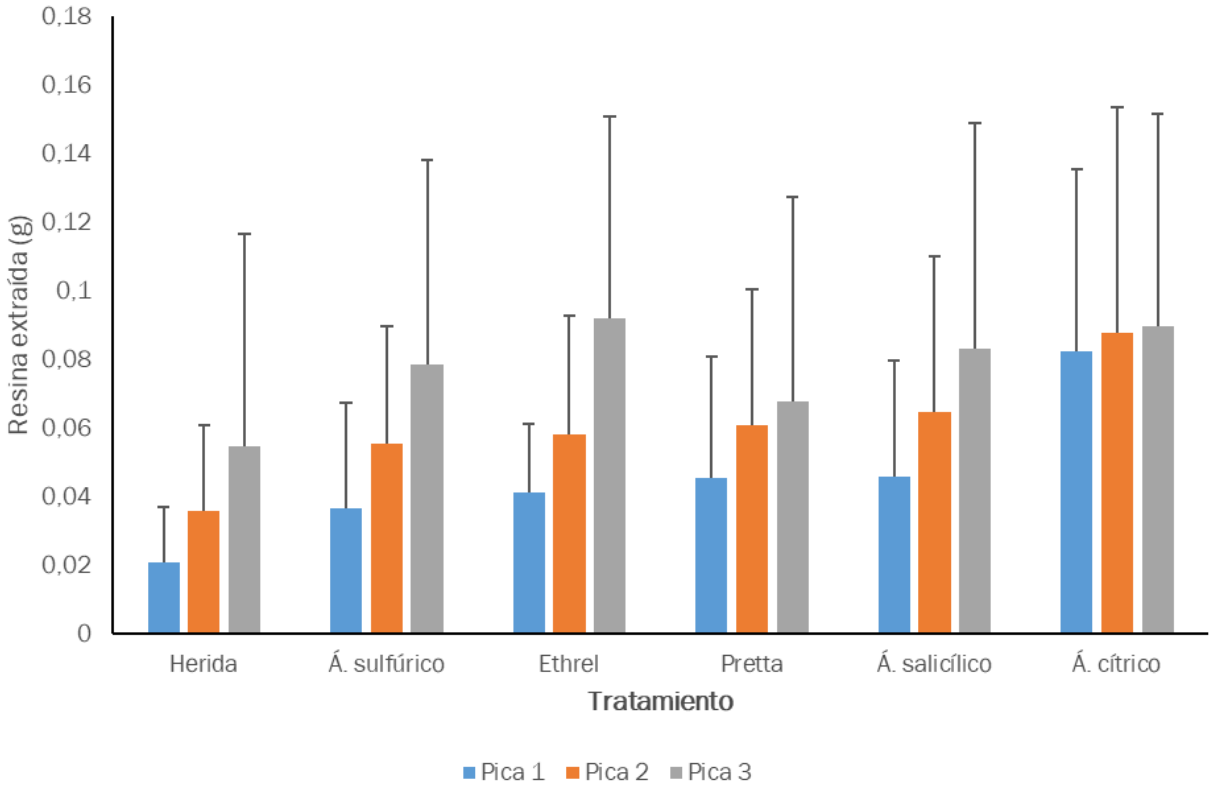


Figura 9. Resina extraída en cada una de las picas realizadas en el experimento de microrresinación del año 2020 con cinco pastas estimulantes y dos tratamientos control, uno sin herida y otro realizando la pica de resinación pero sin aplicación de estimulante.

Figura 10. 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

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 etilerno 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, Quiroga, et al., 2020), 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 (K. C. da S. 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).

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, cómo 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, Touza, et al., 2020)

Agradecimientos

Bibliografía

ABELES, F. B., MORGAN, P. W., & SALTVEIT, M. (2012). Ethylene in Plant Biology: Second Edition. En Ethylene in Plant Biology: Second Edition. https://doi.org/10.1016/C2009-0-03226-7

BERLANGA SANTAMARÍA, A. (1999). La industria resinera en Guadalajara. Un siglo de historia (1889-1989) (Diputación Provincial de Guadalajara, Ed.).

DE GEYTER, N., GHOLAMI, A., GOORMACHTIG, S., & GOOSSENS, A. (2012). Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci*, *17*(6), 349–359. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.001

FUSATTO, A. (2006). Pastas estimulantes em sistemas de resinagem de Pinus elliottii var. elliottii.

GERSHENZON, J. (1994). Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *Journal of Chemical Ecology*, *20*(6), 1281–1328. https://doi.org/10.1007/BF02059810

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*(3), 251–264. https://doi.org/10.1093/treephys/24.3.251

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*(4), 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*(4), 2134–2149. https://doi.org/10.1104/pp.103.037929

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. *Industrial Crops and Products*, *135*, 179–187. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.048

KANE, J. M., & KOLB, T. E. (2010). Importance of resin ducts in reducing ponderosa pine mortality from bark beetle attack. *Oecologia*, *164*(3), 601–609. https://doi.org/10.1007/s00442-010- 1683-4

KARUPPANAPANDIAN, T., MOON, J.-C., KIM, C., MANOHARAN, K., & KIM, W. (2011). Reactive oxygen species in plants: Their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aus 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. *Ecology Letters*, *3*(4), 329–339. https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00163.x

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. *Agricultural and Forest Meteorology*, *310*, 108634. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2021.108634

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*(1), 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. *Canadian Journal of Forest Research*, *37*(2), 343–355. https://doi.org/10.1139/X06-233

MCREYNOLDS, R. D., & KOSSUTH, S. V. (1984). CEPA in Sulfuric Acid Paste Increases Oleoresin Yields[1]. *Southern Journal of Applied Forestry*, *8*(3), 168–172. https://doi.org/10.1093/sjaf/8.3.168

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.). *Forest Systems*, *29*, eSC07. https://doi.org/10.5424/fs/2020293-16737

MITECO. (2021). *Anuario de Estadística Forestal 2019*.

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*(1), 94–100. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.05.015

MUÑOZ, L. H. (2006). *El antiguo oficio de resinero: Vol. HD 2116*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaria General Técnica. https://www.sdlmedioambiente.com/ficheros/hojadivulgativaresinero.pdf

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*.

NÁJERA Y ANGULO, F., & RIFÉ LAMPRECHT, M. P. (1951). Resinación con estimulantes químicos. Estudio general y experiencias realizadas en los pinares españoles. I. Acido clorhídrico. *Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias y Servicio de La Madera*. https://bibliotecadigital.infor.cl/handle/20.500.12220/5242

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. *Environmental and Experimental Botany*, *145*, 104–120. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.11.004

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 Biology*, *17*(4), 852–859. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/plb.12298

PICARDO, Á., & PINILLOS, F. (2013). La resinación en España y en el mundo en 2013: Situación y perspectivas. In MAGRAMA (Ed.), *II Simposio Internacional de Resinas Naturales* (pp. 30–53). Centro de Publicaciones del MAGRAMA.

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*(3), 371–378. https://doi.org/10.1007/s00468-007-0130-6

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. *Environmental and Experimental Botany*, *185*, 104410. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104410

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. *Industrial Crops and Products*, *27*(3), 322–327. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.11.010

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. *Industrial Crops and Products*, *30*(2), 316–320. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.06.004

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. *Food and Energy Security*, *1*(2), 81–93. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fes3.13

RODRIGUES-CORRÊA, K., & FETT-NETO, A. (2013). Seasonality and chemical elicitation of defense oleoresin production in field-grown slash pine under subtropical climate. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, *25*, 56–61. https://doi.org/10.1590/S2197-00252013000100007

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 Ecology and Management*, *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. *Agricultural and Forest Meteorology*, *202*, 83–93.

RUEL, J. J., AYRES, M. P., & LORIO PETER L, JR. (1998). Loblolly pine responds to mechanical wounding with increased resin flow. *Canadian Journal of Forest Research*, *28*(4), 596–602. https://doi.org/10.1139/x98-030

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(25), 9764–9768. https://doi.org/10.1021/jf0513819

SOLÍS, W., & ZAMORANO, J. L. (1974). Características y utilización de la «pasta IFIE» como estimulante de resinación. *Hoja Técnica INIA*.

TRAPP, S., & CROTEAU, R. (2001). DEFENSIVE RESIN BIOSYNTHESIS IN CONIFERS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *52*(1), 689–724. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.689

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*(1),

16760. https://doi.org/10.1038/s41598-020-73993-2

YANG, S. (1969). Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. *Plant Physiology*, *44*(8), 1203.

ZAS, R., QUIROGA, R., TOUZA, R., VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, C., SAMPEDRO, L., & LEMA, M. (2020). Resin tapping potential of Atlantic maritime pine forests depends on tree age and timing of tapping. *Industrial Crops and Products*, *157*, 112940.

ZAS, R., TOUZA, R., SAMPEDRO, L., LARIO, F. J., BUSTINGORRI, G., & LEMA, M. (2020). Variation in resin flow among Maritime pine populations: relationship with growth potential and climatic responses. *Forest Ecology and Management*, *474*, 118351.