



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

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

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-460

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

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Estrategias defensivas en *Pinus pinaster*: variación genética dentro y entre poblaciones en su metaboloma defensivo constitutivo e inducido.

LÓPEZ-GOLDAR, X.^{1,2,3*}; VILLARI, C.²; BORG-KARLSON, A. K.³; BONELLO, P. E.²; SAMPEDRO, L.¹; ZAS, R.¹

¹ Grupo de Ecología e Xenética Forestal, Misión Biológica de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Pontevedra, Galicia, España.

² Department of Plant Pathology, The Ohio State University, Columbus, OH, Estados Unidos.

³ Department of Chemistry, Organic Chemistry, KTH Royal Institute of Technology, School of Chemical Science and Engineering, Estocolmo, Suecia.

*Autor de correspondencia: xlgoldar@mbg.csic.es

Resumen

El pino marítimo es capaz de responder a herbívoros y patógenos modificando cualitativa y cuantitativamente su arsenal de defensas químicas. También se sabe que presenta variación genética en compuestos defensivos, como sucede con otros caracteres de historia vital, sin embargo, se conoce poco en qué medida la plasticidad (inducibilidad) de las defensas químicas al estrés biótico es variable a nivel intraespecífico y cómo la posible variación en plasticidad de dichos compuestos químicos está estructurada dentro y entre poblaciones. Con el objetivo de evaluar la variación genética intraespecífica en las defensas constitutivas y su inducibilidad realizamos un experimento en invernadero en el que estudiamos el perfil y concentración de terpenos y fenoles en réplicas clonales de diez poblaciones del rango de distribución natural de la especie con estructura familiar (colección CLONAPIN®). El daño por herbivoría fue simulado mediante metil-jasmonato, un análogo hormonal involucrado en la señalización del daño biótico. Hemos identificado y cuantificado 118 metabolitos secundarios en 260 plantas experimentales. Nuestros resultados muestran la especie presenta una gran variación dentro y entre poblaciones en el metaboloma defensivo constitutivo, mientras que la inducción con metil-jasmonato incrementó la concentración de forma generalizada en el conjunto de defensas químicas y no en compuestos individuales.

Palabras clave

1. Defensas, 2. fenoles, 3. pino marítimo, 4. terpenos, 5. variación intraespecífica.

1. Introducción

El pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) es una especie forestal modelo para estudios de variabilidad, pues presenta una enorme variación genética inter- e intrapoblacional en numerosos caracteres de historia vital, como por ejemplo en crecimiento (ALÍA et al. 1997, GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2004), reproducción (SANTOS DEL BLANCO et al. 2012), respuesta a estrés (TAPIAS et al., 2004) o metabolitos secundarios (ARRABAL et al., 2005) a lo largo de su rango de distribución. El origen de esta variación entre y dentro de poblaciones, asociada a los procesos de colonización postglacial, se ha discutido ampliamente sobre todo en las últimas dos décadas, utilizando marcadores moleculares de origen plastídico (flujo genético relacionado con dispersión de polen; VENDRAMIN et al., 1998; BUCCI et al., 2007), mitocondrial (flujo genético relacionado con dispersión de semillas; BURBAN & PETIT, 2003) y nuclear (SANTOS DEL BLANCO et al. 2012). En uno de los estudios más recientes en esta línea, JARAMILLO-CORREA et al. (2015) confirmaron la identificación de cinco regiones genéticamente definidas en la especie,

propuestas previamente por SANTOS DEL BLANCO et al. (2012), utilizando marcadores nucleares biparentales: Marruecos, Córcega, costa Atlántica de Francia y las regiones Atlántica y Mediterránea de la Península Ibérica. Esta variación genética y, por consiguiente, diferenciación contrastada entre regiones, también es evidente en los perfiles químicos de los componentes mayoritarios del metabolismo secundario del pino marítimo, como los terpenos (BARADAT & MARPEAU, 1988; ARRABAL et al., 2005; ARRABAL et al., 2012) y los fenoles (IDRISSI-HASSANI & LEBRETON, 1992; MEIJÓN et al., 2016). Los terpenos recibieron mayor atención de la mano de BARADAT & MARPEAU (1988), en los que identificaron tres grupos genéticos diferenciados (Atlántico, Mediterráneo y Magrebí) en base a su composición y abundancia en acículas. ARRABAL et al. (2005) obtuvo resultados similares, segregando dichos grupos por la diferencia en el perfil de α -pineno y ácido isopimárico en las procedencias estudiadas. En un estudio más exhaustivo de la variación poblacional del metaboloma de acículas de pino marítimo en un ambiente común, MEIJÓN et al. (2016) pudieron diferenciar dos grandes grupos, Atlántico y Mediterráneo, sugiriendo que la fuerte relación entre el contenido de flavonoides (un tipo particular de fenoles) y el régimen hídrico de la población de origen podría ser un parámetro indicador de la resistencia al estrés por sequía, un fenómeno con intensidad contrastable entre ambas regiones.

Los terpenos y fenoles comprenden un amplio abanico de defensas de origen carbonado que actúan como compuestos disuasorios o tóxicos frente a agentes bióticos (MUMM & HILKER, 2006; EYLES et al., 2010). Los terpenos son compuestos mayoritarios de la oleoresina, que se almacena y difunde a través de los canales resiníferos, y los fenoles son sustancias químicas sintetizadas y almacenadas en las células polifenólicas del parénquima (PHILIPPS & CROTEAU, 1999; FRANCESCHI et al., 2005). En los terpenos se diferencian la fracción volátil, compuesta por monoterpenos (C_{10}) y sesquiterpenos (C_{15}), y la no volátil, que incluye los diterpenos neutros y ácidos resínicos (C_{20}) (PHILIPPS & CROTEAU, 1999). Los fenoles se almacenan en las vacuolas de las células del parénquima y comprenden un conjunto muy diverso de compuestos entre los que se encuentran flavonoides, lignanos, estilbenos y ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos (MOORE et al. 2013). Estas defensas químicas pueden existir preformadas en los tejidos en ausencia de ataque (defensas constitutivas) o pueden sufrir modificaciones cuando se produce un estímulo de señalización de daño (defensas inducidas) en los que se producen cambios cualitativos y cuantitativos en el perfil de los compuestos defensivos (MUMM & HILKER, 2006; EYLES et al., 2010). Por ejemplo, en la especie que nos ocupa, *P. pinaster*, SAMPEDRO et al. (2011) encontraron que plantas dañadas por el curculiónido comedor de floema *Hylobius abietis* incrementaron considerablemente el contenido de resina no volátil en la zona del daño del tallo. En este mismo estudio, parte de las plantas fueron tratadas con metil jasmonato (MJ), un análogo hormonal que interviene en los procesos de señalización de daño para aumentar las defensas (MARTIN et al. 2002), y se observó que incrementaron su contenido de resina en un 40% y sufrieron menos daño por el insecto al finalizar el experimento. En otro estudio de resistencia a la herbivoría en campo, se encontró que la aplicación de MJ 25mM aumentó claramente la concentración de resina no volátil y polifenoles totales y confirió resistencia frente al gorgojo del pino en juveniles de *P. pinaster* (ZAS et al., 2014). MOREIRA et al. (2012) encontraron que la inducción por simulación de herbivoría aplicando MJ y con el insecto *H. abietis* incrementaron la concentración de defensas químicas en tallo (resina) y acículas (fenoles) de forma similar y clara en ambos casos.

El volumen de conocimiento existente es ingente en relación con la enorme variación genética entre y dentro de poblaciones a nivel molecular y en caracteres cuantitativos del metabolismo secundario, como los terpenos y fenoles. Además, la aparente concordancia entre los marcadores moleculares y compuestos químicos proporcionan una evidencia adicional de la importancia de los metabolitos secundarios en la segregación regional de la especie. Sin embargo, a día de hoy no existe un estudio que haya abordado cómo se estructura geográficamente la variación genética en la plasticidad (inducibilidad) de las defensas químicas al estrés biótico en el rango de distribución del pino marítimo.

2. Objetivos

En el presente trabajo se pretende explorar de forma exhaustiva cómo se estructura la variación genética en el metaboloma defensivo y su plasticidad al daño biótico en pinos, utilizando una colección clonal de procedencias con estructura familiar (CLONAPIN®) de la especie *Pinus pinaster* como modelo. Para ello, los objetivos que nos planteamos son i) estudiar si existe variación genética en los distintos tipos de defensas químicas entre y dentro de poblaciones y ii) estudiar si hay diferencias entre y dentro de poblaciones en la inducibilidad de las defensas tras el tratamiento de inducción por MJ.

3. Metodología

Diseño experimental

La distribución de las plantas se realizó siguiendo un diseño *split-plot* replicado en tres bloques con el factor MJ como principal, la Población (POB) como el factor *split*, y la Familia dentro de Población (F(POB)) como el factor *split-split*. Se utilizaron 260 plantas distribuidas en 10 poblaciones, con 3-5 familias por población, 3 genotipos por familia y 2 réplicas clonales por genotipo, de las cuales una se utilizó como planta Control (CTR) y a la otra se le aplicó metil-jasmonato (MJ), un compuesto análogo a la fitohormona vegetal que simula respuestas defensivas inducidas a la herbivoría (MARTIN et al. 2002).

Material vegetal, condiciones del invernadero y tratamiento de inducción

Se seleccionaron diez poblaciones de pino marítimo a lo largo de un gradiente latitudinal de todo su rango de distribución (Tabla 1). Las poblaciones proceden de la colección CLONAPIN®, material vegetal de referencia con estructura familiar y clonal (MAJADA et al., 2009).

Tabla 1. Ubicación de las poblaciones estudiadas.

Código	Población	Origen	Latitud	Longitud
ARMY	Armayán	Norte de España	43° 18' N	6° 29' 0
ASPE	Arenas de San Pedro	Centro de España	40° 12' N	5° 03' 0
CDVO	Cadavedo	Norte de España	43° 32' N	6° 25' 0
COCA	Coca	Centro de España	41° 15' N	4° 30' 0
MIMI	Mimizán	Francia	44° 08' N	1° 18' 0
ORIA	Oria	Sureste de España	37° 31' N	2° 21' 0
PLEU	Pleucadeuc	Francia	47° 46' N	2° 20' 0
PTOV	Puerto de Vega	Norte de España	43° 33' N	6° 38' 0
SCRI	San Cipriano de Ribarteme	Noroeste de España	42° 07' N	8° 21' 0
TAMR	Tamrabta	Marruecos	33° 36' N	5° 01' 0

Los individuos, obtenidos a partir de micropropagación (ÁLVAREZ et al. 2011) en el SERIDA (Asturias), se transportaron a las instalaciones de la Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC) a los dos años de edad. Se mantuvieron en invernadero en condiciones controladas de temperatura y humedad durante unos meses para permitir su aclimatación al nuevo entorno, y a continuación se comenzaron los tratamientos de simulación de herbivoría. Las plantas asignadas al tratamiento de inducción (MJ) se trasladaron a otra cámara del invernadero para evitar la contaminación cruzada y se les aplicó una solución de metil-jasmonato 25 mM (~10 mL por planta) mientras que a las plantas control (CTR) se les aplicó el mismo volumen de la solución portadora sin metil jasmonato.

Muestreo y análisis químico

Un mes después de la inducción, todas las plantas se cosecharon cortando el tallo por encima del nivel del suelo. Inmediatamente se muestrearon dos fragmentos de 2 cm de largo de cada tallo, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Una de las submuestras de tallo se utilizó para análisis de terpenos por cromatografía de gases-espectrometría de masas/ionización de llama (GC-MS/FID) y la otra para análisis de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de ultra resolución y espectrometría de masas/detector diodo array (UPLC-MS-DAD). La extracción de terpenos a partir de uno de los fragmentos de tallo se realizó siguiendo el procedimiento de SAMPEDRO et al. (2010), utilizando pentadecano y ácido heptadecanoico como estándares internos para los terpenos volátiles (monoterpenos y sesquiterpenos) y diterpenos (derivatizados con hidróxido de tetrametilamonio y analizados como metil ésteres), respectivamente. En el caso de los compuestos fenólicos, la extracción se llevó a cabo utilizando la metodología descrita en VILLARI et al. (2012), utilizando resorcinol como estándar interno.

La identificación de los terpenos volátiles y de los diterpenos se llevó a cabo en el grupo de Chemical Ecology del Royal Institute of Technology (Estocolmo, Suecia) por GC-MS utilizando un HP6890 equipado con una columna capilar DB-5 (30 m, di 0.25 mm, grosor del recubrimiento 0.25 μ m, Agilent Technologies, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas HP5973 (Agilent Technologies, CA, USA). Se inyectó 1 μ L de muestra en modo *splitless*, utilizando Helio como gas portador con un flujo constante de 0.9 mL \cdot min⁻¹. El método del horno para los terpenos volátiles se programó inicialmente a 40 °C durante 2 minutos, seguida de una rampa de temperatura de 4 °C \cdot min⁻¹ hasta 200 °C, y después por una segunda rampa de 10 °C \cdot min⁻¹ hasta 250 °C, temperatura que se mantuvo hasta el final durante 5 minutos. El método del horno para los diterpenos comenzó a 152 °C durante 2 min, seguido de una rampa de temperatura de 3 °C \cdot min⁻¹ hasta alcanzar los 260 °C y se mantuvo a dicha temperatura durante 5 min.

La identificación de los picos en cada cromatograma se basó en: 1) la comparación de sus tiempos de retención y sus espectros de masas con los de compuestos estándar disponibles, 2) la correspondencia con las librerías NIST y Wiley incluidas en el software de análisis y 3) comparando el Índice de Retención de Kovat calculado (KI_c) con el publicado en la literatura (Adams, 2007; KI_L) utilizando el mismo tipo de columna. La cuantificación de los terpenos volátiles se hizo utilizando los datos de los análisis de GC-MS mientras que, en el caso de los diterpenos, se cuantificaron por GC-FID en un equipo Perkin Elmer Clarus 500 equipado con una columna Elite-5 (Perkin Elmer, MA, USA) de idénticas características a la DB-5 usada para GC-MS, acoplado a un detector de ionización de llama. Todos los parámetros y métodos de análisis se configuraron de manera análoga a los del GC-MS. La estimación de la concentración de los terpenos volátiles como de diterpenos se llevó a cabo aplicando las curvas de calibrado ($R^2 > 0.9999$) de los compuestos estándar sobre las áreas de los compuestos problema. Las concentraciones se obtuvieron en mg \cdot g⁻¹ de peso seco de tallo.

La identificación de los fenoles se realizó en el Laboratorio de Metabolómica Dirigida de la Ohio State University (Columbus, OH) con un UPLC 1290 (Agilent Technologies, CA, USA) utilizando una columna Acquity UPLC® BEH C₁₈ (50 x 2.1 mm di, 130Å, 1.7 μ m de tamaño de

poro, Waters, MA, USA), acoplado a un detector diodo array en línea con espectrómetro de masas 5500 (QTRAP, AB Sciex, MA, USA). La fase binaria móvil de solventes consistió en 0.1% de ácido acético en agua (solvente A), y 0.1% de ácido acético en metanol (solvente B), con un flujo constante de 0.42 mL·min⁻¹. Se utilizó el siguiente gradiente lineal (tiempo acumulado de análisis (min), % solvente A): 0.0, 93; 4.5, 85; 10.0, 70; 13.0, 10; 15.0, 0; 16.5, 0; 17.0, 93; 17.5, 93; 21.0, 93 (tiempo total de análisis: 21 minutos). Los datos espectrales del diodo array se optimizaron para detectar los fenoles a 280 nm. Los compuestos fenólicos se identificaron solapando el escaneo completo de cromatogramas de los espectros de masas y los cromatogramas de DAD trazados a 280 nm para realizar las correspondencias de los tiempos de retención de iones parentales [M-H]⁻ a las longitudes de onda máximas de compuestos individuales. Los compuestos se identificaron en base a la fragmentación de los iones, congruencia de la longitud de onda máxima y tiempo de retención respecto a los compuestos estándar y la literatura relacionada existente (VILLARI et al. 2012 y referencias relacionadas dentro). La cuantificación se realizó en el Plant Pathology Department de la Ohio State University (Columbus, OH) con un Acquity UPLC[®] H-class, utilizando la misma columna, fase binaria móvil y parámetros cromatográficos que en el proceso de identificación, acoplado a un detector de fotodiodo (PDA) (Waters, MA, USA). La concentración de compuestos fenólicos se obtuvo a partir de las curvas de calibrado ($R^2 > 0.999$) de compuestos estándar sobre las áreas de los compuestos problema. Las concentraciones se obtuvieron en mg·g⁻¹ de peso fresco de tallo.

Análisis estadísticos

Se identificaron y cuantificaron un total de 118 compuestos. Para caracterizar la variación genética de las poblaciones de la especie en su perfil químico constitutivo e inducido, los compuestos se resumieron en 4 variables defensivas, sumando todos los compuestos de una misma categoría por su naturaleza química: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y fenoles. Estas cuatro variables se exploraron en un Análisis de Componentes Principales (PCA) y posteriormente se ajustaron (junto con los dos componentes extraídos del PCA) a un modelo mixto.

El Análisis de Componentes Principales (PCA) se hizo utilizando el procedimiento PRINCOMP en SAS, en el que se incluyeron los 4 grupos de compuestos para explorar el perfil químico de las defensas de las poblaciones en los estados constitutivo e inducido por MJ. Se extrajeron los dos primeros componentes (PC1 y PC2) con la finalidad de representar en el espacio multivariante cómo se distribuyen las diez poblaciones.

Los dos primeros componentes y las 4 variables de defensas químicas se ajustaron en un modelo mixto utilizando el procedimiento MIXED en SAS con los siguientes factores: tratamiento de inducción (metil jasmonato, MJ), población (POB), familia (F dentro de POB, F(POB)), bloque (B) y el genotipo (G). Para estudiar la variación genética en las defensas constitutivas e inducidas (control y MJ) entre y dentro de poblaciones de pino marítimo, se ajustó un modelo considerando MJ, POB y F(POB) y las interacciones MJ×POB y MJ×F(POB) como factores fijos. El B y G y las interacciones B×MJ y B×MJ×POB se consideraron como factores aleatorios para analizar el efecto principal del MJ y el efecto de POB con el término del error apropiado en diseños *split-split* (LITTELL et al. 2006). Los datos se muestran como medias de mínimos cuadrados ± error estándar.

Finalmente, debido a que el tratamiento de inducción no pareció afectar de manera individual a cada grupo de compuestos y tampoco se visualiza un efecto claro en cada uno de los componentes, se realizó un Análisis de la Varianza Multivariante (MANOVA) utilizando el procedimiento GLM en SAS con las 4 variables defensivas para testar estadísticamente el efecto global del tratamiento de inducción sobre todo el conjunto de defensas.

4. Resultados

El PCA muestra el conjunto de poblaciones distribuidas en el espacio multivariante (Figura 1a). Los dos componentes extraídos tras el análisis absorbieron el 81.58% de toda la variación acumulada existente en los 4 grupos principales de defensas. El componente 1 (PC1) comprendió un 56.6% de la variación explicada y mostró una relación muy estrecha con todos los terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos; Figura 1b). El componente 2 (PC2) englobó un 24.98% de la variación explicada y mostró una alta relación con los fenoles (Figura 1b).

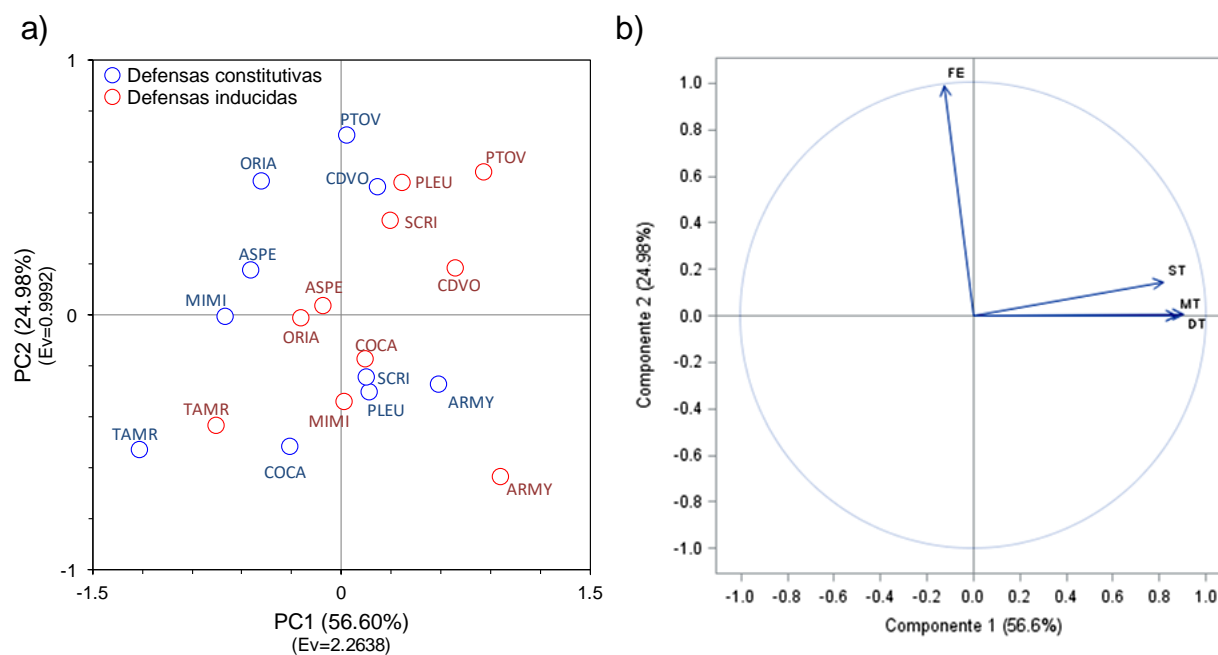


Figura 1. a) Representación gráfica de las defensas constitutivas (círculos azules) e inducidas (círculos rojos) con metil jasmonato de las diez poblaciones de pino marítimo en el espacio multivariante tras el Análisis de Componentes Principales; b) patrón vectorial de las variables analizadas y su relación con los dos componentes. N = 6-15 individuos por población y tratamiento. MT: monoterpenos, ST: sesquiterpenos; DT: diterpenos; FE: fenoles.

En la figura 1a se observa un incremento general del PC1 en las poblaciones (mayor concentración de terpenos) tras la inducción por MJ. En el caso del PC2, las poblaciones que menos concentración constitutiva de fenoles presentan (TAMR, COCA, PLEU, SCRI) son las que incrementan sus niveles tras la inducción (excepto ARMY), y aquellas con mayor concentración constitutiva disminuyen sus niveles tras la aplicación del MJ.

Los resultados del modelo mixto ajustado a las 6 variables (los 4 grupos de compuestos y los 2 componentes extraídos) se resumen en la Tabla 2. Todas las variables analizadas presentaron una variación entre poblaciones significativa ($P < 0.01$) y tres de ellas mostraron también variación familiar clara (monoterpenos, $P = 0.046$; fenoles, $P = 0.01$; PC2, $P = 0.019$). Además, los fenoles fue la única variable que mostró una interacción MJ×POP significativa ($P = 0.034$). No se encontraron efectos significativos del tratamiento de inducción MJ ni en la interacción MJ×F(POP) en alguna de las variables individuales, si bien los monoterpenos mostraron valores marginales cercanos al umbral de significación para el factor MJ ($P = 0.062$).

Tabla 2. Resumen del modelo mixto para los grupos de compuestos y los dos componentes principales en relación al análisis de defensas constitutivas e inducidas para diez poblaciones de pino marítimo, mostrando los efectos del tratamiento de inducción (MJ), Población (POP), Familia dentro de Población (F(POP)) y las interacciones MJ×POP y MJ×F(POP). Los P-valores significativos ($P < 0.05$) se resaltan en negrita.

Variable	Inducción (MJ)		Población (POB)		Familia (F(POP))		MJ×POB		MJ×F(POP)	
	$F_{1,2}$	P-valor	$F_{9,36}$	P-valor	$F_{38,50}$	P-valor	$F_{9,36}$	P-valor	$F_{38,50}$	P-valor
PC1 (terpenos)	4.79	0.160	7.13	<0.001	1.19	0.287	0.39	0.932	0.77	0.796
PC2 (fenoles)	0.03	0.887	3.67	0.002	1.93	0.019	2.04	0.063	1.33	0.181
Monoterpenos	14.5	0.062	4.98	<0.001	1.66	0.046	0.89	0.544	0.78	0.785
Sesquiterpenos	0.66	0.501	20.6	<0.001	1.49	0.095	0.25	0.985	1.1	0.368
Diterpenos	4.99	0.155	6.18	<0.001	1.24	0.239	0.63	0.765	1.01	0.484
Fenoles	0	0.967	3.31	0.005	2	0.010	2.34	0.034	1.33	0.167

Debido a las diferencias estadísticas detectadas a nivel del factor Población, se muestran las medias de mínimos cuadrados (\pm error estándar) de las diez poblaciones para los niveles constitutivos de los principales grupos de defensas en la Tabla 3.

Tabla 3. Medias de mínimos cuadrados (\pm s.e.) de las concentraciones constitutivas de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y fenoles de las diez poblaciones de pino marítimo. Valores con las mismas letras indican que no son significativamente diferentes entre sí.

Población	Monoterpenos	Sesquiterpenos	Diterpenos	Fenoles
Armayán (ARMY)	6.94 \pm 1.18 ^a	2.38 \pm 0.27 ^a	16.51 \pm 2.64 ^a	8.37 \pm 0.51 ^d
Arenas de San Pedro (ASPE)	5.14 \pm 0.60 ^{b,c}	0.81 \pm 0.05 ^{c,d}	11.74 \pm 1.53 ^{e,d}	11.28 \pm 1.43 ^{b,a,c}
Cadavedo (CDVO)	5.94 \pm 0.71 ^{b,a,c}	2.27 \pm 0.38 ^a	17.00 \pm 2.97 ^{b,d,a,c}	11.08 \pm 1.14 ^{b,a,c}
Coca (COCA)	6.55 \pm 0.44 ^{b,a}	0.99 \pm 0.18 ^c	12.73 \pm 0.95 ^{e,b,d,c}	9.03 \pm 0.71 ^{d,c}
Mimizán (MIMI)	4.30 \pm 0.51 ^{b,c}	0.85 \pm 0.24 ^c	9.11 \pm 0.76 ^{e,f}	10.53 \pm 0.48 ^{b,c}
Oria (ORIA)	4.98 \pm 0.74 ^c	1.10 \pm 0.03 ^{c,b}	13.57 \pm 1.93 ^{e,d,c}	12.10 \pm 1.79 ^{b,a}
Pleucadeuc (PLEU)	7.68 \pm 0.81 ^{b,a}	1.13 \pm 0.19 ^{c,e}	16.19 \pm 1.80 ^{e,b,d,a,c}	8.71 \pm 1.33 ^{b,d,a,c}
Puerto de Vega (PTOV)	5.45 \pm 0.60 ^{b,a,c}	2.04 \pm 0.19 ^a	15.34 \pm 1.99 ^{b,a}	11.69 \pm 1.29 ^a
San Cipriano (SCRI)	6.61 \pm 0.59 ^{b,a}	1.66 \pm 0.32 ^e	17.51 \pm 3.54 ^{b,a,c}	9.06 \pm 0.38 ^{b,c}
Tamrabta (TAMR)	3.09 \pm 0.18 ^d	0.34 \pm 0.08 ^d	6.11 \pm 0.41 ^f	9.71 \pm 1.72 ^{d,c}

Los rangos de concentraciones de los distintos tipos de defensas varían según la naturaleza de los compuestos, llegando a observarse diferencias claramente contrastables en las poblaciones de mayor y menor concentración entre compuestos. Por ejemplo, los fenoles son los compuestos que menos variación presentan entre poblaciones en relación con los terpenos, registrándose diferencias de un 44% entre las poblaciones con mayor y menor concentración, mientras que los sesquiterpenos presentan diferencias de más de un 600% entre la población de mayor concentración respecto a la población con menor concentración. La población que menos concentración de defensas constitutivas presenta de forma general es Tamrabta (Marruecos), mientras que la que registra los mayores niveles es San Cipriano (Noroeste de España).

A pesar de que no se encontró un efecto claro del tratamiento de inducción en las variables individuales, testamos mediante un MANOVA el efecto global del MJ sobre los cuatro compuestos defensivos (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y fenoles). Se encontró un efecto significativo del MJ sobre el conjunto de variables ($\lambda_{\text{Wilks}}=0.7482$, $P<0.001$).

5. Discusión

Los resultados del presente trabajo demuestran que existe una enorme variación genética entre y dentro de poblaciones para el conjunto de defensas químicas estudiadas, si bien ésta es mucho más importante a nivel constitutivo que tras la inducción. También es relevante que la inducción por MJ tuvo efecto a nivel de todo el metaboloma y no a nivel de compuestos individuales.

El análisis de Componentes Principales sugiere que las poblaciones se distribuyen aproximadamente siguiendo un gradiente latitudinal en relación con los niveles de terpenos (PC1) y que esta distribución se mantiene tras la inducción por MJ, incrementándose la concentración en todas las poblaciones. Los grupos que se pueden distinguir en base al PC1 son las procedencias Atlánticas (ARMY, SCRI, PLEU, PTOV y CDVO), del Centro-Este de España (ASPE, COCA, ORIA) y Marruecos (TAMR). Una distribución similar se encontró en estudios previos basada en niveles constitutivos de terpenos (ARRABAL et al. 2005), aunque se obtuvo a partir de la diferencia en sólo un monoterpeno y un ácido resínico (α -pineno y ácido isopimárico). Resultados análogos se pueden extraer de estudios basados en marcadores moleculares (BUCCI et al., 2007; SANTOS-DEL-BLANCO et al., 2012; JARAMILLO-CORREA et al., 2015) en los que las regiones genéticas Atlántica y de Centro-Este de España y Marruecos identificadas parecen corresponderse con la distribución de las poblaciones según el perfil de terpenos (PC1). La población Atlántica francesa MIMI, que muestra un perfil genético diferenciado junto con PLEU del resto de regiones (JARAMILLO-CORREA et al. 2015), presenta, sin embargo, un quimiotipo muy similar a las del Centro-Este de España. Curiosamente, esta población mostró también que su tamaño mínimo cuando presenta la primera reproducción femenina es muy similar a las poblaciones del Centro-Este de España (SANTOS DEL BLANCO et al. 2012). Este comportamiento fenotípico singular y aparentemente próximo a la región central Ibérica podría deberse a que dicha población está en su segunda rotación de selección por crecimiento y, por tanto, otros caracteres, como los evaluados en este trabajo, podrían haberse visto afectados por dicho proceso selectivo. Respecto a los fenoles (PC2), las poblaciones parecen distribuirse en dos grupos con alta (PTOV, CDVO, ORIA, ASPE, MIMI) y baja (SCRI, PLEU, ARMY, COCA, TAMR) concentración constitutiva de fenoles. Tras la inducción, estos dos grupos modificaron los niveles de los fenoles de manera distinta: las poblaciones con niveles constitutivos más bajos incrementaron la concentración (a excepción de ARMY) mientras que aquellas con concentración constitutiva más elevada la redujeron. Esta observación se confirmó con la interacción significativa MJ \times POB del modelo mixto para los fenoles ($F_{9,36}=2.34$, $P=0.034$). Aparentemente, este tipo de compuestos parecen estar sujetos a un compromiso entre los niveles constitutivos y la producción de nuevas defensas inducidas, aunque esto podría tener efectos globales al conjunto de todas las defensas (por ejemplo, ARMY fue la población con mayor concentración constitutiva e inducida de terpenos, lo que posiblemente afectó a la inducibilidad de los fenoles).

Esto puede deberse a que si un linaje está bien defendido de forma constitutiva, no es esperable que desarrolle la capacidad de asignar recursos a la producción de defensas inducidas (KARBAN & MYERS, 1989; AGRAWAL et al., 2010).

La variación observada en la distribución de las poblaciones en el espacio multivariante del PCA se estudió posteriormente con un modelo mixto analizando las 4 variables de defensa y los dos PCs. Los resultados confirman lo previamente observado en el PCA, encontrándose una variación significativa clara entre poblaciones para todas las variables (Tabla 2) y una variación familiar para los monoterpenos ($F_{38,50}=1.66$, $P=0.046$) y los fenoles ($F_{38,50}=2.00$, $P=0.010$). Se ha observado en otros estudios que la inducción por MJ no afectó a las variables estudiadas de forma individual (LOMBARDERO et al., 2013) como en este trabajo, sin embargo sí hemos observado un efecto claro del MJ tras analizar el conjunto de todas las defensas químicas (MANOVA $\lambda_{Wilks}=0.7482$, $P<0.001$). Este resultado indica que la respuesta de las plantas a la inducción de sus defensas químicas no siempre es equivalente a un incremento claro respecto a la concentración de sus niveles constitutivos individuales, como se ha ido demostrando en la última década en multitud de trabajos (MARTIN et al., 2002; SCHMIDT et al., 2005; MOREIRA et al., 2012; SAMPEDRO et al., 2011; ZAS et al., 2014), sino que es posible que las plantas respondan a la inducción incrementando ligeramente y de manera generalizada todo el arsenal defensivo en lugar de unos pocos compuestos y en gran magnitud.

6. Conclusiones

En este trabajo destacamos que la especie *Pinus pinaster* presenta una gran variación genética entre y dentro de poblaciones en su metaboloma defensivo, y que la inducción por una fitohormona señalizadora de daño se produce de manera generalizada en el conjunto de las defensas químicas y no en compuestos individuales. Los datos aportados en este trabajo sugieren además que las poblaciones muestran una respuesta similar en la inducción de los terpenos y que, aparentemente, existe un compromiso entre los niveles constitutivos e inducidos de fenoles.

7. Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Juan Majada y al personal colaborador del SERIDA por proporcionarnos el material de pino marítimo utilizado en este experimento. A José Carlos Rodríguez y Santiago Rodal (Viveros Figueirido, NORFOR, Pontevedra), a César Cendán y al personal de campo de la Misión Biológica de Galicia por el apoyo durante el mantenimiento y procesado de las plantas; a Luz Pato, Helena Pazó y Silvana Poceiro por su asistencia en el establecimiento del experimento, evaluación y procesado. Esta investigación está financiada por el Gobierno de España a través del proyecto FENOPIN (AGL2012-40151-C03-01 MINECO/FEDER) y FUTURPIN (AGL2015-68274-C03-02-R MINECO/FEDER). Xosé López-Goldar obtuvo financiación a través de una ayuda predoctoral de la Fundación Pedro Barrié de la Maza (2013-2014) y de una ayuda predoctoral del programa FPI (2014-actualmente).

8. Bibliografía

AGRAWAL, A.A.; CONNER, J.K.; RASMANN, S. 2010. Tradeoffs and adaptive negative correlations in Evolutionary ecology. En: M.A. Bell, W.F. Eanes, D.J. Futuyma and J.S. Levinton (eds.): Evolution After Darwin: the First 150 Years, 26 pp. Sinauer Associates.

ALIA, R.; MORO, J.; DENIS, J.B. 1997. Performance of *Pinus pinaster* provenances in Spain: interpretation of the genotype by environment interaction. *Can. J. For. Res./Rev. Can. Rech. For.*, 27 (10), 1548-1559.

- ARRABAL, C.; CORTIJO, M.; DE SIMÓN, B.F.; GARCÍA VALLEJO, M.C.; CADAHÍA, E. 2005. Differentiation among five Spanish *Pinus pinaster* provenances based on its oleoresin terpenic composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, 33 (10), 1007-1016.
- ARRABAL, C.; GARCÍA-VALLEJO, M.C.; CADAHIA, E.; CORTIJO, M.; DE SIMÓN, B.F. 2012. Characterization of two chemotypes of *Pinus pinaster* by their terpene and acid patterns in needles. *Plant. Sys. Evol.*, 298 (2), 511-522.
- BARADAT, P.; MARPEAU, A. 1988 Le pin maritime *Pinus pinaster* Ait : biologie et génétique des terpènes pour la connaissance et l'amélioration de l'espèce. PhD Thesis, 541 pp. Université de Bordeaux.
- BUCCI, G.; GONZALEZ-MARTINEZ, S.C.; LE PROVOST, G.; PLOMION, C.; RIBEIRO, M.M.; SEBASTIANI, F.; ALÍA, R.; VENDRAMIN, G. 2007. Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Mol. Ecol.*, 16 (10), 2137-2153.
- BURBAN, C.; PETIT, R.J. 2003 Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers having contrasted inheritance. *Mol. Ecol.*, 12 (6), 1487-1495.
- EYLES, A.; BONELLO, P.; GANLEY, R.; MOHAMMED, C. 2010. Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytol.*; 185 (4), 893-908.
- FRANCESCHI, V.R.; KROKENE, P.; CHRISTIANSEN, E.; KREKLING, T. 2005. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytol.*; 167 (2), 353-375.
- GONZALEZ-MARTINEZ, S.C.; MARIETTE, S.; RIBEIRO, M.M.; BURBAN, C.; RAFFIN, A.; CHAMBEL, M.R.; RIBEIRO, C.; AGUIAR, A.; PLOMION, C.; ALÍA, R.; GIL, L.; VENDRAMIN, G.; KREMER, A. 2004. Genetic resources in maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton): molecular and quantitative measures of genetic variation and differentiation among maternal lineages. *For. Ecol. Manage.*, 197 (1-3), 103-115.
- IDRISSI-HASSANI, M.; LEBRETON, P. 1992 Les flavonöids du Pin Maritime: une approche chimiotaxonomique. *Forêt Méditerranéene*, 13 (1), 6.
- JARAMILLO-CORREA, J.P.; RODRIGUEZ-QUILON, I.; GRIVET, D.; LEPOITTEVIN, C.; SEBASTIANI, F.; HEUERTZ, M.; GARNIER-GERE, P.; ALÍA, R.; PLOMION, C.; VENDRAMIN, G.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. 2015 Molecular proxies for climate maladaptation in a long-lived tree (*Pinus pinaster* Aiton, Pinaceae). *Genetics*, 199 (3), 793-807.
- KARBAN, R.; MYERS, J. 1989. Induced plant responses to herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 20, 331-348.
- LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W.; WOLFINGER, R.; SCHABENBERGER, O. 2006. SAS System for Mixed Models. 2nd ed. SAS Institute Inc.: Cary, NC.
- LOMBARDERO, M.J.; PEREIRA-ESPINEL, J.; AYRES, M.P. 2013. Foliar terpene chemistry of *Pinus pinaster* and *P. radiata* responds differently to Methyl Jasmonate and feeding by larvae of the pine processionary moth. *For. Ecol. Manage.*, 310, 935-943.
- MAJADA, J.; ARANDA, I.; JARAMILLO-CORREA, J.P.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.; CLIMENT, J.; CERVERA, M.; KIDELMAN, A.; FEITO, I.; ALÍA, R. 2009. Miniestaquillado de *Pinus pinaster* y

establecimiento de un banco clonal de referencia CLONAPIN. Actas del 5º Congreso Forestal Español: Montes y Sociedad. Saber qué hacer. 10 pp. Ávila.

MAJADA, J.; MARTÍNEZ-ALONSO, C.; FEITO, I.; KIDELMAN DANTAS, A.; ARANDA, I.; ALÍA, R. 2011. Minicuttings; an effective technique for the propagation of *Pinus pinaster* Ait. *New Forests*, 41, 14.

MARTIN, D.; THOLL, D.; GERSHENZON, J.; BOHLMANN, J. 2002. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiol.*, 129 (3), 1003-1018.

MEIJON, M.; FEITO, I.; ORAVEC, M.; DELATORRE, C.; WECKWERTH, W.; MAJADA, J.; VALLEDOR, L. 2016 Exploring natural variation of *Pinus pinaster* Aiton using metabolomics: Is it possible to identify the region of origin of a pine from its metabolites? *Mol. Ecol.*; 25 (4), 959-976.

MOORE, B.D.; ANDREW, R.L.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W.J. 2013. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytol.*; 201 (3), 733-750.

MOREIRA, X.; ZAS, R.; SAMPEDRO, L. 2012 Quantitative comparison of chemical, biological and mechanical induction of secondary compounds in *Pinus pinaster* seedlings. *Trees*, 26 (2), 677-683.

MUMM, R.; HILKER, M. 2006 Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects. *Trends Plant Sci.*; 11 (7), 351-358.

PHILLIPS, M.A.; CROTEAU, R.B. 1999 Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci.*; 4 (5), 184-190.

SAMPEDRO, L.; MOREIRA, X.; LLUSIA, J.; PEÑUELAS, J.; ZAS, R. 2010. Genetics, phosphorus availability, and herbivore-derived induction as sources of phenotypic variation of leaf volatile terpenes in a pine species. *J. Exp. Bot.*; 61 (15), 4437-4447.

SAMPEDRO, L.; MOREIRA, X.; ZAS, R. 2011. Resistance and response of *Pinus pinaster* seedlings to *Hylobius abietis* after induction with methyl jasmonate. *Plant Ecol.*; 212 (3), 397-401.

SANTOS DEL BLANCO, L.; CLIMENT, J.; GONZALEZ-MARTINEZ, S.C.; PANNELL, J.R. 2012. Genetic differentiation for size at first reproduction through male versus female functions in the widespread Mediterranean tree *Pinus pinaster*. *Annals of Botany*, 110 (7), 1449-1460.

SCHMIDT, A.; ZENELI, G.; HIETALA, A.M.; FOSSDAL, C.G.; KROKENE, P.; CHRISTIANSEN, E.; GERSHENZON, J. 2005. Induced chemical defenses in conifers: biochemical and molecular approaches to studying their function. En: J. Romeo (ed.): *Chemical Ecology and Phytochemistry of Forest Ecosystems*, 28 pp. Elsevier, Amsterdam.

TAPIAS, R.; CLIMENT, J.; PARDOS, J.A.; GIL, L. 2004 Life histories of Mediterranean pines. *Plant Ecol.*, 171 (1-2), 53-68.

VENDRAMIN, G.G.; ANZIDEI, M.; MADAGHIELE, A.; BUCCI, G. 1998. Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. as revealed by chloroplast microsatellites. *Theor. Appl. Genet.*, 97 (3), 456-463.

VILLARI, C.; BATTISTI, A.; CHAKRABORTY, S.; MICHELOZZI, M.; BONELLO, P.; FACCOLI, M. 2012. Nutritional and pathogenic fungi associated with the pine engraver beetle trigger comparable defenses in Scots pine. *Tree Physiol.*, 32 (7), 867-879.

ZAS, R.; BJORKLUND, N.; NORDLANDER, G.; CENDAN, C.; HELLQVIST, C.; SAMPEDRO, L. 2014. Exploiting jasmonate-induced responses for field protection of conifer seedlings against a major forest pest, *Hylobius abietis*. *For. Ecol. Manage.*; 313, 212-223.