

# Estudio de la variación geográfica en los niveles constitutivos e inducidos de defensas bióticas en la encina (*Quercus ilex*)

Autor. Manuela Rodríguez Romero<sup>1,2</sup>

Otros autores. Alejandro Gallardo<sup>3</sup>, Andrea Pérez<sup>2</sup>, Fernando Pulido<sup>2</sup>.

Centro de Trabajo. 1. Instituto del Corcho, la Madera y el Carbón Vegetal (ICMC)/ Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Junta de Extremadura, [manuela.rodriguez@juntaex.es](mailto:manuela.rodriguez@juntaex.es)  
 2. Instituto de Investigación de la Dehesa (INDEHESA), Universidad de Extremadura.  
 3. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética. Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura.



## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas los bosques ibéricos de *Quercus* están experimentando síntomas de decaimiento por diversos factores entre los cuales destacan los originados por agentes bióticos. Aunque la intensidad varía regionalmente, su prolongación temporal pone en riesgo la persistencia de bosques y dehesas, con implicaciones negativas directas sobre la resiliencia y biodiversidad asociada (LLORET et al. 2012).

El estudio de la base genética que explica las posibles diferencias en la susceptibilidad que pudiera existir entre individuos, poblaciones y regiones, requiere el empleo de herramientas de biología molecular aplicadas a distintas escalas espaciales para conocer y predecir la resistencia al estrés biótico causado.

En este ensayo se utiliza la encina (*Quercus ilex*) como especie forestal modelo ampliamente estudiada y presente en todos los parques nacionales terrestres españoles.

Las defensas químicas principales en *Quercus* se basan en la síntesis de compuestos fenólicos, sobresaliendo los taninos de alto peso molecular, tanto hidrolizables (Th, derivados de ácidos gálico y elágeno) como condensados (Tc, también conocidos como "proantocianidinas"). Estos reducen la digestibilidad de los tejidos en herbívoros (HASLAM, 2007), provocan alteraciones metabólicas en insectos (BARBEHENN et al., 2009) y, según algunos trabajos realizados sobre especies de robles americanos y centroeuropeos, imponen una barrera a la acción de patógenos radiculares (OLIVA et al., 1999; KRAUS et al., 2003).

Los niveles de resistencia constitutiva corresponden a rasgos defensivos de las plantas relativamente estables, mientras que los inducidos se generan como respuesta a la acción de agentes bióticos externos (SCHULTZ, 1988). Ambos se encuentran controlados genéticamente y sus diferencias determinan el grado de plasticidad de la especie en cada región y constituyen la base genética para diseñar una estrategia de actuación frente a escenarios de futuro en condiciones ambientales cambiantes.

## MATERIAL Y MÉTODO

### 1. Selección de poblaciones y bellotas para siembra posterior en invernadero

- 7 Parques Nacionales: Aigüestortes (6), Cabañeros (2), Guadarrama (7), Monfragüe (1), Ordesa (5), Picos de Europa (4) y Sierra Nevada (3).
- Siembra de bellotas. Invernaderos del Centro Universitario de Plasencia (UTM Zona 29N X: 748862; Y: 4435709, 374 msnm).

### 2. Diseño experimental

- Tipo encajado con 1960 plántulas (7 regiones x 2 poblaciones/región x 7 árboles/población x 4 tratamientos x 5 bellotas/plántulas). Objetivo: valorar los efectos geográficos y genéticos sobre la tolerancia de las distintas plántulas ante el daño inducido y establecer las posibles diferencias en la respuesta según el agente responsable.

### 3. Aplicación de tratamientos experimentales

- inoculación con el patógeno radical *Phytophthora cinnamomi* (P)
- herida mecánica o "tronchado" ("mechanical wounding") del tercio superior de la plántula, simulando el posible daño de un herbívoro (D)
- mixto (patógeno/defoliación) (X)
- control (C)

### 4. Recogida y preparación de muestras para análisis químico

- Colecta de 5-6 hojas por plántula, a razón de 3 plántulas/árbol madre.
- Liofilizado (-55°C), triturado y congelado a -80°C.

### 5. Extracción de fenoles

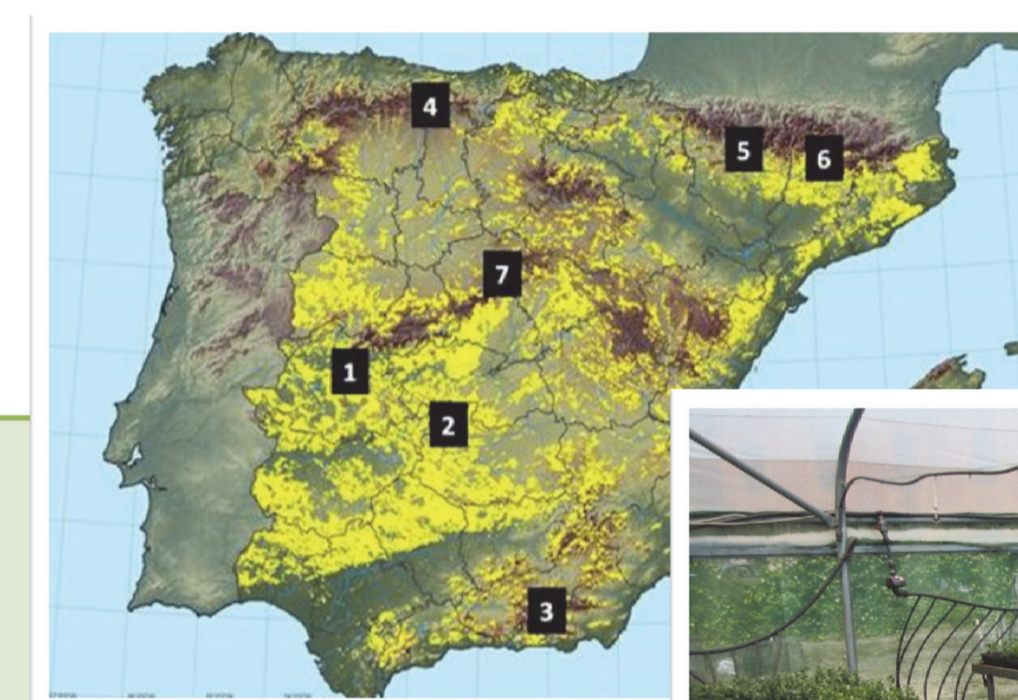
- 50 mg de muestra liofilizada y triturada/plántula + 1 ml de metanol al 70%
- baño de ultrasonidos (15 min), agitado con vortex (cada 10 min) y centrifugado (5 min, 10.000 rpm, 4°C)
- extracción del sobrenadante

### 6. Medida de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

- Método basado en la reacción de los compuestos fenólicos a pH básico, originando coloraciones azules susceptibles de determinación mediante espectrofotómetro a 725 nm.
- Dilución 1:20 (extracto puro + metanol al 10%)
- Alícuota final de 200 µl (60 µl extracto diluido + 140 µl H<sub>2</sub>O) + 1 ml reactivo Folin-Ciocalteu Feud al 10% + 0,8 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7,5%.
- Recta patrón de ácido gálico (solución madre de concentración conocida: 100 mg ácido gálico en 100 ml H<sub>2</sub>O) + blanco
- Tiempo de espera de 45 min. Absorbancia medida a 725 nm.

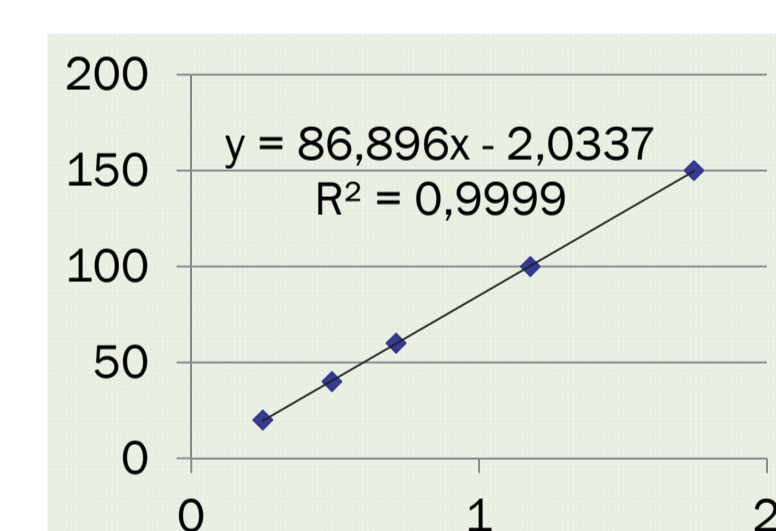
### 7. Cuantificación de taninos condensados (Tc)

- Cálculo a partir de la absorbancia obtenida sobre la curva patrón de ácido gálico, expresados en mg GAE/g muestra.
- Según datos propios obtenidos mediante HPLC, en las plántulas de la muestra el 90% de los polifenoles son Tc.
- Análisis estadístico mediante modelos lineales generalizados (GLM) sobre un diseño de ANOVA mixto. Estadística v10. Test de Tukey.



Punto	mg ácido gálico/L	Solución madre (ml)	Agua (µl)
1º	20	0,100	4900
2º	40	0,100	2400
3º	60	0,400	6460
4º	100	0,500	4500
5º	150	0,750	4250

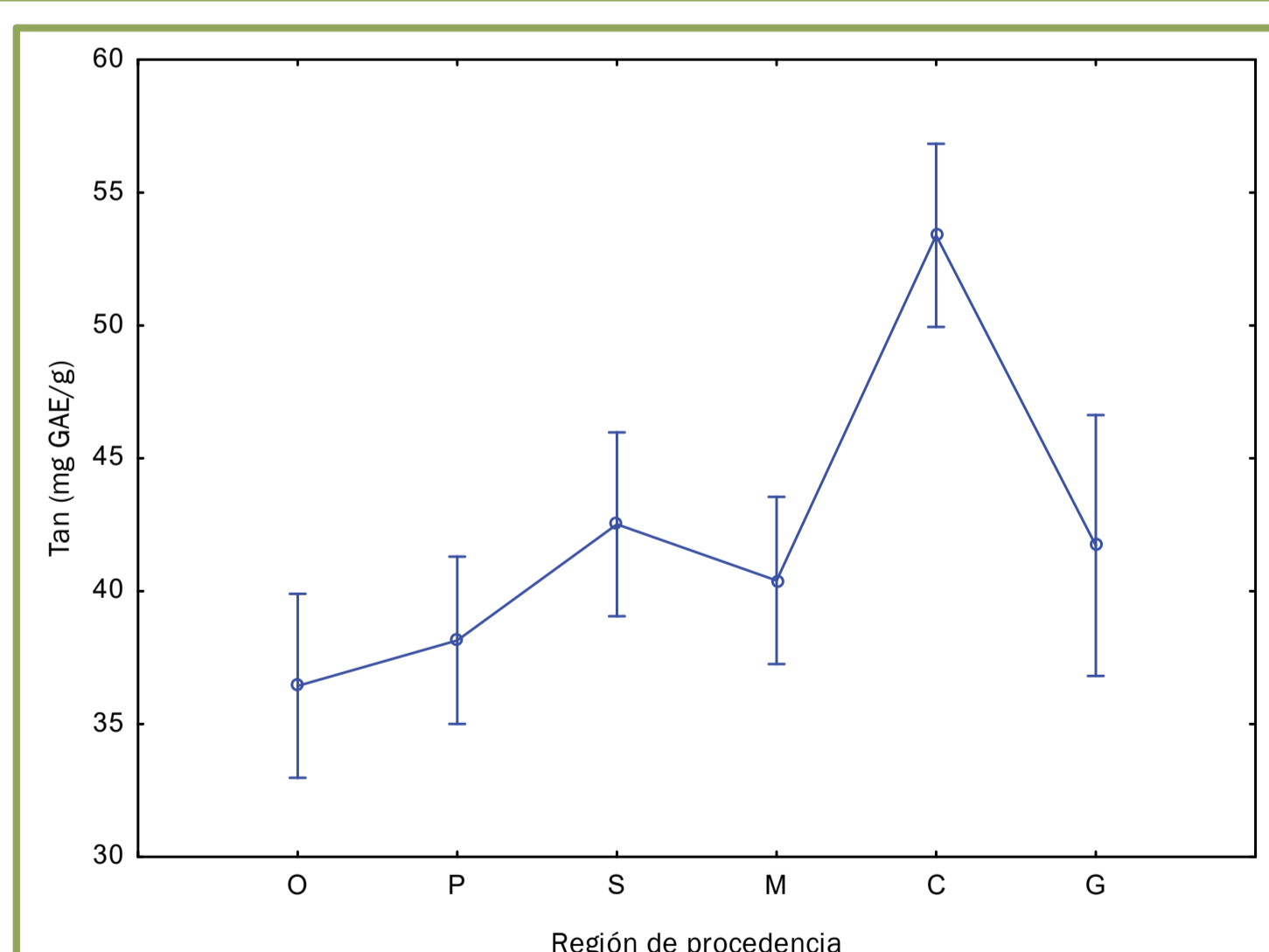
Puntos de la curva de ácido gálico.



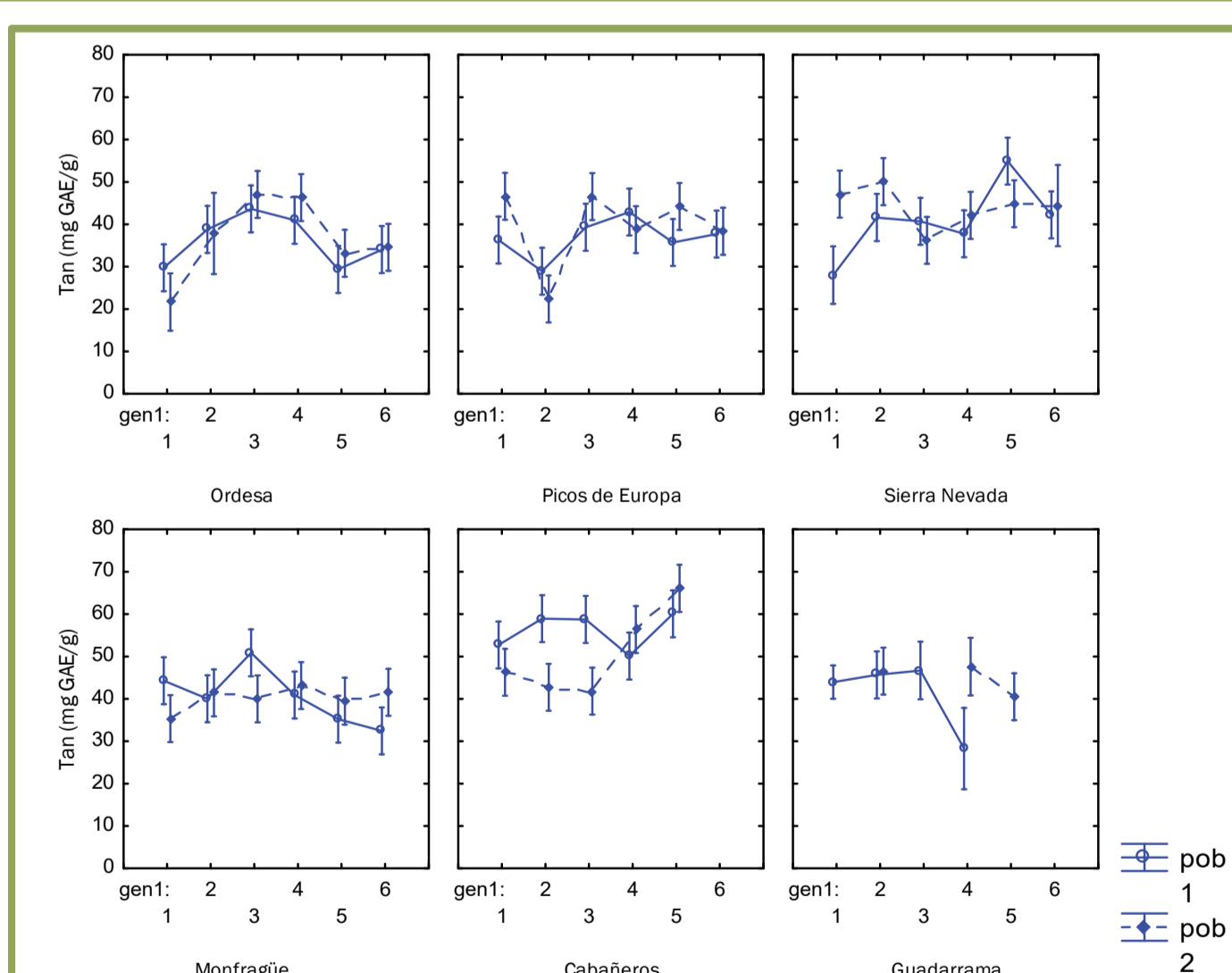
Recta patrón y concentración de taninos estimada (mg GAE/L).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Resistencia constitutiva: mayor variabilidad entre regiones y genotipos que entre poblaciones.

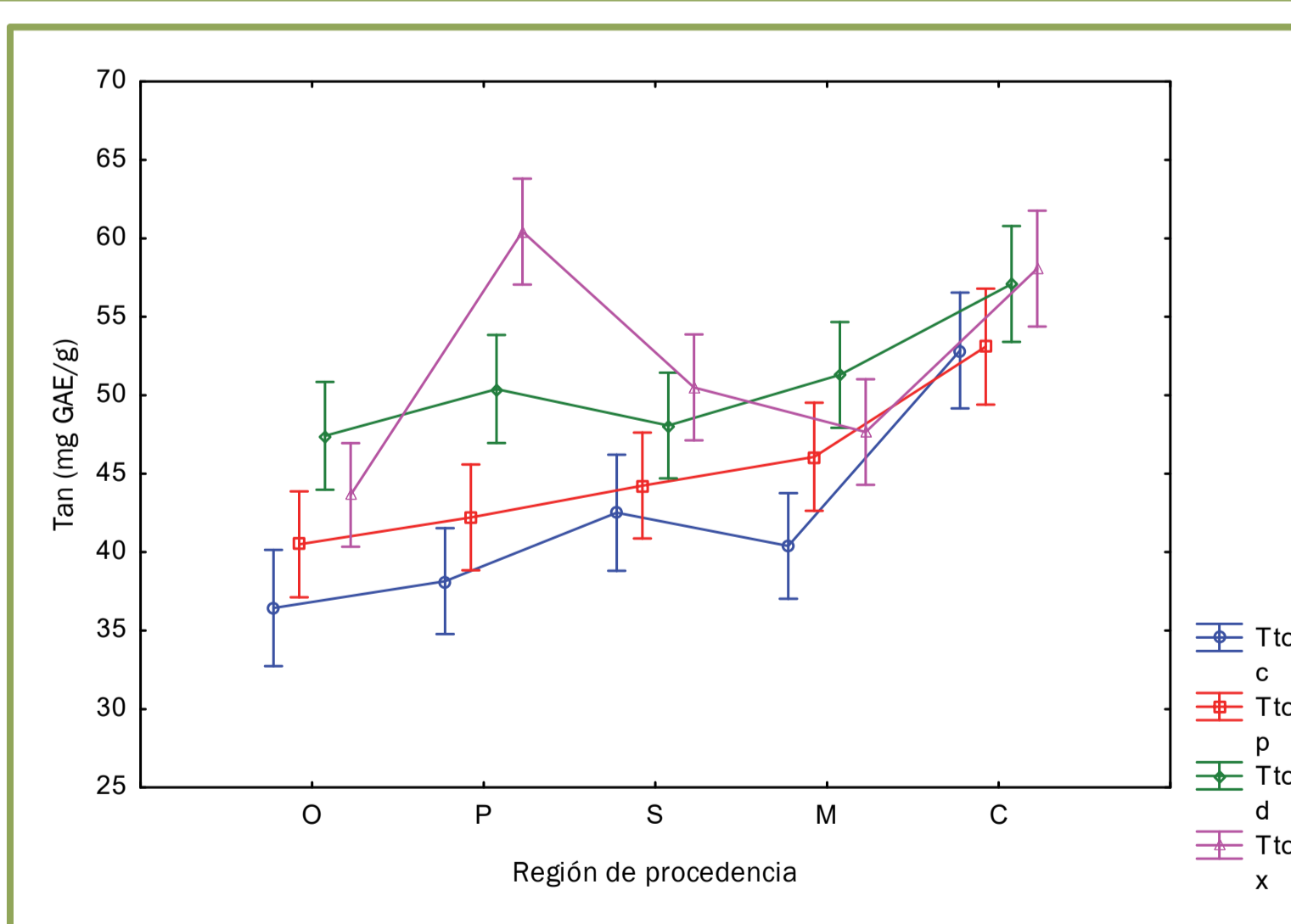


Niveles constitutivos de taninos en hojas de *Quercus ilex* según región de procedencia.



Niveles constitutivos de taninos en hojas de encina según región de procedencia, población y genotipo.

### Resistencia inducida: los tratamientos aplicados incrementan siempre la producción de taninos.



Niveles constitutivos e inducidos de taninos en hojas de *Quercus ilex* según región de procedencia y tratamiento.

- La respuesta inducida es distinta según el tratamiento aplicado: el tronchado favorece una mayor producción de taninos que la infección con el patógeno radical.
- La producción de taninos presenta diferencias significativas entre regiones, poblaciones, genotipos y tratamientos.
- La acción combinada del patógeno radical y el daño mecánico del tercio superior de la plántula (tronchado) induce, en un 60% de los casos estudiados, producciones de taninos mayores que los valores obtenidos para las generadas por la aplicación por separado de *Phytophthora cinnamomi* y tronchado. Se detectan efectos sinérgicos en las regiones de Sierra Nevada, Picos de Europa y Cabañeros.

## CONCLUSIONES

La variabilidad individual y ecotípica genera variaciones en la respuesta de las defensas químicas frente a los agentes bióticos, mostrando cierta especificidad en la producción de taninos según la naturaleza del causante, lo que pudiera ser una estrategia adaptativa a la diversidad de la comunidad de patógenos y herbívoros presentes en el ecosistema.

La elección de una especie de estudio como la encina, ampliamente distribuida y presente bajo condiciones climáticas, edáficas y antrópicas tan variables facilita que los resultados obtenidos sean generalizables y extrapolables a otras áreas con la misma problemática.

Agradecimientos: Los autores quisieran agradecer al personal del ICMC y a los compañeros del departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética de la Facultad de Veterinaria y de INDEHESA la ayuda técnica recibida, especialmente a los profesores Alejandro Solla, Alberto Quesada y David Morcuende. Trabajo parcialmente financiado por el Proyecto 956 "Determinantes de la resistencia al estrés biótico en una especie forestal modelo: una nueva herramienta de gestión adaptativa en Parques Nacionales" (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España) y por fondos INIA/CICYTEX a través de la beca de formación FPI-INIA de Manuela Rodríguez.

Gestión del monte: servicios ambientales y bioeconomía 26-30 Junio 2017 Plasencia Cáceres, Extremadura

Comunicación disponible en:

