

# DETERMINANTES DE LA RESISTENCIA AL ESTRÉS BIÓTICO EN UNA ESPECIE FORESTAL MODELO: LA ENCINA (*QUERCUS ILEX*) EN LOS PARQUES NACIONALES

FERNANDO PULIDO<sup>1</sup>, ALEJANDRO GALLARDO<sup>2</sup>, DAVID MORCUENDE<sup>3</sup>,  
GERARDO MORENO<sup>1</sup>, MANUELA RODRÍGUEZ-ROMERO<sup>1</sup>, ALEJANDRO SOLLA<sup>1</sup>,  
PILAR FERNÁNDEZ-REBOLLO<sup>4</sup>, ALBERTO QUESADA<sup>2</sup>

## RESUMEN

En este proyecto se examinan los factores genéticos y ambientales que determinan la resistencia biótica de los bosques con el fin de diseñar una herramienta para su gestión en el ámbito de los parques nacionales terrestres. Para ello se utiliza la encina (*Quercus ilex*) como especie forestal modelo ampliamente estudiada y única presente en todos los parques ibéricos terrestres y su entorno (Monfragüe, Cabañeros, Sierra Nevada, Picos de Europa, Ordesa, Aigüestortes y Guadarrama). Mediante una combinación de herramientas bioquímicas, ecológicas y genéticas se ha avanzado significativamente en el conocimiento de la diversidad genética y fenotípica a escalas geográfica y poblacional, detectándose además importantes implicaciones de la estructura y manejo de los encinares. Los resultados muestran en primer lugar que las defensas químicas de la encina, muy mayoritariamente taninos condensados, pueden evaluarse a gran escala con técnicas de relativo bajo coste. Las defensas presentan una elevada heredabilidad y variabilidad intrapoblacional. La inducción de estas defensas está generalizada, aunque distintos tipos de daños bióticos inductores generan respuestas específicas. Las defensas se ven afectadas por el estrés hídrico experimental y ambiental, en parte debido a su dependencia de las reservas de carbohidratos. El proyecto ha permitido estudiar algunos de los genes estructurales de las rutas de síntesis de taninos condensados e hidrolizables y demostrar el efecto de defoliadores y patógenos sobre su expresión. En concreto se observa un efecto antagonista de defoliación e infección radicular con consecuencias importantes para la mortalidad de los árboles. También se ha detectado un polimorfismo en el gen *TT2*, uno de los genes reguladores de la síntesis de taninos, observándose que, aunque a escala geográfica los genotipos identificados no se relacionan con la producción de defensas y los daños de forma general, existen asociaciones locales significativas entre determinados genotipos, la susceptibilidad a herbívoros y la expresión de defensas químicas, considerando el agrupamiento de los dos parques pirenaicos (Ordesa y Aigüestortes) y los dos ecosistemas con similares características climáticas y orográficas del tipo mediterráneo/continentales (Monfragüe y Cabañeros). Por último, las variables morfológicas analizadas a gran escala en hojas y bellotas no son en general buenas predictoras de la susceptibilidad a los daños bióticos, aunque sí pueden serlo localmente de las defensas en el caso del tamaño de bellota, tamaño de hoja y espinescencia.

**Palabras clave:** Estrés biótico, expresión génica, polimorfismo génico, *Quercus ilex*, resistencia biótica, taninos.

<sup>1</sup> Instituto de Investigación de la Dehesa (INDEHESA), Ingeniería Forestal y del Medio Natural, Universidad de Extremadura, Plasencia.

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres.

<sup>3</sup> Instituto de Investigación IPROCAR, Universidad de Extremadura, Cáceres.

<sup>4</sup> Dpto. Ingeniería Forestal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes, Universidad de Córdoba, Córdoba.

## DETERMINANTS OF RESISTANCE TO BIOTIC STRESS IN A MODEL TREE SPECIES: THE HOLM OAK (*QUERCUS ILEX*) IN SPANISH NATIONAL PARKS

### ABSTRACT

In this project we examine genetic and environmental factors determining biotic resistance in forests. This novel knowledge is the basis to design a sound technique for incorporating tree resistance criteria into forest management. We use Holm oak (*Quercus ilex*) as a model system, as it is a well-known forest species growing in all terrestrial national parks (Monfragüe, Cabañeros, Sierra Nevada, Picos de Europa, Ordesa, Aigüestortes y Guadarrama). By combining tools from biochemistry, genetics and ecology, the project has improved our knowledge of genetic and phenotypic diversity at geographical and population scales, as well as the effects of habitat management. Results showed that chemical defences (mostly condensed tannins, CT) can be evaluated at wide scale with cost-effective techniques. CT show significant heritability and intra-population variability. Induction of CT is a generalized phenomenon, with different biotic damages (insect defoliation, pathogen infection and double treatment) generating specific responses. CT are also affected by water stress partly because of carbohydrate limitation of defence production. The project has also addressed gene regulation of the metabolic pathways for CT production, including biotic modification of gene expression. Pathogen infection cancels out the increase in CT induced by defoliation, which may exacerbate the effects of biotic damage on population performance. One polymorphism found in *TT2*, one of the genes regulating tannin biosynthesis, seems not be related at a geographical scale with expression of chemical defences nor herbivore susceptibility, although local associations were detected between Pyrenean Parks (Ordesa y Aigüestortes) and Mediterranean/continental Parks (Monfragüe y Cabañeros). Lastly, morphological measures of leaves and fruits were found to be poor predictors of damage, though acorn size, leaf size and number of spines can be locally relevant.

**Keywords:** Biotic stress, biotic resistance, gene expression, gene polymorphism, *Quercus ilex*, tannins.

## INTRODUCCIÓN

El decaimiento de los bosques en amplias áreas forestales bajo clima mediterráneo es un hecho constatado que condiciona su resiliencia y su productividad (LLORET 2012, LLORET *et al.*, 2012). En su interpretación actual, el fenómeno del decaimiento comprende un síndrome en que se combinan la acción de factores climáticos estresantes y de agentes bióticos nocivos. Estos procesos se agudizan en formaciones forestales explotadas históricamente como encinares, alcornoques y robledales, donde la limitada regeneración natural debida al sobrepastoreo y los episodios de corta y rebrote conducen al envejecimiento y un probable empobrecimiento genético de las poblaciones (JIMÉNEZ Y GIL 2000, PEÑUELAS *et al.*, 2001, SÁNCHEZ *et al.*, 2002, FERNÁNDEZ-CANCIO *et al.*, 2012, CORCOBATO *et al.*, 2013). El decaimiento viene afectando puntual o severamente a las masas forestales de la Red de Parques Nacionales terrestres (por ejemplo, CAMARERO 2001, GARCÍA *et al.*, 2011), con un peso variable de los factores de estrés abiótico y biótico, lo que implica riesgos apreciables para la conservación de la biodiversidad asociada.

En las áreas de bosque denso el estudio del decaimiento se ha centrado en la relación entre episodios de sequía y mortalidad a nivel de masa forestal (CAMARERO *et al.*, 2008, LLORET 2012). Por su parte, en formaciones abiertas, donde la menor competencia entre árboles puede atenuar el estrés hídrico, el decaimiento se ha asociado principalmente a la actuación de agentes bióticos sobre un arbolado envejecido por la falta de regeneración (MARM 2004, JUNTA DE ANDALUCÍA 2009).

En ambos casos se ha considerado de forma homogénea la respuesta de las masas forestales, descuidándose el análisis de las diferencias poblacionales y genotípicas en la resistencia al estrés abiótico y biótico (LLORET 2012, LLORET *et al.*, 2012). Dado que la resistencia depende, entre otros, de genes implicados en la producción de defensas químicas, es de esperar la existencia de distintos niveles de tolerancia al estrés en el seno de las masas asociados al polimorfismo genético y a procesos de adaptación local (SORK *et al.*, 1993, CARNICER *et al.*, 2011, PAUTASSO *et al.*, 2012, VOLTAS *et al.*, 2013).

La conservación de los bosques en los parques nacionales ha de contemplar la necesidad de una gestión adaptada al contexto climático y antrópico, los dos componentes clave del cambio global (KREMER 2007, VALLADARES 2008). Aunque existe un número creciente de técnicas selvícolas para mitigar los efectos negativos de la sequía (ALEJANO *et al.*, 2012, VERICAT *et al.*, 2012), la mejora de la resiliencia de los sistemas forestales debe sustentarse también en el conocimiento de la aptitud genética de los árboles y la promoción de la diversidad genotípica. Además de las evidentes posibilidades que ofrece para la mejora genética, esta opción permitiría minimizar los riesgos y asegurar la biodiversidad asociada a los árboles como organismos clave en los ecosistemas forestales (LEDIG 1992, POELMAN *et al.*, 2008, PAUTASSO *et al.*, 2012).

La incidencia del estrés biótico causado por patógenos y herbívoros en las especies de *Quercus* es mayor en bosques alterados, lo que se atribuye generalmente a una elevada edad media de los árboles, si se compara con sistemas más naturales con adecuada regeneración (MARM 2004, JUNTA DE ANDALUCÍA 2009). No se ha investigado, sin embargo, hasta qué punto la mayor incidencia de los daños puede deberse a la disminución de la capacidad defensiva de los árboles y/o de la frecuencia de genotipos resistentes. El progreso reciente en el conocimiento de los mecanismos de defensa en plantas modelo ha permitido reconocer la existencia de un sistema inmune basado en señales moleculares iniciadas por el contacto del agente biótico que modifican la expresión de los genes implicados en la resistencia (JONES & DANGL 2006, HOWE & JANDER 2008). En el contexto forestal, estos mecanismos sólo se han estudiado en *Picea* (PORTH *et al.*, 2011) y en *Populus* (PETERS & CONSTABLE 2002, SCHWEITZER *et al.*, 2008, BERNHARDSSON & INGVARSSON 2011, YUAN *et al.*, 2012). En *Quercus* los mecanismos de defensa se basan en la síntesis de compuestos fenólicos, especialmente taninos de alto peso molecular, tanto hidrolizables (hT, derivados de ácidos gálico y eláxico) como condensados (cT o proantocianidinas). Estos compuestos reducen la digestibilidad de los tejidos para los mamíferos fitófagos y provocan alteraciones metabólicas potencialmente letales en insectos (BARBEHENN & CONSTABEL 2011).

Asimismo, los taninos imponen una barrera a la acción de patógenos radiculares (KRAUS *et al.*, 2003). Aunque existen estudios con robles americanos y centroeuropeos, los mecanismos de resistencia a los daños en las especies mediterráneas son prácticamente desconocidos.

En general los taninos se producen en los *Quercus* mediante un mecanismo de inducción provocada por daños externos de diferente naturaleza. El contacto con sustancias externas específicas (como la saliva de los insectos) provoca una serie de señales hormonales que conducen a la expresión de genes implicados en la producción de defensas (JONES & DANGL 2006, HOWE & JANDER 2008). Asimismo, se han documentado niveles constitutivos basales de defensa en algunas especies, cuya variabilidad entre individuos y nivel de heredabilidad sugieren un notable determinismo genético (KLAPER *et al.*, 2001). En el contexto de la resistencia biótica, está bien documentada la presencia de defensas químicas (hT y cT) en distintos tejidos de la encina (32 tipos de hT sólo en las bellotas; CANTOS *et al.*, 2003). Además, los múltiples estudios moleculares previos garantizan una base biotecnológica adecuada para la extracción y análisis de DNA y RNA de gran utilidad en el contexto de este proyecto (ECHEVARRÍA *et al.*, 2012).

Para el estudio a gran escala de la variabilidad en la resistencia biótica es preciso seleccionar organismos modelo suficientemente conocidos y de amplia distribución. En el contexto forestal de la Red de Parques Nacionales, sólo la encina (*Quercus ilex* L.) reúne estas condiciones. Así, esta especie ha sido intensamente estudiada en las últimas dos décadas desde las perspectivas demográfica, ecofisiológica y genética (RODÀ *et al.*, 1999, DÍAZ & PULIDO 2009), incluyendo el establecimiento de un marco filogeográfico clave para la comprensión de procesos de diferenciación genética y ecotípica a gran escala (LUMARET *et al.*, 2002). Por otra parte, la encina es la única especie forestal presente en todos los parques nacionales terrestres ibéricos, siendo abundante en Monfragüe, Cabañeros y Sierra Nevada, y de presencia local en Picos de Europa, Ordesa, Aigüestortes y Guadarrama. Esta ubicuidad, junto con la variabilidad de condiciones climáticas, edáficas y antrópicas en que se desarrolla la especie, permite

establecer esquemas de trabajo robustos y generalizables (Figura 1). Este proyecto ha abordado los siguientes objetivos concretos:

1. Puesta a punto de un protocolo de valoración de las defensas químicas.
2. Estudio de la variación en los niveles constitutivos e inducidos de defensas ante distintos agentes bióticos.
3. Estudio de la interacción entre estrés abiótico y resistencia.
4. Identificación de los genes para la biosíntesis de taninos: análisis de su expresión y detección de posibles polimorfismos.
5. Análisis de patrones geográficos en los polimorfismos de la biosíntesis y acumulación de taninos.
6. Evaluación de indicadores fenotípicos para la gestión de la resistencia.

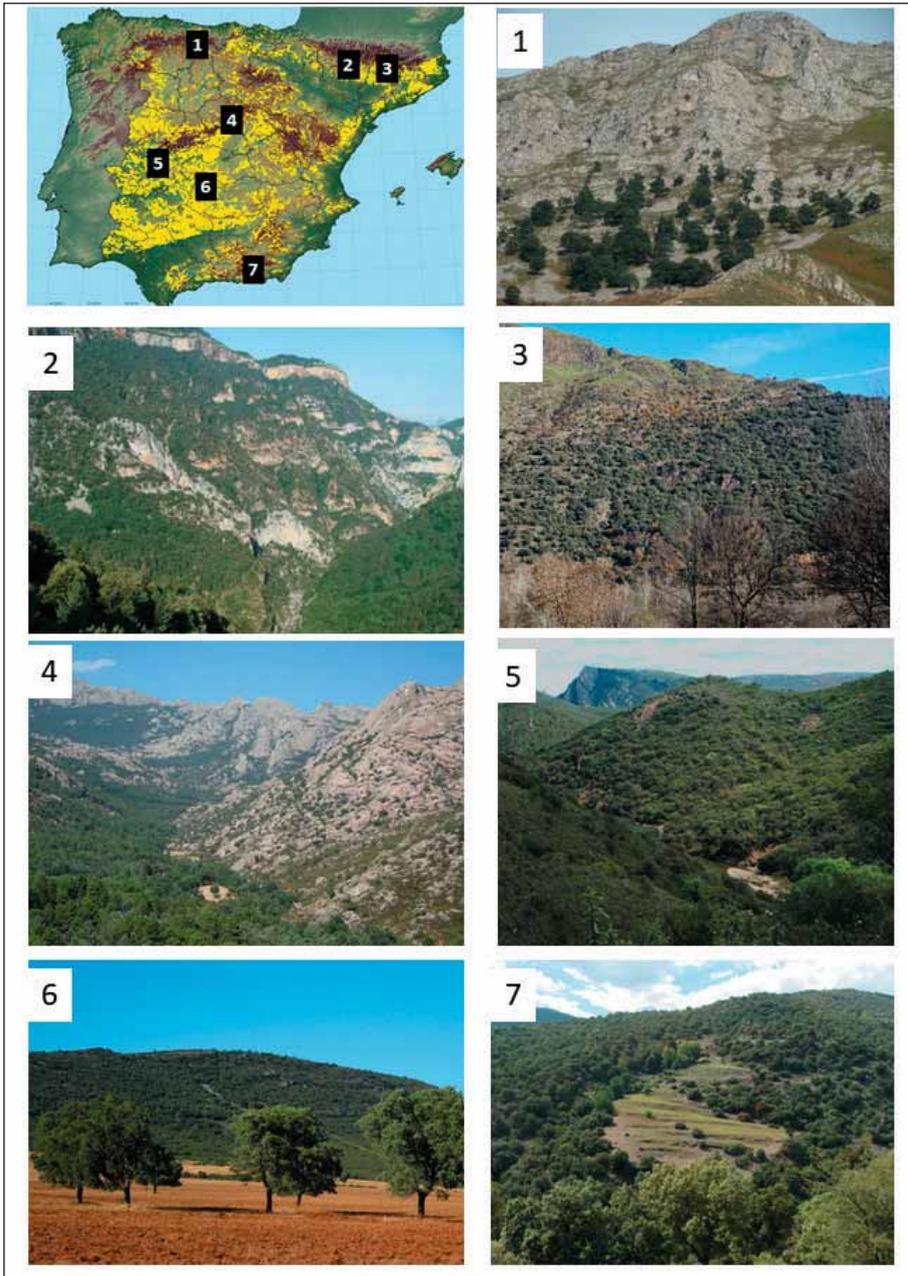
## MATERIAL Y MÉTODOS

### Puesta a punto de un protocolo de valoración de las defensas químicas

Mediante la aplicación de métodos directos e indirectos de cuantificación de taninos hidrolizables y condensados en distintos órganos de la planta, se diseñó una metodología secuencial para evaluar el nivel de defensas a varias escalas. La presencia mayoritaria de taninos condensados de alto peso molecular ha obligado a la aplicación de técnicas de hidrólisis selectiva asociada a HPLC-DAD. Además, la aplicación simultánea de técnicas de cromatografía acoplada a espectrometría de masas ha permitido la caracterización estructural (estructura química y grado de polimerización).

### Estudio de la variación en los niveles constitutivos e inducidos de defensas ante distintos agentes bióticos

En este apartado se ha analizado la capacidad de la encina para responder a los daños (inducibilidad)



**Figura 1.** Localización de los parques nacionales terrestres sobre el área de distribución de la encina (en amarillo) e imágenes representativas de los encinares de (1) Picos de Europa, (2) Ordesa, (3) entorno de Aigües Tortes, (4) Guadarrama, (5) Monfragüe, (6) Cabañeros y (7) Sierra Nevada.

**Figure 1.** Location of the national parks on the range of holm oaks (yellow) and representative views of holm oak forests in (1) Picos de Europa, (2) Ordesa, (3) periphery of Aigües Tortes, (4) Guadarrama, (5) Monfragüe, (6) Cabañeros and (7) Sierra Nevada.

mediante la síntesis de defensas en función del agente causante, el individuo, la población y la región (parque), además de estimar la heredabilidad de los atributos defensivos. En seis parques (Picos de Europa, Ordesa, Guadarrama, Monfragüe, Cabañeros y Sierra Nevada) se recolectaron bellotas en número más que suficiente. El diseño experimental incluyó 6 parques x 2 poblaciones/parque x 6 individuos/población x 7 bellotas/individuos. Una vez concluida la emergencia y alcanzado un desarrollo mínimo, en la última semana de mayo se procedió a la aplicación de los tratamientos sobre las plántulas nacidas con el fin de causar el estrés biótico necesario para evaluar respuestas defensivas: 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) (PD); y control (C). El tratamiento control permitió conocer las defensas constitutivas de las plántulas estudiadas (Figura 2).

Para el tratamiento P se procedió un mes antes al cultivo del patógeno *Phytophthora cinnamomi* (agente principal común causante de la podredumbre radicular en *Quercus*) mediante una metodología ampliamente ensayada por nuestro grupo con inóculo en medio V8, avena y vermiculita (JUNG *et al.*, 1996). Una muestra de plántulas fueron seleccionadas, pesadas y se les cortaron 5-6 hojas/planta

con el fin de analizar en ellas la concentración de taninos constitutivos e inducidos.

### Estudio de la interacción entre estrés abiótico y resistencia

En este apartado se analizó la capacidad de la encina para la síntesis de defensas en función de la procedencia geográfica, el tipo de ambiente de procedencia (húmedo vs. seco) y las condiciones de déficit hídrico controladas. El ensayo se realizó con plántulas germinadas de bellotas recogidas en árboles de Monfragüe y Picos de Europa (para facilitar el contraste de ambientes requerido), incluyendo dos escenarios en cada región: húmedo (umbría) y seco (solana). En cada una de las cuatro poblaciones (2 regiones x 2 ambientes) se seleccionaron al azar 10 árboles. Una vez germinadas y plantadas sus bellotas, el ensayo siguió un diseño de tipo encajado con un total de 1176 plántulas (2 regiones x 2 ambientes x 7 árboles (=familias) x 6 niveles de riego x 7 réplicas o plántulas). A partir del 1 de julio 2015, las plantas fueron sometidas a diferentes intensidades de déficit hídrico, retirando el riego progresivamente a cada bloque. Al final de los tratamientos (primera semana de septiembre 2015), todas las hojas de todas las plantas fueron cosechadas para analizar posteriormente el contenido de taninos y de carbohidratos. Los compuestos fenólicos totales



**Figura 2.** Plantas dañadas por *Phytophthora cinnamomi* en el tratamiento de estrés biótico por patógenos (izquierda) y procesado posterior para la evaluación de defensas químicas en tallos y raíces.

**Figure 2.** Plants damaged by *Phytophthora cinnamomi* under pathogen stress (left) and later processing of material for evaluation of chemical defences in shoots and roots.

se estimaron mediante colorimetría (determinación mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu). Paralelamente se realizó la determinación de los niveles de almidón mediante espectrometría de infrarrojo cercano (NIRS).

### **Identificación de los genes para la biosíntesis de taninos: análisis de su expresión y detección de posibles polimorfismos**

En este apartado se identificaron los genes que desempeña un papel clave en la regulación de la síntesis de defensas químicas (Figura 3), se detectaron polimorfismos entre las plantas de las poblaciones analizadas y se estudiaron las consecuencias fenotípicas de las alteraciones de la ruta bioquímica. En primer lugar, se puso a punto la técnica de purificación de ácidos nucleicos (DNA y RNA) funcionales de distintos tejidos (raíz y hoja). Además se identificaron en el genoma de *Quercus robur* L. genes para las proteínas TTG1 (un único locus), TT2 (cuatro loci) y TT8 (un único locus). Posteriormente se diseñaron cebadores para la identificación de estas secuencias en la encina. La misma estrategia permitió identificar en el genoma de *Q. robur* los genes para la biosíntesis de taninos (ANR, ANS, LAR y SDH). Se diseñaron cebadores para RT-qPCR y los fragmentos amplificados se secuenciaron, evidenciándose su correcta funcionalidad. Entre los 4 loci para proteínas TT2 identificados en roble, las amplificaciones sobre DNA genómico han permitido detectar 3 homólogos en la encina. En cuanto al análisis del polimorfismo génico del tripartito MBW, se amplificaron en muestras de DNA genómico de 25 plantas procedentes de los Parques Nacionales de Cabañeros, Monfragüe, Picos de Europa, Sierra Nevada y Ordesa. Sobre la base de las secuencias de los fragmentos de PCR en *Q. ilex* de los genes para las proteínas TTG1, TT2 y TT8 se han determinado los mapas de restricción con las enzimas de restricción MboI, HaeIII y TaqI, eligiéndose las condiciones de escrutinio que generan el mayor número de fragmentos con tamaños lo suficientemente diferentes como para poder resolverse mediante electroforesis en agarosa. Entre los polimorfismos detectados, sólo uno correspondiente a una diana MboI de uno de los fragmentos TT2 (19442), resultó expresarse a nivel de la proteína codificada y se seleccionó para su análisis posterior.

Como continuación de la puesta a punto previa de la RT-qPCR para analizar la expresión génica de las enzimas ANR, ANS, LAR y SDH, se llevó a cabo un aislamiento del RNA de hojas de plántulas germinadas en invernadero, sometidas a las condiciones establecidas (defoliación mecánica, infección con *Phytophthora cinnamomi*, doble tratamiento con ambos tipos de estrés y control sin tratamiento). La expresión génica de las enzimas se analizó para evaluar si existían estímulos por estrés bióticos así como sus posibles interacciones.

### **Análisis de patrones geográficos en los polimorfismos de la biosíntesis y acumulación de taninos**

En este objetivo se evaluó la existencia de patrones geográficos en los polimorfismos génicos y su posible asociación con la producción de defensas y daños bióticos (defoliación) de acuerdo con hipótesis microevolutivas, ecológicas e históricas. Para describir los polimorfismos existentes tanto a nivel de estructura génica como de fenotipo químico en las siete regiones correspondientes a los parques implicados se seleccionaron tres poblaciones de bosque denso y tres de dehesa/bosque abierto en junio de 2015. En ellas se recolectó material foliar de al menos 10 individuos por población (7 regiones x [3+3] poblaciones x 10 = 420 árboles). Las muestras foliares de cada individuo permitieron a la vez analizar su material genético, su perfil químico y los daños bióticos a fin de estudiar sus posibles asociaciones. En concreto, se ha realizado el análisis de los polimorfismos de tamaño entre las preparaciones de DNA foliar mediante PCR y separación en agarosa de los fragmentos de los genes TT8 y TTG1. Asimismo, se ha estimado en todas ellas la incidencia de daños bióticos para correlacionarlos con la producción de taninos.

El análisis de polimorfismo génico se ha efectuado a dos niveles. Mediante PCR y análisis electroforético se han escrutado posibles alteraciones de tamaño de parte de las secuencias codificantes para los miembros del tripartito TT8 y TTG1, descartándose la existencia de polimorfismo a su nivel. Por ello se realizó una búsqueda de RFLPs entre las secuencias del tripartito que permitió identificar una variante de la secuencia de uno de los genes para TT2. Ade-

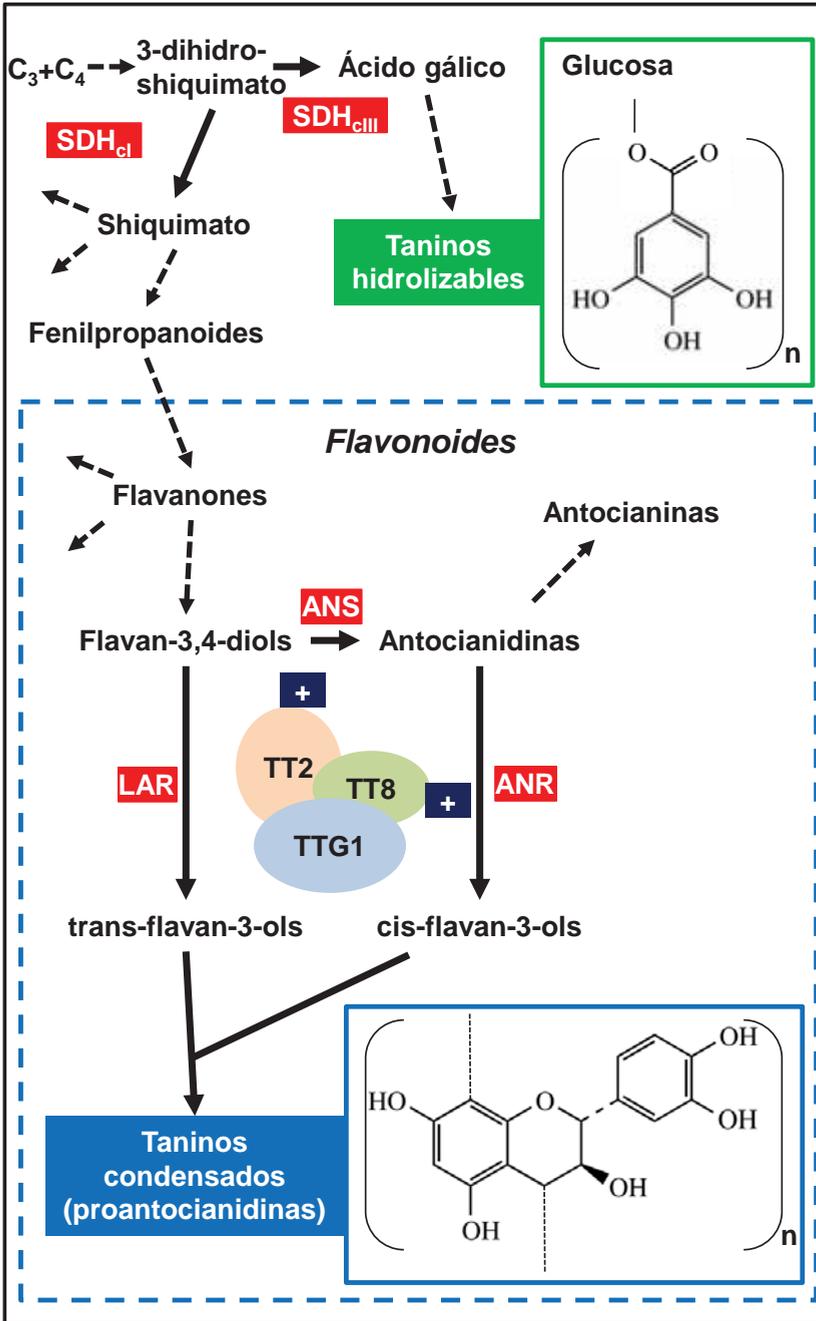


Figura 3. Ruta de síntesis de taninos condensados y ubicación a lo largo de ella de las enzimas analizadas en el estudio de expresión genética (ver Gallardo *et al.* 2018 para más detalles).

Figure 3. Biochemical pathways for the synthesis of condensed tannins and location of enzymes analysed in the genic expression study (see Gallardo *et al.* 2018 for details).

más de realizarse los estudios génicos mencionados, las muestras foliares se analizaron mediante los métodos químicos Folin-Ciocalteu (fenoles totales), ensayo de difusión radial mediante precipitación de proteínas (taninos totales) y Porter (taninos condensados). Finalmente, la inspección de las hojas y su digitalización permitió realizar una estima de la superficie foliar afectada por el conjunto de agentes causantes de daño biótico en estas estructuras.

### **Evaluación de indicadores fenotípicos para la gestión de la resistencia**

Este objetivo se basa en el estudio de la covariación entre la morfología de hojas y bellotas y las variables relacionadas con la resistencia (producción de taninos y nivel de daño por defoliadores y por perforadores del fruto, respectivamente; Figura 4). El estudio se ha basado en muestras de hojas y bellotas de encinas pertenecientes a 7 parques x 6 poblaciones x 5-10 individuos x 3 hojas/bellotas. Las hojas y bellotas fueron digitalizadas para la posterior medición de variables morfométricas, de las cuales se eligieron aquellas de más fácil medida e interpretación por personal técnico de campo. Así para las hojas se usaron longitud y anchura del limbo, longitud del peciolo y el número de espinas, así como las variables compuestas asociadas. En el caso de las bellotas se utilizaron longitud, anchura, volumen y las varia-

bles combinadas asociadas. El análisis morfométrico multivariante de estas medidas arrojó tres factores asimilables al tamaño de la hoja, espinescencia y tamaño de la bellota, factores de fácil visualización en condiciones de campo. Tras su digitalización las hojas y bellotas fueron molidas para la determinación espectrofotométrica de fenoles, variable significativamente asociada a otras estimas más costosas de taninos totales o taninos condensados.

Por último, a fin de evaluar la capacidad de las variables morfométricas citadas para predecir el nivel de daño por agentes bióticos (defoliadores en hojas y perforadores en frutos) se tomaron datos en Guadarrama y Sierra Nevada por ser éstos los parques donde se detectaron relaciones significativas entre morfología y defensas químicas. De este modo se trató de comprobar hasta qué punto es posible utilizar medidas morfológicas de fácil medición para detectar árboles susceptibles o con resistencia aparente.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Valoración de las defensas químicas**

De los métodos utilizados, la técnica de precipitación de proteínas (que cuantifica los dos tipos de taninos) se ajusta de manera óptima al análisis rutina-



**Figura 4.** Daños causados por defoliadores y perforadores de bellotas cuya relación con la morfología de hojas y frutos se analiza en este proyecto.

*Figure 4.* Damage caused by defoliators and acorn borers related to leaf and fruit morphology in this study.

rio de los compuestos fenólicos en las muestras de este proyecto. Igualmente, la determinación de éstos compuestos mediante la técnica de Folin-Ciocalteu (cuantifica los compuestos fenólicos totales) es razonablemente precisa para una cuantificación rutinaria de estos compuestos, como lo demuestra la buena correlación entre el total de los compuestos fenólicos y las técnicas indirectas específicas para la fracción de taninos (método de precipitación de proteínas y método Porter). La validación de técnicas «rápidas» ha permitido también aplicarlas a distintos tejidos (hoja, tallo, raíz y bellota) y evaluar las variaciones del contenido en taninos entre órganos y estaciones.

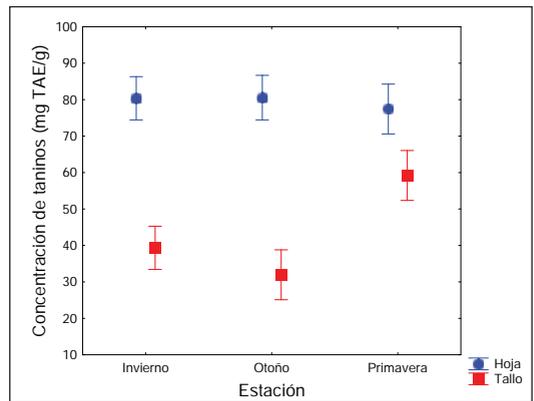
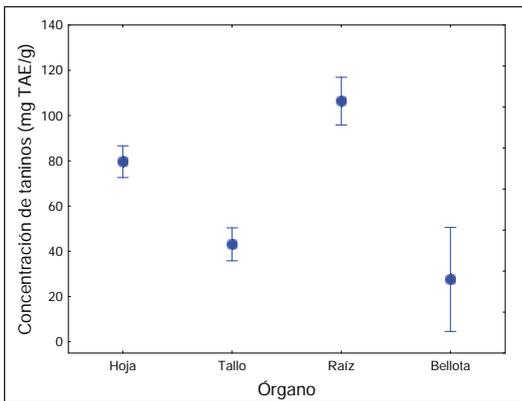
El análisis de la concentración de taninos de los diferentes tejidos permitió detectar variaciones significativas entre tejidos y entre estaciones. Las hojas son los órganos más constantes estacionalmente, mientras que los tallos presentan una variación fenológica significativa con máximo primaveral (Figura 5). El estudio de cuatro técnicas indirectas (rápidas) y una técnica directa (HPLC) lenta, permite observar elevadas correlaciones positivas entre todos los métodos de valoración de defensas, de modo que las técnicas de Folin (fenoles) y la de Halos de precipitación de proteínas (taninos) son las más idóneas para estudios a gran escala con gran número de muestras.

### Variación en los niveles constitutivos e inducidos de defensas ante distintos agentes bióticos

El análisis a escala de parques, poblaciones dentro de parques y genotipos dentro de poblaciones de la producción de taninos permite concluir que estas defensas químicas presentan una elevada y significativa heredabilidad en hojas y que la mayor parte de la variación se da dentro de poblaciones entre árboles madre. Los niveles de defensas constitutivas más bajos se encontraron en los parques situados más al norte de la Península, Ordesa y Picos de Europa, mientras que los valores más altos se encontraron en Cabañeros, destacando sobre el resto. En diferentes fases del proyecto se ha corroborado el carácter inducible de las defensas de la encina en respuesta a los daños experimentales (Figura 6). Asimismo, se ha constatado la relación negativa entre defensas químicas y mecánicas, tanto espinas como tricomas. La producción de defensas y su patrón geográfico es específica del tipo de daño (defoliación o patógeno radicular). Además, el doble daño reduce la producción de defensas.

### Interacción entre estrés abiótico y defensas

El estudio de la producción de defensas en función de la severidad del estrés hídrico mostró una respuesta no lineal pero con diferencias entre las dife-



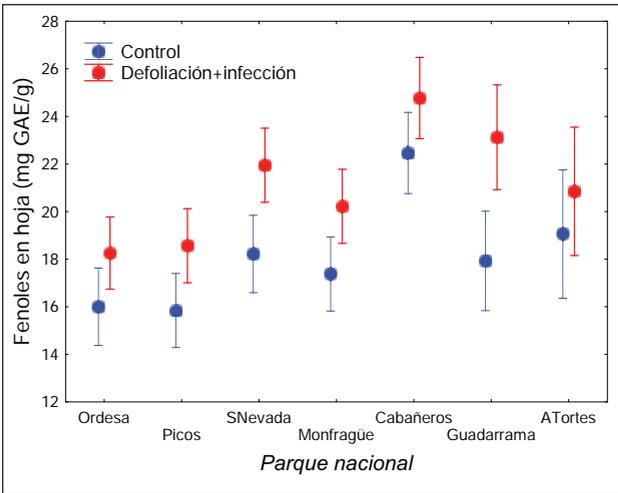
**Figura 5.** Variación entre órganos y entre estaciones en la concentración de taninos a partir de datos de encinas del Parque Nacional de Monfragüe.

**Figura 5.** Variation among organs and seasons of tannin concentration in holm oak of Parque Nacional de Monfragüe.

rentes procedencias (Figura 7). Se ha observado que en ambientes más húmedos (Cantabria-Húmedo) la producción de taninos se incrementa con niveles ligeros de déficit hídrico, pero decae inmediatamente con niveles moderados de estrés. En cambio, en ambientes más secos (Monfragüe-Seco), la respuesta al déficit hídrico es más gradual, pero no revierte con la intensidad del déficit hídrico. Aunque de forma menos evidente, este fenómeno se da también al contrastar regiones (parques) distantes con climas contrastados, como Picos de Europa y Monfragüe, o ambientes de solana frente a umbría. Tomando las regiones o ambientes por separado, se confirmó el patrón de mayor síntesis de defensas químicas con el incremento del déficit hídrico en las plántulas pro-

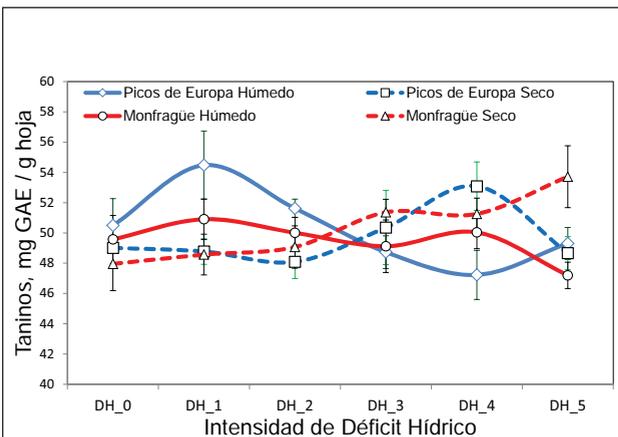
cedentes de Monfragüe o de solana, mientras que las procedentes de Picos de Europa o de umbrías, el aumento en el contenido de taninos con el déficit hídrico es mucho más acusado pero menos sostenido, decreciendo a partir de déficit hídricos moderados, hasta niveles más bajos que los presentes en plantas control, no sometidas a déficit hídrico.

Se confirma asimismo que el estrés hídrico prolongado/intenso reduce la acumulación de reservas de carbohidratos especialmente en poblaciones sin sequía habitual (umbrías de Picos de Europa; Figura 8), pero no en las procedencias de ambientes más secos. El contenido de almidón en las plántulas procedentes de las solanas de Monfragüe no se reduce,



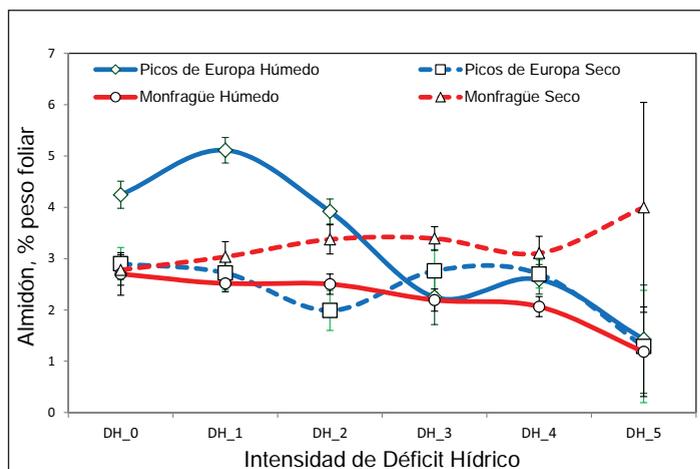
**Figura 6.** Evidencias de inducción de defensas químicas al incrementarse su producción en plántulas de encina dañadas respecto al control en todos los parques estudiados. Las muestras de tomaron a los 28 días de aplicar el daño.

**Figure 6.** Evidence for induction of defences in damaged plants as compared to control plants in the studied parks. Tannin concentrations was measured 28 days after damage.



**Figura 7.** Respuestas no lineales en la producción de defensas al aumentar el estrés hídrico tanto en ambientes húmedos (respuesta inmediata) como ambientes secos (respuesta desfasada).

**Figure 7.** Non-linear responses of defence production with increasing water stress in mesic environments – immediate response- and dry environments –delayed response–.



**Figura 8.** Reducción de las reservas de almidón al acentuarse el estrés hídrico simulado experimentalmente en poblaciones de Picos de Europa (izquierda). Esta respuesta no se da en las poblaciones de ambientes secos de Monfragüe (derecha).

**Figure 8.** Reduction of starch reserves with increased water stress in Picos de Europa (left). No response was found in Monfragüe dry environments (right).

incluso se incrementó ligeramente con la intensidad del déficit hídrico. La concentración de defensas en general aparece limitada por la disponibilidad de carbohidratos de forma significativa, como confirma la correlación positiva entre los contenidos foliares de almidón y taninos ( $r = 0.441$ ,  $p < 0.001$ ).

#### Identificación de los genes para la biosíntesis de taninos: análisis de su expresión y detección de posibles polimorfismos

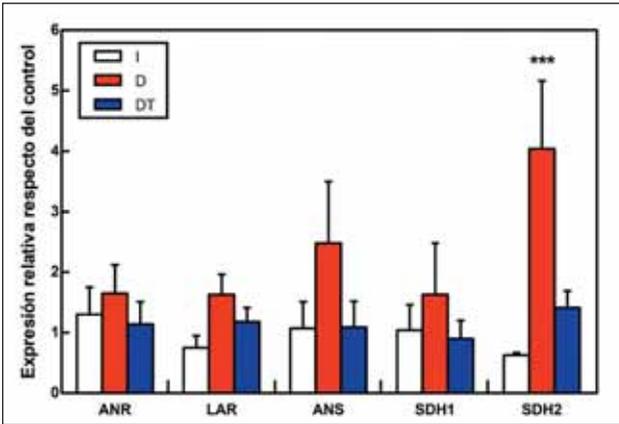
La expresión génica de las enzimas analizadas mostró una estimulación por estrés debido a la defoliación mecánica, mientras que el doble tratamiento que incluye la infección por el hongo revirtió este efecto. Entre todas las enzimas analizadas (ANS, ANR, LAR y SDH), el efecto más significativo se detectó para una de las isoformas analizadas de la enzima SDH, la SDH2 (Figura 9), correlacionándose con una mayor acumulación de taninos condensados determinados mediante el método de Porter (Gallardo *et al.*, 2018).

Secuencias codificantes correspondientes a tres genes de la familia de proteínas TT2 y un único miembro identificado de cada una de las otras dos familias de proteínas que componen el tripartito MBW de factores de transcripción, TT8 y TTG1, se rastrearán en búsqueda de polimorfismos de tamaño de los fragmentos de PCR amplificados y de

polimorfismos génicos tras la digestión de éstos con enzimas de restricción. Una única variante de dos posiciones adyacentes en uno de los genes identificados que codifican la proteína TT2, denominada QUEil;Myb1 que se expresa como el polimorfismo D165H/N166D y que detecta mediante digestión con la enzima MboI fue seleccionada para su análisis en las poblaciones vegetales procedentes de los Parques Nacionales.

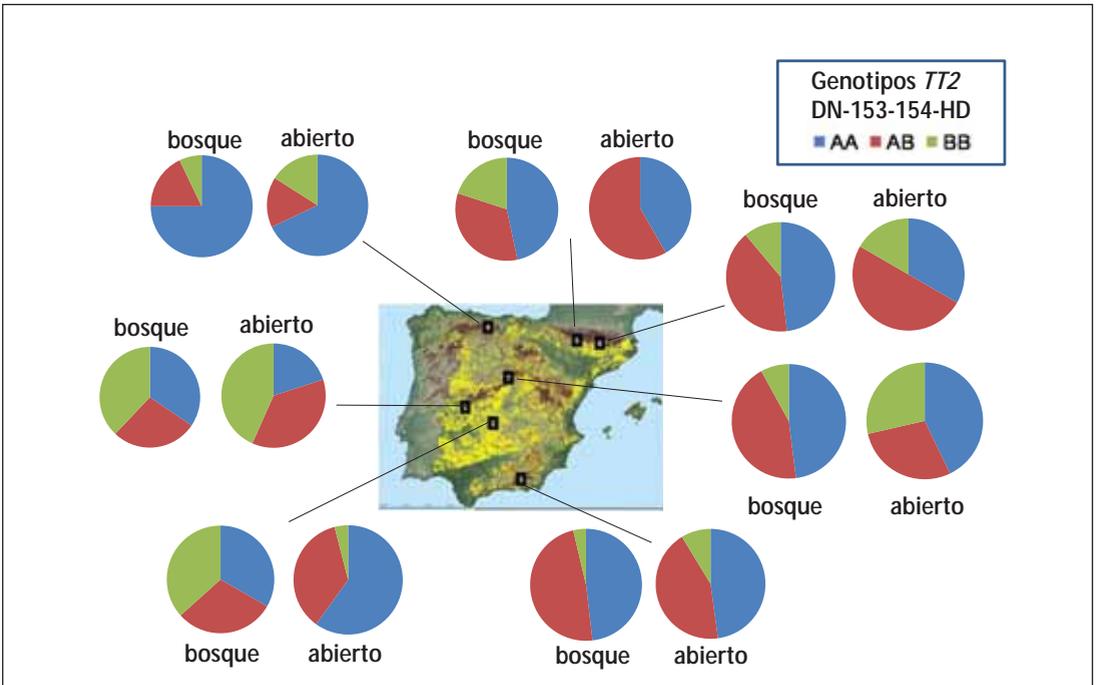
#### Patrones geográficos en los polimorfismos de la biosíntesis y acumulación de taninos

El polimorfismo génico identificado en *QUEil;Myb1* se manifiesta en la existencia de dos alelos, A y B ó *QUEil;Myb1-m1* y *QUEil;Myb1-m2*, codificando respectivamente las proteínas QUEil;Myb1<sup>165,166-HD</sup> y QUEil;Myb1<sup>165,166-DN</sup>. El análisis RFLP-MboI permitió identificar los genotipos AA, AB y BB para el locus *QUEil;Myb1*, que se distribuyeron de manera asimétrica siguiendo un patrón geográfico concreto, Norte/Sur, que resulta de trazar una línea divisoria al S de Guadarrama y que deja agrupados los sistemas pirenaicos (Ordesa y Aigüestortes), sistema Cantábrico (Picos de Europa) y meseta N (Guadarrama) frente a los sureños Montes de Toledo (Cabañeros), Monfragüe y la Penibética (Sierra Nevada). Así, se observa una mayor frecuencia del alelo A (y menor del alelo B) en los parques de la zona N respecto a la S (Figura 10).



**Figura 9.** Respuesta de la expresión génica (relativa al control no tratado) ante tratamientos de inoculación de patógeno (I), defoliación (D) y doble tratamiento (DT) para las cinco enzima estudiadas (ver Gallardo *et al.* 2018 para más detalles).

**Figure 9.** Response of gene expression (relative to untreated control) to inoculation (I), defoliation (D) and both (DT) for five enzymes analysed (see Gallardo *et al.* 2018 for details).



**Figura 10.** Frecuencias genotípicas del gen TT2 en los distintos parques y hábitats estudiados.

**Figure 10.** Genotypic frequencies of TT2 gene in different parks and habitats.

La acumulación de defensas químicas, incompatible con los modelos filogeográfico (variación este-oeste) y en mosaico, ha resultado asociada con el patrón geográfico N/S. Esta línea divisoria delimita plantas con niveles de acumulación de fenoles totales y taninos condensados superiores

al N. Aunque esta idea debe ser aún confirmada, el contraste latitudinal podría tener como base la existencia de rasgos genéticos «primitivos» asociados a los conocidos refugios glaciales costeros septentrionales donde es frecuente la subespecie *Quercus ilex ilex*.

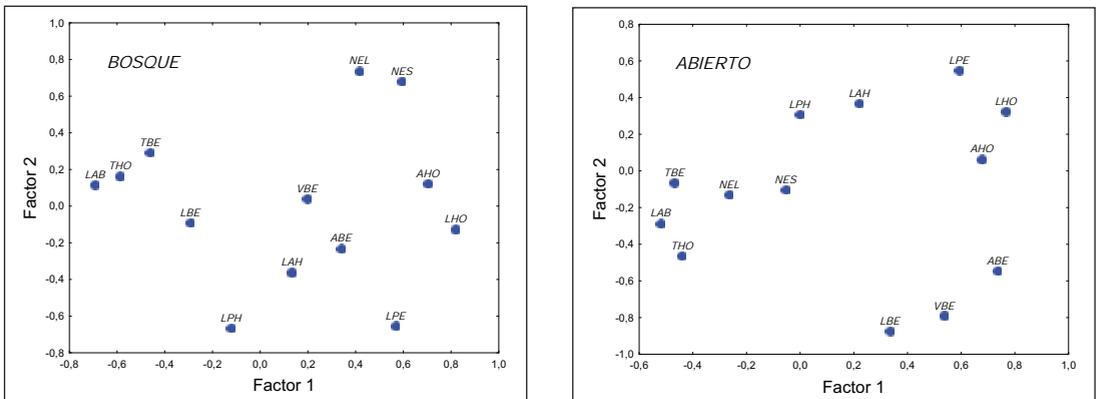
Aunque existen asociaciones concretas locales entre genotipos, defensas y defoliación, en general estas tres variables no estuvieron correlacionadas en el espacio geográfico que comprende los siete parques nacionales analizados en este proyecto. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas cuando se agruparon las plantas según su origen en parques de clima Mediterráneo-Continental (Cabañeros y Monfragüe) frente a las pirenaicas (Ordesa y Aigüestortes). Así, se ha determinado una menor tasa de defoliación y una mayor concentración de taninos condensados para el genotipo BB en bosques de baja densidad de los Parques Nacionales de Cabañeros y Monfragüe, comparadas con las de origen pirenaico. Estos resultados sugieren la existencia de un cierto grado de expresión del polimorfismo D165H/N166D de la proteína QUEi1;Myb1 en la defensa química de las plantas, si bien este efecto solo se manifiesta en determinadas condiciones ambientales.

**Evaluación de indicadores fenotípicos para la gestión de la resistencia**

La Figura 11 muestra la ubicación en el espacio generado mediante análisis factorial de las variables

morfológicas y químicas medidas en hojas y bellotas. Los factores guardan relación estrecha con la longitud de las hojas (correlación positiva con F1), la espinescencia (correlación negativa con F2) y la longitud de la bellota (correlación negativa con F3). En general las variables morfológicas foliares no se asocian significativamente a las químicas en ninguno de los parques (salvo en Aigüestortes, un parque con bajo tamaño de muestra). En el caso de las bellotas, tampoco existen relaciones generalizables pero sí se dan en Guadarrama y Sierra Nevada, donde se observan niveles significativamente mayores de defensas en bellotas de menor tamaño. Esta observación es congruente con la menor producción de defensas en hábitats abiertos, donde se producen bellotas más grandes.

Se evaluó asimismo la hipótesis que plantea que el grado de integración fenotípica morfología-defensa será mayor en poblaciones naturales (bosques) que en las explotadas (dehesas o bosques abiertos), lo que puede ser consecuencia de una posible selección artificial histórica a favor de bellotas grandes y con menos taninos. De manera no excluyente, otros factores pueden generar diferencias en el grado de integración. Sea cual sea la causa, los resultados mues-



**Figura 11.** Disposición de las variables fenotípicas analizadas en el plano definido por los dos factores principales del análisis factorial en hábitats de encinar denso (bosque) y abierto (dehesa). Clave para las abreviaturas: THO: taninos en hojas; TBE: taninos en bellotas; LHO: longitud de hoja; LPE: longitud del peciolo; LPH: longitud peciolo/hoja; AHO: anchura de hoja; LAH: longitud/anchura de hoja; NES: número de espinas; NEL: número de espinas/longitud de hoja; LBE: longitud de bellota; ABE: anchura de bellota; LAB: longitud/anchura de bellota; VBE: volumen de bellota.

**Figure 11.** Location of phenotypic variables in the plane defined by the two main factors in the factorial analysis of dense forest and dehesa. Key for abbreviations: THO: leaf tannins; TBE: acorn tannins; LHO: leaf length; LPE: petiole length; LPH: petiole/leaf length; AHO: leaf width; LAH: leaf length/width; NES: number of spines; NEL: number of spines/leaf length; LBE: acorn length; ABE: acorn width; LAB: acorn length/width; VBE: acorn volume.

tran que la disposición de las variables fenotípicas en el espacio generado por los factores multivariantes antes descritos es distinta en los dos tipos de hábitat (como ocurre también con las medias de los «factor scores» de F1, F2 y F3; Figura 11). Brevemente, las concentraciones de taninos en hojas y bellotas aparecen próximas en los dos hábitats y asociadas a la relación longitud/anchura de la bellota (nótese la diferencia en las variables contenidas en las elipses rojas). Pero en el caso de las formaciones abiertas se asocian además con la espinescencia. Esta redistribución de las variables en el espacio morfo-químico se añade a otros efectos del contraste bosque-dehesa encontrados en el proyecto.

Las relaciones encontradas entre las variables morfológicas con mayor valor predictivo de las defensas químicas y el nivel de daños encontrados en hojas y bellotas muestran significaciones estadísticas marginales en el caso de Guadarrama y no significativas en Sierra Nevada. Sin embargo, en general no parece recomendable el uso como predictoras de daños bióticos, dado que su relación con la producción de defensas no es general y que dicha producción es sólo uno de los múltiples condicionantes del daño final efectivo.

## APLICACIONES

Se señalan a continuación las aportaciones del proyecto a la gestión de los parques con presencia significativa de encinares, así como el modo en que podrían ponerse en práctica por los gestores y en colaboraciones futuras con el equipo investigador:

a) *Una metodología y una cartografía de los niveles de resistencia potencial en una especie modelo, que podrá reproducirse para otras especies de interés para los gestores.* En este caso nos referimos a la información genética derivada del proyecto. A pesar de que los resultados muestran una falta de relación general con los productos morfológicos y químicos del genoma, sí se han documentado dos casos especialmente interesantes de elevadas producciones de defensas en Picos de Europa y Cabañeros con base genética conocida. Por ello, se propone una cata-

logación pormenorizada de los genotipos de estos parques que puedan servir de base a programas de mejora genética de la resistencia.

b) *Un protocolo de discriminación de los niveles de resistencia a partir de caracteres morfológicos de fácil medición.* El estado actual de conocimientos desaconseja el uso generalizado como herramienta de predicción y gestión de las variables morfológicas.

c) *Un conjunto de criterios para favorecer el mantenimiento de la diversidad de genotipos y ecotipos con mayor potencial de resistencia.* Abundando en lo dicho en el primer apartado, se han detectado zonas con alta diversidad genotípica y fenotípica que convendría preservar y monitorizar. El caso más evidente y valioso se refiere al patrimonio genético existente en la región que contiene el Parque Nacional de Picos de Europa y las áreas adyacentes al sur (Liébana) y norte (encinares costeros con características genéticas exclusivas). Se propone un programa de conservación genética de los encinares de este sector, que parece recoger en un área pequeña una porción muy significativa de la diversidad de los encinares ibéricos.

d) Por último, y en relación con la patología de la encina conocida como «podredumbre radical» o «seca» debida al patógeno *Phytophthora cinnamomi*, este proyecto proporciona conocimientos relevantes para la gestión de la enfermedad en dos parques nacionales gravemente afectados por ella: Monfragüe y Cabañeros. Por ello se plantea, en estrecha colaboración con los gestores de la administración, realizar un programa piloto de restauración de focos de mortalidad utilizando material genético local con tolerancia aparente.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer la ayuda prestada durante el proyecto por las autoridades de gestión y los técnicos de los Parques Nacionales de Picos de Europa, Ordesa, Aigüestortes, Guadarrama, Monfragüe, Cabañeros y Sierra Nevada.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEJANO, R.; DOMINGO, J.M.; FERNÁNDEZ, M. 2011. Manual para la gestión sostenible de las dehesas andaluzas. Foro ENCINAL-Universidad de Huelva. 463 pp.
- BARBEHENN, R.V.; CONSTABEL, C. (2011). Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* 72: 1551-65.
- BERNHARDSSON, C.; INGVARSSON, P.K. 2011. Molecular population genetics of elicitor-induced resistance genes in European aspen (*Populus tremula* L., Salicaceae). *PloS one*, 6: e24867.
- CAMARERO, J.J. 2001. El decaimiento del abeto (*Abies alba* Miller) en los Pirineos aragoneses. Informe, Depto. Medio Ambiente, Gob. Aragón. Zaragoza.
- CANTOS, E.; ESPÍN, J. C.; LÓPEZ-BOTE, C.; DE LA HOZ, L.; ORDÓÑEZ, J. A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. 2003. Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus* spp.), the main dietary constituent of free-ranged Iberian pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6248-6255.
- CARNICER, J.; COLL, M.; NINYEROLA, M.; PONS, X.; SÁNCHEZ, G.; PEÑUELAS, J. 2011. Widespread crown condition decline, food web disruption, and amplified tree mortality with increased climate change-type drought. *Proceedings National Academy of Sciences* 108: 1474-1478.
- CORCOBADO, T.; CUBERA, E.; MORENO, G.; SOLLA, A. 2013. *Quercus ilex* forests are influenced by annual variations in water table, soil water deficit and fine root loss caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Agricultural and Forest Meteorology* 169: 92-99.
- DÍAZ, M.; PULIDO, F. 2009. Dehesas perennifolias de *Quercus* spp. En VVAA: Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitats de interés comunitario en España. MARM. Madrid. 69 pp.
- ECHEVARRÍA, S.; ABRIL, N.; RUIZ, J.; JORRÍN, J.; MALDONADO, A.M. 2012. Simple, rapid and reliable methods to obtain high quality RNA and genomic DNA from *Quercus ilex* L. leaves suitable for molecular biology studies. *Acta Physiologica Plantarum* 34: 793-805.
- FERNÁNDEZ-CANCIO, Á.; MANRIQUE, E.; NAVARRO-CERRILLO, R.; FERNÁNDEZ, R. 2004. La Seca como problema: su evolución. Enfoque Climático. Ministerio de Medio Ambiente. Dirección General para la Biodiversidad.
- FERNÁNDEZ-CANCIO, A.; SÁNCHEZ-SALGUERO, R.; NAVARRO-CERRILLO, R.M.; MANRIQUE-MENÉNDEZ, E.; FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, R.; GIL, P.M. 2012. Efectos del cambio climático sobre el decaimiento de los alcornocales españoles. Una aproximación fitoclimática para la futura gestión. *Ecosistemas* 21: 50-62.
- GALLARDO, A.; MORCUENDE, D. SOLLA, A.; MORENO, G.; PULIDO, F.; QUESADA, A. 2018. Regulation by biotic stress of tannins biosynthesis in *Quercus ilex*: crosstalk between defoliation and *Phytophthora cinnamomi* infection. *Physiologia Plantarum*. doi:10.1111/ppl.12848.
- GARCÍA, L. V.; RAMO, C.; APONTE, C.; MORENO, A.; DOMÍNGUEZ, M. T.; GÓMEZ-APARICIO, L.; REDONDO, R.; MARAÑÓN, T. 2011. Protected wading bird species threaten relict centenarian oaks in a Mediterranean Biosphere Reserve: a conservation management conflict. *Biological Conservation* 144: 764-771.
- HOWE, G. A.; JANDER, G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59: 41-66
- JIMÉNEZ, P.; GIL, L. 2000. Conservación de recursos genéticos de los *Quercus* mediterráneos en España. *Investigación Agraria, Recursos Forestales, Fuera de Serie* 2: 103-115.
- JONES, D. G.; DANGL, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.

- JUNTA DE ANDALUCÍA 2009. Procesos de decaimiento forestal. La seca. Consejería de Medio Ambiente. Sevilla. 110 pp.
- KLAPER, R.; RITLAND, K.; MOUSSEAU, T.; HUNTER, M. D. 2001. Heritability of phenolics in *Quercus laevis* inferred using molecular markers. *Journal of Heredity* 92: 421-426.
- KRAUS, T. E.; DAHLGREN, E. C.; ZASOSKI, R. J. 2003. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. *Plant and Soil*, 256: 41-66.
- KREMER, A. 2007. How well can existing forests withstand climate change? In: Koskela, J., Buck, A. and Teissier du Cros, E., editors. *Climate change and forest genetic diversity: Implications for sustainable forest management in Europe*. Bioersity International, Rome, Italy. pp. 3-17.
- LEDIG, T. F. 1992. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos* 63: 87-108.
- LLORET, F. 2012. Vulnerabilidad y resiliencia de ecosistemas forestales frente a episodios extremos de sequía. *Ecosistemas* 21: 85-90.
- LLORET, F.; ESCUDERO, A.; IRIONDO, J. M.; MARTÍNEZ-VILALTA, J.; VALLADARES, F. 2012. Extreme climatic events and vegetation: the role of stabilizing processes. *Global Change Biology* 18: 797-805.
- LUMARET, R.; MIR, C.; MICHAUD, H.; RAYNAL, V. 2002. Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.). *Molecular Ecology* 11: 2327-233.
- MARM 2004. La Seca: el decaimiento de encinas, alcornoques y otros *Quercus* en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 419 pp.
- PEÑUELAS, J.; FILELLA, J.; LLORET, F.; PIÑOL, J.; SISCART, D. 2000. Effects of a severe drought on water and nitrogen use by *Quercus ilex* and *Phyllirea latifolia*. *Plant Biology* 43: 47-53.
- PEÑUELAS, J., LLORET, F.; MONTOYA, R. 2001. Severe drought effects on Mediterranean woody flora. *Forest Science* 47: 214-218.
- PETERS, D. J.; CONSTABEL, C. P. 2002. Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*). *The Plant Journal*, 32: 701-12.
- POELMAN, E. H.; VAN LOON, J. J.; DICKE, M. 2008. Consequences of variation in plant defense for biodiversity at higher trophic levels. *Trends Plant Science* 13: 534-541.
- PORTH, I.; HAMBERGER, B.; WHITE, R.; RITLAND, K. 2011. Defense mechanisms against herbivory in *Picea*: sequence evolution and expression regulation of gene family members in the phenylpropanoid pathway. *BMC Genomics* 12: 608.
- RODÀ, F.; RETANA, J.; GRACIA, C.; BELLOT, J. (eds.). 1999. *Ecology of Mediterranean evergreen oak forests*. Springer-Verlag. Berlin-New York.
- SÁNCHEZ, M.E.; CAETANO, P.; FERRAZ, J.; TRAPERO, A. 2002. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. *Forest Pathology*, 32: 5-18.
- SCHWEITZER, J. A.; MADRITCH, M. D.; BAILEY, J. K.; LEROY, C. J.; FISCHER, D. G.; REHILL, B. J.; LINDROTH, R. L. *et al.*, 2008. From Genes to Ecosystems: The Genetic Basis of Condensed Tannins and Their Role in Nutrient Regulation in a *Populus* Model System. *Ecosystems* 11: 1005-1020.
- SORK, V. L.; STOW, K. A.; HOCHWENDER, C. 1993. Evidence for local adaptation in closely adjacent subpopulations of northern red oak (*Quercus rubra* L.) expressed as resistance to leaf herbivores. *American Naturalist* 142: 928-936.
- VALLADARES, F. 2008. *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. MARM. Madrid.
- VERICAT, P.; PIQUÉ, M.; SERRADA, R. 2012. *Gestión adaptativa al cambio global en masas de Quercus mediterráneas*. Centre Tecnològic Forestal de Catalunya. Solsona. 172 pp.

- VOLTAS, J.; CAMARERO, J.J.; CARULLA, D.; AGUILERA, M.; ORIZ, A.; FERRIO, J.P. 2013. A retrospective, dual-isotope approach reveals individual predispositions to winter-drought induced tree dieback in the southernmost distribution limit of Scots pine. *Plant, Cell and Environment* 36: 1435-1438.
- YUAN, L.; WANG, L.; HAN, Z.; JIANG, Y.; ZHAO, L.; LIU, H.; YANG, L. *et al.*, 2012. Molecular cloning and characterization of PtrLAR3, a gene encoding leucoanthocyanidin reductase from *Populus trichocarpa*, and its constitutive expression enhances fungal resistance in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 63: 2513-24.