



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

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

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-503

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

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

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

RODRÍGUEZ, M.^{1,2}, GALLARDO, A.³, PÉREZ, A.², y PULIDO, F.².

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

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.

Resumen

En este estudio se analiza la capacidad de encinas de siete procedencias geográficas ibéricas para responder a los daños mediante la síntesis de taninos como defensa en función del agente causante, individuo, población y región geográfica, y de este modo conocer si la exposición histórica ante el daño biótico de algunas de estas procedencias puede determinar su resistencia o mayor tolerancia al mismo.

Para ello se cultivaron en invernadero plántulas de bellotas recogidas en siete parques nacionales (7 regiones, 2 poblaciones/región, 7 árboles/población, 7 plántulas/árbol) que se sometieron a dos tipos de estrés biótico (inoculación con el patógeno radicular *Phytophthora cinnamomi* y daño mecánico del tercio superior de la plántula) para analizar las diferencias en los niveles constitutivos e inducidos de defensas.

A partir de estos análisis se observan mayores diferencias en los rasgos defensivos de árboles que se desarrollaron bajo distintos contextos históricos y ambientales que en aquellos que crecieron dentro de una misma población, así como concentraciones de taninos diversas en función de poblaciones y genotipos.

Palabras clave

Resistencia, estrés biótico, taninos, *Phytophthora*, *Quercus ilex*.

1. Introducción

En las últimas décadas los bosques ibéricos de *Quercus* están experimentando síntomas de decaimiento por diversos factores (BRASIER, 1992; BRASIER, 1996; SÁNCHEZ *et al.*, 2006), destacando el daño por agentes bióticos. Aunque la intensidad e importancia de sus efectos varía entre regiones, 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).

La acción combinada de factores climáticos estresantes y de agentes bióticos perjudiciales conforma el conocido síndrome del decaimiento. Sus efectos se agudizan en aquellas formaciones arbóreas explotadas por el hombre a lo largo de la Historia como los encinares y dehesas que, además, albergan altas tasas de diversidad biológica y constituyen la base económica de buena parte del mundo rural ibérico (PEÑUELAS *et al.*, 2001).

Parece que los factores de estrés abiótico son los responsables de mayor importancia en el decaimiento de las áreas de bosque denso (CAMARERO *et al.*, 2015), mientras que los bióticos pudieran jugar un papel determinante en formaciones abiertas con arbolado ralo en muchos casos y envejecido, donde existe menor competencia por los recursos hídricos pero hay una incidencia más alta de agentes vivos capaces de causar daños (JUNTA DE ANDALUCÍA, 2009). Hasta el momento, los distintos procesos de decaimiento han sido estudiados abordando el problema en el conjunto de la masa, sin analizar las posibles diferencias en la susceptibilidad que pudiera existir entre individuos, poblaciones y regiones.

El estudio de la base genética que explica estas diferencias requiere el empleo de herramientas de biología molecular aplicadas a distintas escalas espaciales para conocer y predecir la resistencia al estrés biótico causado. De este modo, se facilita el diseño posterior de un instrumento para la gestión de las áreas afectadas que contemple la promoción de la diversidad genotípica para aumentar la resiliencia de los sistemas forestales. Para ello se ha utilizado la encina (*Quercus ilex*) como especie forestal modelo ampliamente estudiada y presente en todos los parques nacionales terrestres españoles. Las morfologías estudiadas fueron siempre de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* en Aigüestortes, Cabañeros, Guadarrama, Monfragüe, Ordesa y Sierra Nevada, salvo en Picos de Europa, donde también se recogió bellota de una población de *Quercus ilex* subsp. *ilex*.

Las defensas químicas principales en *Quercus* se basan en la síntesis de compuestos fenólicos, destacando entre ellos los taninos de alto peso molecular, tanto los hidrolizables (Th, derivados de ácidos gálico y elágico) como los condensados (Tc, también conocidos como “proantocianidinas”). Su función es reducir la digestibilidad de los tejidos en los herbívoros (HASLAM, 2007), provocar alteraciones metabólicas en insectos (BARBEHENN *et al.*, 2009) y, según algunos trabajos realizados sobre especies de robles americanos y centroeuropeos, imponer una barrera a la acción de patógenos radiculares (OLIVA *et al.*, 1999; KRAUS *et al.*, 2003), aunque este mecanismo de resistencia es aún bastante desconocido en el contexto mediterráneo. Según datos propios, el 90% de los taninos totales en hojas de encina son taninos condensados (Tc).

Los niveles de resistencia constitutiva corresponden a rasgos defensivos de las plantas relativamente estables o cuya variación depende de factores internos, mientras que las defensas inducidas se generan como respuesta a la acción de agentes bióticos externos (SCHULTZ, 1988). Ambos tipos se encuentran controlados genéticamente y presentan variaciones entre genotipos y procedencias (DICKE y HILKER, 2003). Las diferencias individuales y poblacionales entre defensas constitutivas e inducidas determinan el grado de plasticidad de la especie en cada región de procedencia y constituyen la base genética para diseñar una estrategia de actuación frente a escenarios de futuro en condiciones ambientales cambiantes.

2. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo es estudiar la capacidad de la encina para responder a los daños (inducibilidad) mediante la síntesis de defensas en función del agente causante, el individuo, la población y la región de procedencia.

En primer lugar, se estudian las defensas constitutivas para conocer si hay mayor variabilidad entre regiones, poblaciones o genotipos. Seguidamente se analiza la respuesta inducida a partir de la aplicación de varios tratamientos de daño mecánico y por patógenos con el fin de responder a las siguientes cuestiones:

- 1) Los tratamientos aplicados, ¿incrementan siempre la producción de taninos?
- 2) ¿Inducen respuestas similares o específicas de cada uno de ellos? ¿Qué tratamientos inducen mayor producción?
- 3) ¿Existen diferencias significativas en la producción de taninos entre regiones, poblaciones y genotipos a partir de la aplicación de los tratamientos? ¿Surgen interacciones entre ellos?
- 4) ¿Existen efectos sinérgicos en la acción conjunta del patógeno radical y el daño mecánico de la parte aérea de la planta?

3. Metodología

3.1. Selección de poblaciones y bellotas para siembra posterior en invernadero

Se seleccionaron dos poblaciones por cada Parque Nacional terrestre con presencia de la especie: Aigüestortes, Cabañeros, Guadarrama, Monfragüe, Ordesa, Picos de Europa y Sierra Nevada (Figura 1).

Las bellotas fueron recolectadas entre los meses de noviembre y diciembre de 2015 en las siete regiones de procedencia y sembradas en los invernaderos del Centro Universitario de Plasencia (UTM Zona 29N X: 748862; Y: 4435709, 374 msnm).

Dentro de cada Parque (región de procedencia) se colectaron bellotas maduras y sin signos de infestación. Para evaluar su viabilidad, se sometieron a flotación antes de la siembra.



Figura 1. Localización de los Parques Nacionales terrestres con presencia de encina y área de distribución de la especie en España (en amarillo). 1. Monfragüe, 2. Cabañeros, 3. Sierra Nevada, 4. Picos de Europa, 5. Ordesa, 6. Aigüestortes y 7. Guadarrama.

En Aigüestortes, debido a problemas en la viabilidad de las bellotas recogidas y a que estas no se encontraron en número suficiente, no se pudo continuar con el experimento.

3.2. Diseño experimental

El estudio se llevó a cabo con plántulas de encina obtenidas en invernadero a partir de las bellotas recolectadas en las 14 poblaciones (2 por cada una de las 7 regiones de procedencia), ajustando su análisis a un diseño de tipo encajado con un total de 1960 plántulas (7 regiones x 2 poblaciones/región x 7 árboles/población x 4 tratamientos x 5 bellotas/plántulas). Este diseño persigue valorar los efectos geográficos y genéticos sobre la resistencia de las distintas plántulas ante el daño inducido y establecer las posibles diferencias en la respuesta según el agente responsable.

3.3. Siembra y cultivo en invernadero

Antes de la siembra, las bellotas se colocaron en bandejas con arena esterilizada para su germinación. Una vez emergidas las radículas, las bellotas recolectadas fueron sembradas a finales del mes de diciembre en invernadero, en bandejas forestales de 28 alveolos con sustrato universal COMPO 80 litros (turba, perlita, Agrosil y NPK 11-5-5) y dispuestas completamente aleatorizadas, según el diseño experimental anteriormente expuesto. Con objeto de asegurar la emergencia de un número suficiente de plántulas, se sembraron 2 bellotas por alveolo, seleccionando más tarde la primera emergida. La emergencia tuvo lugar durante el mes de febrero y, de forma generalizada, las plántulas crecieron de forma exitosa.

3.4. Aplicación de tratamientos experimentales

Una vez concluida la emergencia y alcanzado un desarrollo mínimo, las plántulas nacidas fueron sometidas en la última semana de mayo a distintos tratamientos 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) (X)
- control (C)

El tratamiento control permite conocer las defensas constitutivas de las plántulas estudiadas y el mixto ofrece la posibilidad de analizar posibles interacciones entre ambos daños bióticos. La aplicación de dichos tratamientos se hizo a partes iguales. El patógeno fue aislado por el Grupo de Investigación Forestal (GIF) de la Universidad de Extremadura en una dehesa de Valverde de Mérida (Badajoz) en el año 2008 sobre un foco de seca. La cepa UEx1 (A2 mating type) se ha reactivado cada año y conservado en frío a 10°C. Para este ensayo se procedió de nuevo a su activación mediante el paso por un huésped (a partir de hojas y raíces de encina y castaño) dos semanas antes de su cultivo, comprobando su alta virulencia. El método elegido para su cultivo en laboratorio fue el desarrollado ampliamente por el GIF, con inóculo en medio V8, avena y vermiculita (JUNG et al., 1996).

La infección se facilitó inoculando el suelo con una cepa del patógeno citado, introduciendo en cada alveolo 20 cc del cultivo miceliar que había crecido previamente en incubadora y bajo condiciones controladas durante un mes.

La simulación del daño mecánico que un herbívoro pudiera ocasionar sobre la plántula se hizo a partir del tronchado del tercio superior de la planta.

La aparición de síntomas y evolución de la mortalidad fue registrada para cada planta con una periodicidad semanal, verificando en el caso de los tratados con el patógeno radical que la mortalidad había sido inducida por el mismo, a partir del aislado en medio selectivo PARPH de una muestra al azar de pequeños trozos de raicillas.

3.5. Selección de plántulas y almacenamiento de la muestra objeto de análisis

En la segunda quincena de junio se cosecharon 3 plántulas por cada árbol madre estudiado, retirando el sustrato con especial precaución para no dañar la planta y procesando la muestra para su congelación a -80°C.

Posteriormente, las plántulas seleccionadas fueron pesadas y se les cortaron 5-6 hojas/planta con el fin de analizar en ellas la concentración de taninos.

Estas hojas fueron envasadas en pequeños recipientes rotulados y liofilizadas antes de ser de nuevo almacenadas y conservadas a -80°C a la espera de la extracción de fenoles y cuantificación de taninos en laboratorio, evitando durante todo el proceso fenómenos de congelación/descongelación.

La liofilización se realizó mediante el liofilizador Telstar LyoQuest (-55°C de temperatura y 0,001-0,002 mbar de presión). Posteriormente se molieron de manera individualizada hasta alcanzar un tamaño fino de partículas, esterilizando el molinillo entre muestra y muestra. Una vez finalizada la molienda, todo el material volvió a conservarse a -80°C para su posterior análisis.

3.6. Análisis químico de la variable respuesta: taninos

Tras la aplicación de los tratamientos, la respuesta de las plántulas y sus diferencias entre individuos y procedencias se estimó a partir del análisis de la producción de fenoles mediante el método de Folin-Ciocalteu.

Se pesó una cantidad de 50 mg de muestra liofilizada por cada plántula objeto de análisis utilizando balanza de precisión y se les añadió posteriormente metanol diluido al 70% en agua (1 ml de metanol al 70% + 50 mg de la muestra liofilizada). Esta suspensión se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, agitando con vortex cada 10 minutos en dicho intervalo de una hora. Pasado ese tiempo, se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a 10.000 rpm y 4°C. El sobrenadante resultante constituye el extracto, y fue recuperado y congelado en tubos eppendorf de 1,5 ml.

3.6.1. Medida de los taninos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

Este método se basa en el hecho de que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 725 nm.

Antes de comenzar, se optimizó la dilución, optando finalmente por la dilución 1:20 (25 µl de extracto puro y 475 µl de metanol al 10%).

Más adelante, se probaron dichas diluciones, añadiendo 60 µl del extracto diluido, 140µl de agua destilada (para alcanzar la alícuota final de 200µl), 1 ml de Folin y 0,8 ml de carbonato de sodio (en este orden). La mezcla resultante se agitó y mantuvo a temperatura ambiente en oscuridad total durante 45 minutos.

Previamente, se prepararon los reactivos de Folin (disolución del concentrado de Folin y Ciocalteu Feud en agua destilada al 10%) y el Carbonato de sodio (Na₂CO₃), al 7,5% en agua destilada.

En cada tanda analizada de manera experimental se incluyó una recta patrón de ácido gálico preparada a partir de una solución madre de concentración conocida (100 mg de ácido gálico en 100 ml agua destilada). Puntos de la recta patrón: 20, 40, 60, 100 y 150 mg/L (200 µl/punto + 1ml Folin + 0,8ml Na₂CO₃).

Blanco para calibrar el espectrofotómetro: 200 µl agua destilada + 1ml Folin + 0,8ml Na₂CO₃.

Tabla 1. Puntos de la curva de ácido gálico.

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

Una vez transcurrido el tiempo de espera de 45 minutos, se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 725 nm, comprobando que los valores de absorbancia estaban dentro de la recta patrón.

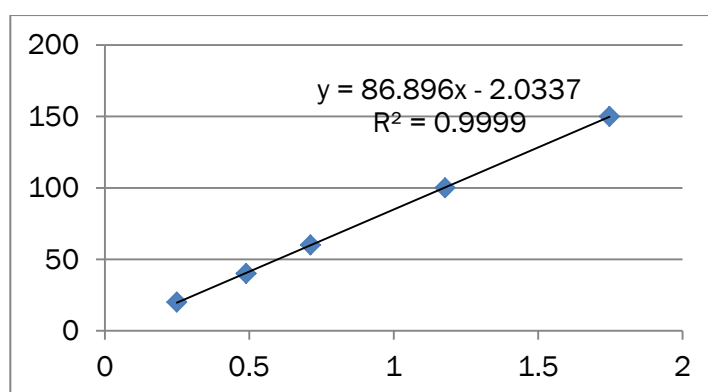


Figura 2. Recta patrón y concentración de taninos estimada (mg GAE/L).

Finalmente, la concentración de taninos se calculó extrapolando los datos de absorbancia obtenidos sobre la curva patrón de ácido gálico, considerando que, según datos propios estimados a partir de HPLC, el 90% son taninos condensados. La cantidad total se expresó como miligramos de Equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de muestra. Todo el proceso de cálculo fue realizado sobre una hoja de Microsoft Excel.

3.7. Análisis de los datos

El efecto de los diferentes tratamientos y su dependencia de la región de procedencia, población y genotipo se analizó a partir del empleo de modelos lineales generalizados (GLM) aplicados sobre un diseño de ANOVA mixto en el software de Statistica v10 para estimar la significación de los diferentes factores y el test de Tukey para comparar medias.

El contenido de taninos expresado en mg GAE/g por muestra fue usado como variable dependiente. Los factores categóricos fueron la región, la población y el genotipo. El factor población fue estudiado encajado en la región y el genotipo en la población y región, de acuerdo con el diseño experimental propuesto.

4. Resultados

4.1. Estudio de la resistencia constitutiva: mayor variabilidad entre regiones y genotipos que entre poblaciones.

Se observaron diferencias significativas en la concentración de taninos según la región de procedencia y genotipos ($p < 0,05$; Tabla 2).

Tabla 2. Test de significancia para la variable "taninos" mediante GLM.

Efecto	SS	Grados de lib.	MS	F	p
Región	5470,6	5	1094,1	12,022	0,000000*
Población (región)	415,5	6	69,3	0,761	0,602025
Genotipo (región* población)	7330,2	54	135,7	1,492	0,036386*

Las defensas constitutivas más bajas 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 (Figura 3).

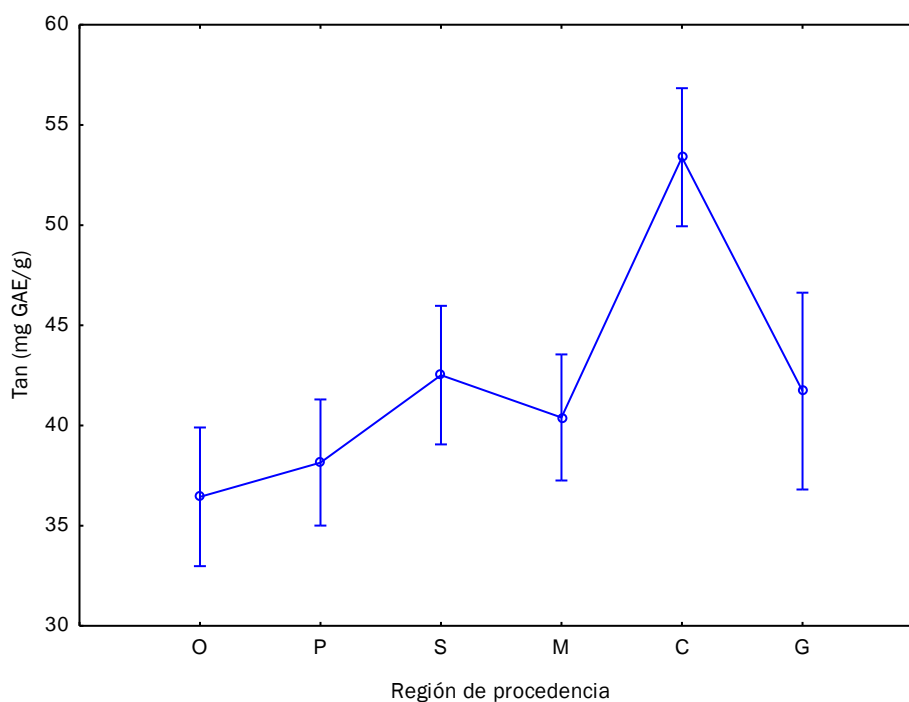


Figura 3. Niveles constitutivos de taninos en hojas de *Quercus ilex* según región de procedencia.

Por el contrario, no hubo diferencias significativas por efecto de las poblaciones (Figura 4) y, sin embargo, sí entre genotipos (Figura 5).

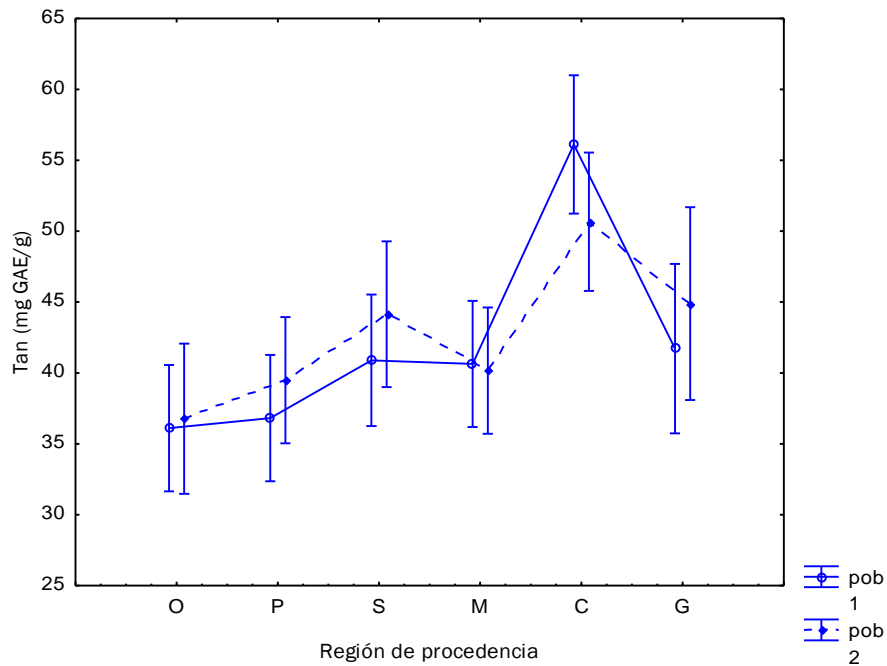


Figura 4. Niveles constitutivos de taninos en hojas de *Quercus ilex* según región de procedencia y población.

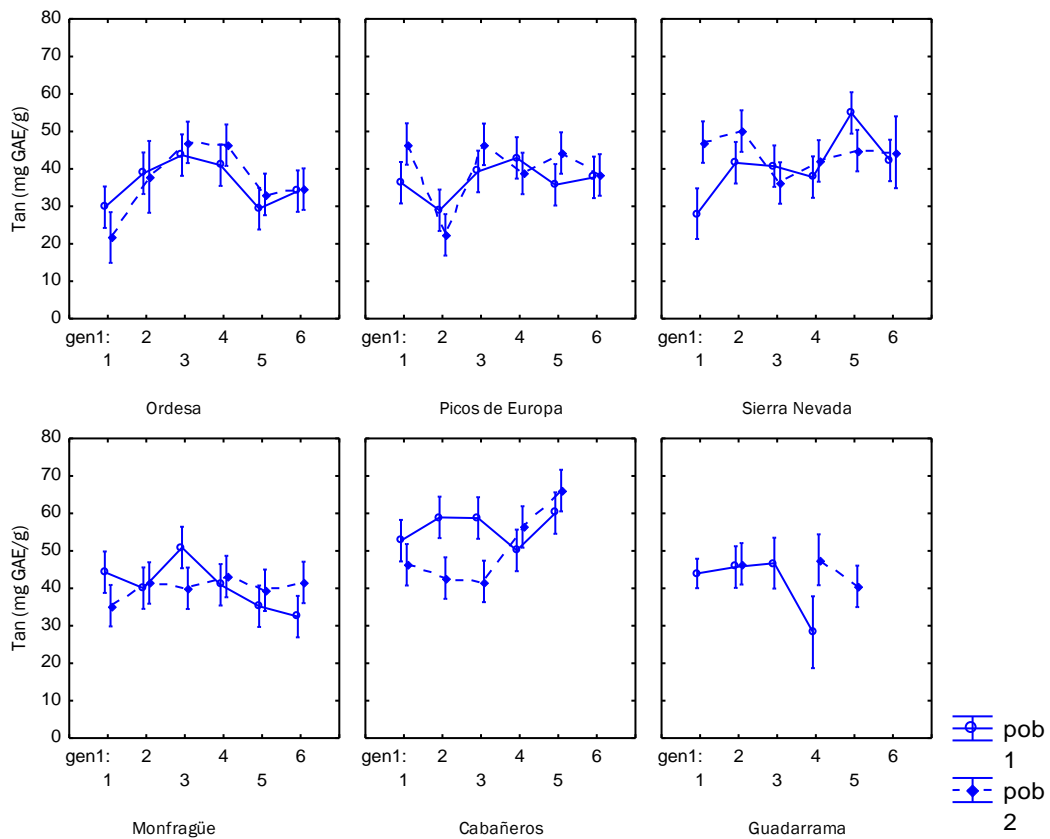


Figura 5. Niveles constitutivos de taninos en hojas de encina según región de procedencia, población y genotipo.

4.2. Estudio de la resistencia inducida

4.2.1. Los tratamientos aplicados incrementan siempre la producción de taninos.

Para el análisis de la resistencia inducida por la aplicación de tratamientos hubo que prescindir de las plántulas procedentes de Guadarrama, pues las emergidas tras la siembra no fueron suficientes para desarrollar la inducción de defensas en este Parque.

En todos los casos restantes (5 Parques), la producción de taninos se incrementó con la aplicación de los tratamientos descritos (Figura 6).

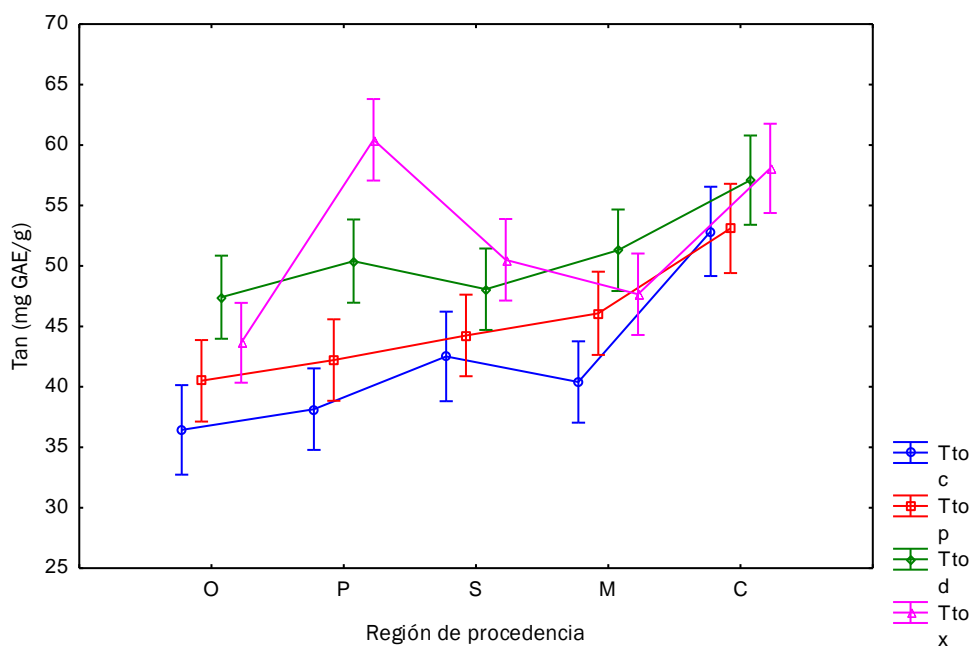


Figura 6. Niveles constitutivos e inducidos de taninos en hojas de *Quercus ilex* según región de procedencia y tratamiento.

Tabla 3. Test de significancia para la variable "taninos" mediante GLM en los cuatro tratamientos (incluido control).

Efecto	SS	Grados de lib.	MS	F	p
reg	11233	5	2247	22,08	0,000000*
pob(reg)	1951	6	325	3,20	0,004402*
tto	7742	3	2581	25,36	0,000000*
pob(reg)*tto	1193	15	80	0,78	0,698575
gen(pob(reg))	14144	56	253	2,48	0,000000*
tto*gen(pob(reg))	18305	137	134	1,31	0,020464*
reg*tto	4673	13	359	3,53	0,000028*

4.2.2. La respuesta inducida es distinta según el tratamiento aplicado. El tronchado favorece una mayor producción de taninos que la infección con el patógeno radical.

El estudio estadístico de los niveles de taninos inducidos muestra que la respuesta es distinta según el tratamiento realizado. Los valores más altos se alcanzaron con la acción combinada del tronchado (daño mecánico) e inoculación con el patógeno en 3 de los 5 parques, mientras que los menores fueron los resultantes de la acción del patógeno radical en los 5 parques (Figura 6).

Tabla 4. Test de significancia para la variable "taninos" mediante GLM en las tres aplicaciones.

Efecto	SS	Grados de lib.	MS	F	p
pob(reg)	1824	6	304	2,75	0,012398*
tto	4950	2	2475	22,43	0,000000*
reg	8311	5	1662	15,06	0,000000*
reg*tto	4297	10	430	3,89	0,000047*
pob(reg)*tto	1568	12	131	1,18	0,292332
gen(pob(reg))	13747	56	245	2,22	0,000005*
tto*gen(pob(reg))	13624	106	129	1,16	0,152444

4.2.3. La producción de taninos presenta diferencias significativas entre regiones, poblaciones, genotipos y tratamientos.

Existen interacciones tratamiento/región y tratamiento/genotipo, pero estas son más débiles, especialmente en el segundo caso (Tabla 4).

4.2.4. 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.

La inducción de defensas ante un daño mecánico es, generalmente, mayor que cuando el agente causante de estrés es el patógeno radical. No obstante, en Cabañeros, Picos de Europa y Sierra Nevada, el efecto combinado de ambos tratamientos indujo producciones más altas de taninos frente al daño. En Ordesa y Monfragüe, esta producción se ve mermada con la aplicación conjunta de tratamientos, mostrando interacciones entre estos (Figura 6, Tabla 4).

5. Discusión

Se ha podido observar que las defensas constitutivas de la encina varían según la región y genotipo del que proceden. Generalmente, las áreas situadas al norte de la Península han mostrado niveles de taninos más bajos que las sureñas.

Tras la aplicación de los tratamientos dirigidos a la inducción de defensas tánicas, todos resultaron positivos, incrementando los niveles basales, aunque en distinta cuantía según la naturaleza del agente causante. Esta cierta especificidad ya ha sido descrita en otros géneros por diversos autores (WAR, 2012) pero no en *Quercus ilex*.

Se detectaron también interacciones entre tratamientos aunque estas no resultaron demasiado significativas en algunos parques.

A pesar de que no existen, por el momento, estudios concluyentes versados en la síntesis de taninos frente al ataque de patógenos radicales en encina, lo que sí ha sido comprobado durante este estudio es que el tronchado del tercio superior de la plántula estimula una respuesta defensiva tánica importante que supera normalmente a la provocada por el ataque del patógeno de la raíz, algo que cabía esperar dado que el mecanismo de defensa químico es conocido sobre todo por su protección ante los herbívoros.

La capacidad de respuesta a la síntesis de taninos permite estimar la plasticidad de la especie en distintas zonas geográficas sometidas a manejos dispares, de modo que se han detectado genotipos con bajos niveles de defensas constitutivas que al ser atacados con agentes bióticos suben significativamente mientras que otros con altos niveles de defensas constitutivas, al ser atacados, suben en menor cuantía que los anteriores. Este último es el caso de Cabañeros, que aunque tiene los índices más elevados de taninos basales, cuando es atacado por los agentes bióticos su respuesta es más baja, en términos relativos, de la que presentan los cuatro parques restantes.

Asimismo, se ha constatado que la variabilidad es mayor entre regiones que entre poblaciones dentro de regiones, consecuencia probablemente de la diferencia que existe entre los procesos históricos y demográficos que han modelado e influido en la diversidad genética de la especie.

6. 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.

7. 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.

Este trabajo ha sido 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*”, del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España, y por los fondos INIA/CICYTEX a través de la beca de formación FPI-INIA 2015 de Manuela Rodríguez.

8. Bibliografía

BARBEHENN, RV.; JAROS, A.; LEE, G.; MOZOLA, C.; WEIR, Q.; SALMINEN, JP.; 2009. Tree resistance to *Lymantria dispar* caterpillars: importance and limitations of foliar tannin composition. *Oecología*. **159**, 777-788.

BRASIER, CM.; 1992. Oak tree mortality in Iberia. *Nature* **360**, 539.

BRASIER, CM.; 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in Southern Europe. Environmental constraints, including climate change. *Ann For Sci* **53**, 347-58.

CAMARERO, JJ.; GAZOL, A.; SANGÜESA-BARREDA, G.; OLIVA, J.; VICENTE-SERRANO, SM.; 2015. To die or not to die: early warnings of tree dieback in response to a severe drought. *Journal of Ecology* **103**: 44-57.

- CANTOS, E.; ESPÍN, JC.; LÓPEZ-BOTE, C.; DE LA HOZ, L.; ORDÓÑEZ, JA.; TOMÁS-BARBERÁN, FA.; 2003. Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus* spp.), the main dietary constituent of free-range Iberian pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 6248-6255.
- CORCOBADO, T.; SOLLA, A.; MADEIRA, M.A.; MORENO, G.; 2013. Combined effects of soil properties and *Phytophthora cinnamomi* infections on *Quercus ilex* decline. *Plant Soil* **373**, 403-413.
- DICKE, M.; HILKER, M.; 2003. Induced plant defences: from molecular biology to evolutionary ecology. *Basic & Appl Ecol* **14**: 3-14.
- FERNÁNDEZ-CANCIO, A.; SÁNCHEZ, R.; NAVARRO, RM., MANRIQUE, E.; FERNÁNDEZ, R.; GIL, PM. 2012. Efectos del cambio climático sobre el decaimiento de los alcornoques españoles. Una aproximación fitoclimática para la futura gestión. *Ecosistemas* **21**(3):50-62.
- HASLAM, E.; 2007.; Vegetable tannins-lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* **68**: 2713-2721.
- HOWE, GA.; JANDER, G.; 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Ann Rev Plant Biol* **59**: 41-66.
- JUNG, T.; BASCHKE, H.; NEUMANN, P.; 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *Pathology* **26**: 253-272.
- JUNG, T.; COOKE, D.G.L; BLASHKE, H.; DUNCAN, J.M.; OSWALD, W.; 1999. *Phytophthora quercinea* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycological Research* **103**: 785-798).
- JUNTA DE ANDALUCÍA, 2009. Procesos de decaimiento forestal. La seca. Consejería de Medio Ambiente. 110 pp.
- KRAUS, TE.; DAHLGREN, EC.; ZASOSKI, RJ.; 2003. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. *Plant and Soil*, **256**: 41-66.
- LLORET, F.; ESCUDERO, A.; IRIONDO, JM.; MARTÍNEZ-VILALTA, J.; VALLADARES, F.; 2012. Extreme climatic events and vegetation: the role of stabilizing processes. *Global Change Biol* **18**: 797-805.
- MOREIRA, A.C.; 2001. Aspectos da interação entre *Phytophthora cinnamomi* e a doença do declínio em *Quercus suber* e *Quercus rotundifolia*. Dissertação de doutoramento. Universidade do Algarve.
- NAVARRO, R.M.; FERNÁNDEZ, P.; TRAPERO, A.; CAETANO, P.; ROMERO, M.A.; SÁNCHEZ, M.E.; FERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ, I.; LÓPEZ, G.; 2004. Los procesos de decaimiento de encinas y alcornoques. Monografía. Convenio Consejería de Medio Ambiente-Universidad de Córdoba. Dirección General de Gestión del Medio Natural. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. 32 pp.
- OLIVA, A.; LAHOZ, E.; CONTILLO, R.; ALIOTA, G.; 1999. Fungistatic activity of *Ruta graveolens* extract and its allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, **25**: 519-526.
- PEÑUELAS, J.; LLORET, F.; MONTOYA, R.; 2001. Severe drought effects on Mediterranean woody flora. *Forest Sc* **47**: 214-218.
- PEREA, R.; GIL, L.; 2014. Shrubs facilitating seedling performance in ungulate- dominated systems: Biotic vs. abiotic mechanisms of plant facilitation. *European Journal of Forest Research* **133**:525-534.
- PÉREZ, G.; GONZÁLEZ, A.; OYAMA, K.; CUEVAS, P.; 2013. Importancia de la diversidad genética sobre la defensa química de plantas y las comunidades de herbívoros. *Biológicas*, **15**(2): 1-8.
- SÁNCHEZ, ME.; CAETANO, P.; ROMERO, MA.; NAVARRO, RM.; TRAPERO, A.; 2006. *Phytophthora* root rot as the main factor of oak decline in southern Spain. In: Brasier C, Jung T, Oswald W, eds. Progress in Research on *Phytophthora* Diseases of Forest Trees. Farnham, Surrey, UK: *Forest Research*, 149-54.
- SCHULTZ, J.; 1988. Plant responses to herbivores. *Trends Ecol Evol* **3**: 45:49.

SOLLA, A.; MILANOVIC, S.; GALLARDO, A.; BUENO, A.; CORCOBADO, T.; CÁCERES, Y.; MORCUENDE, D.; QUESADA, A.; MORENO, G.; PULIDO, F.; 2016. Genetic determination of tannins and herbivore resistance in *Quercus ilex*. *Tree Genetics & Genomes* **12**: 117.

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; AHMAD, T.; BUHROO, A.A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H.C.; 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav.* **7**(10): 1306–1320.