



Facultad de Biología

Trabajo de Fin de Grado

Distancia filogenética a las especies de robles nativos como predictor de las interacciones tritróficas en especies de robles exóticos

Carla Pastoriza Touriño

Grado en Biología, curso 2019-2020

Trabajo de Fin de Grado presentado en la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela para la obtención del Grado en Biología

RESUMEN

Las invasiones por parte de especies de plantas exóticas son cada vez más frecuentes y tienen efectos más negativos sobre los ecosistemas. Varias teorías ecológicas han predicho que el éxito invasor de las especies de plantas exóticas es debido a que al introducirse en una nueva región experimentan una disminución en la abundancia de sus herbívoros, lo cual resulta en un mejor desempeño (*fitness*) y una rápida expansión. Trabajos recientes han demostrado que el grado de parentesco (e.g. distancia filogenética) entre especies exóticas y nativas determina en gran medida las interacciones entre las plantas exóticas y los herbívoros nativos. Sin embargo, los mecanismos defensivos que determinan esos efectos del grado de parentesco sobre la herbivoría en especies exóticas apenas son conocidos. En este Trabajo de Fin de Grado analizamos el papel que juega la distancia filogenética entre especies de robles exóticos y nativos en los patrones de herbivoría que sufren los robles exóticos, así como en sus defensas indirectas (compuestos orgánicos volátiles) y en la predación de los herbívoros por parte del tercer nivel trófico (enemigos naturales de los herbívoros como pájaros y hormigas). Para ello llevamos a cabo un experimento en un jardín común situado en la Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC) en Pontevedra con 20 especies de robles exóticos y cuatro especies de roble nativos. Nuestros resultados muestran que las especies de robles exóticos más distantes filogenéticamente de las especies nativas sufren menos herbivoría. Sin embargo, la distancia filogenética entre las especies de robles exóticos y nativos no afectó significativamente a las defensas indirectas ni a la predación de los herbívoros por parte del tercer nivel trófico. En general, este trabajo mejora nuestro conocimiento sobre cómo las relaciones evolutivas entre las plantas nativas y exóticas determinan el éxito de estas últimas en nuevos hábitats a través de sus interacciones con los herbívoros nativos.

Palabras clave: compuestos orgánicos volátiles, defensas químicas, filogenia, interacciones planta-herbívoro, invasiones biológicas, predadores, *Quercus*

INTRODUCCIÓN

Las especies de plantas exóticas son aquellas que se introducen accidental o intencionadamente en una región diferente a su estado natural (Elton 1958). Estas especies pueden llegar a ser invasoras si producen cambios drásticos en los nuevos ecosistemas y suponen una amenaza para las especies animales y vegetales nativas (Alpert et al. 2000, Richardson and Rejmánek 2011). Las invasiones biológicas producidas por estas especies exóticas suponen un gran problema económico y ambiental, situándose como la segunda causa de pérdida de biodiversidad tras la destrucción del hábitat (Alpert et al. 2000).

Durante las últimas tres décadas los ecólogos han tratado de comprender los mecanismos por los que estas plantas exóticas invaden nuevos hábitats. Una de las teorías ecológicas más aceptadas para explicar dicho éxito invasor es la *Enemy Release Hypothesis* (ERH), la cual postula que las plantas exóticas al introducirse en una nueva región experimentan una disminución en la abundancia de sus herbívoros (y por lo tanto del daño por herbivoría), lo cual resulta para las plantas exóticas en un mejor desempeño (*fitness*) y una rápida expansión (Keane and Crawley 2002, Funk and Throop 2010). Sin embargo, a pesar de que muchos estudios han soportado las predicciones de la ERH, varias investigaciones también han encontrado que los herbívoros nativos pueden limitar las invasiones biológicas (Maron and Vilà 2001, Rogers and Siemann 2004, Parker and Hay 2005, Morrison and Hay 2011, Zas et al. 2011). Por lo tanto, y con el fin de reducir el impacto de las invasiones biológicas dentro de un marco de cambio global, actualmente existe una necesidad imperiosa de entender cuáles son los factores que determinan las interacciones entre los herbívoros nativos y las plantas exóticas.

Recientemente un número creciente de estudios ha demostrado que la distancia filogenética entre las especies de plantas exóticas y nativas locales determina en gran medida las interacciones entre dichas plantas exóticas y los herbívoros nativos (Funk et al. 2008, Hill and Kotanen 2010, Pearse and Hipp 2014, Moreira et al. 2019). En este sentido, dos trabajos recientes llevados a cabo independientemente en Norteamérica y Europa han encontrado que las especies de robles (género *Quercus*) exóticos más distantes filogenéticamente de las especies de robles nativos sufrieron un menor daño por herbivoría en sus hojas (Pearse and Hipp 2014, Moreira et

al. 2019). Además, y en contra de lo esperado, en ambos estudios se encontró que las especies de roble más distantes filogenéticamente de las locales tenían niveles más bajos de defensas químicas (compuestos fenólicos) en sus hojas (Pearse and Hipp 2014, Moreira et al. 2019). Esta incongruencia, es decir un menor daño por herbívoros en especies con menores niveles de defensas, nos lleva a ahondar un poco más en los mecanismos defensivos de los robles exóticos.

Los mecanismos de defensa en las plantas se clasifican en defensas directas e indirectas (Agrawal 2011). Por un lado, las defensas directas son aquellos rasgos físicos (e.g. espinas, tricomas, dureza de la hoja) o químicos (e.g. fenoles, terpenos, alcaloides) que repelen y reducen el consumo y la tasa reproductiva de los herbívoros (Agrawal 2007, Núñez-Farfán et al. 2007). Por otro lado, las defensas indirectas son aquellos rasgos físicos (e.g. domatia, néctar extrafloral) o químicos (e.g. compuestos orgánicos volátiles, VOCs) que atraen a los enemigos naturales de los herbívoros (predadores y parasitoides), reduciendo de este modo los niveles de herbivoría en las plantas (Heil 2008, Kessler and Heil 2011, Turlings and Erb 2018). A pesar de la importancia de las defensas indirectas (tercer nivel trófico) en la resistencia de las plantas contra sus enemigos (Turlings and Erb 2018) su papel en las invasiones biológicas es prácticamente desconocido.

OBJETIVOS Y RELEVANCIA DEL PROYECTO

Los objetivos de este Trabajo Fin de Grado (TFG) fueron investigar si:

- (1) Tal y como se ha observado en estudios anteriores (Pearse and Hipp 2014, Moreira et al. 2019), la distancia filogenética entre especies de robles nativos y exóticos predice el daño causado por los herbívoros en plantas jóvenes de robles exóticos.
- (2) Las defensas indirectas (VOCs) y la predación de los herbívoros por parte del tercer nivel trófico (vertebrados como los pájaros, o insectos como las hormigas) determinan los efectos de la distancia filogenética sobre los patrones de herbivoría en robles exóticos.

Los resultados de este estudio tendrán una gran relevancia para la industria forestal ya que es posible que las especies de robles más alejadas filogenéticamente de las especies nativas puedan escapar más fácilmente de los herbívoros nativos y tener por lo tanto un mayor potencial invasor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Experimento de campo

Para este TFG empleamos un jardín común situado en la Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC) en Pontevedra (42°24'20"N, 8°38'51"W). Este jardín común incluye cuatro especies de robles nativos locales (*Quercus robur* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebl., *Q. suber* L. y *Q. pyrenaica* Willd.), las cuales se distribuyen de forma natural en radio menor a 200 km de la zona de estudio (Moreira et al. 2019). El jardín común también incluye 20 especies de robles exóticos (*Q. ilex* L., *Q. faginea* Lam., *Q. pubescens* Willd., *Q. coccifera* L., *Q. frainetto* Ten., y *Q. cerris* L. originarias de Europa; *Q. bicolor* Willd., *Q. agrifolia* Née, *Q. macrocarpa* Michx., *Q. coccinea* Münchh., *Q. rubra* L., *Q. shumardii* Buckley, *Q. palustris* Münchh., *Q. nigra* L., *Q. texana* Buckley, *Q. velutina* Lam., *Q. phellos* L. y *Q. stellata* Wangenh. originarias de Norte América; *Q. serrata* Murray y *Q. phillyraeoides* A.Gray. originarias de Asia) (Moreira et al. 2019). Las plantas tenían cuatro años de edad. El diseño experimental de la parcela es completamente aleatorizado, con las plantas separadas por 2 m. El número de réplicas varía entre 3-8 individuos por especie excepto para *Q. robur* y *Q. rubra* donde había 27 y 22 individuos, respectivamente. El total de plantas en el jardín común fue de 162 (Figura 1).

CARRETERA												
	I	H	G	F	E	D	C	B	A			
MAÍZ						PUB		ROB	ROB		1	PINOS
					MUE	AGR	STELL	RUB	RUB	RUB	2	
		FRAI	SERR	FRAI	PYR	SUB		ROB	ROB	ROB	3	
		FAG			ACUT	MAC	AGR	RUB	RUB		4	
		ROB	PUB	FRAI	MUE		MUE	RUB	ROB	ROB	5	
		SHUM		SHUM	NUT	ILEX	CERR	RUB	RUB	RUB	6	
			PHEL		SUB	AGR	GAR	MAC	FAG	ROB	7	
		PHIL	CERR	COC	MAC		PUB	AGR	RUB	RUB	8	
		SERR	PET	STELL	PAL	ACUT	COCCINEA	ILEX	ROB	ROB	9	
		ROB	PHIL	COC		ILEX	FAL		RUB	RUB	10	
		PAL	PAL			PYR		PHIL	ROB		11	
		PET		BIC		PYR		ILEX		RUB	12	
		ROB		NUT	SUB	COC	GLA	VELUT	ROB	ROB	13	
		PHEL		NUT	COCCINEA		FAG	GAR	RUB	RUB	14	
		BIC	SUB	NIG	PUB	COCCINEA	AGR	FAG	ROB	ROB	15	
		ROB	PYR	NIG	IMB	GAR	MAC		RUB	RUB	16	
		PAL	AGR	AGR	MAC	ILEX	MAC		ROB	ROB	17	
		PET		LAN		SHUM		AGR		RUB	18	
		PHIL	SUB?	CERR	SUB	PUB	PHEL	COC	ROB	ROB	19	
		SERR	VELUT	SUB	PYR	FAG	PAL	SERR	RUB	RUB	20	
		COCCINEA	BIC	NIG	MUE	PAL	IMB		ROB	ROB	21	
		PHEL	MAC			PYR	PUB	PHEL	RUB	RUB	22	
				VELUT	PUB	ILEX	PHIL	SHUM	FAG	ROB	23	
					STELL		SERR	MAC			24	

Figura 1. Esquema del diseño experimental en el jardín común de estudio. En el esquema se ve la localización de las 24 especies de *Quercus* incluídas en el jardín común: *Quercus agrifolia* Née (AGR), *Q. bicolor* Willd (BIC), *Q. cerris* L (CERR); *Q. coccifera* L (COC), *Q. coccinea* Münchh (COCCINEA), *Q. frainetto* Ten.(FRAI), *Q. ilex* L.(ILEX), *Q. faginea* Lam.(FAG), *Q. macrocarpa* Michx (MAC), *Q. nigra* L.(NIG), *Q. palustris* Münchh.(PAL), *Q. petraea* (Matt.) Liebl (PET), *Q. phellos* L.(PHEL), *Q. phillyraeoides* A.Gray (PHIL), *Q. pubescens* Willd.(PUB), *Q. pyrenaica* Willd.(PYR), *Q. robur* L (ROB), *Q. rubra* L (RUB), *Q. serrata* Murray (SERR), *Q. shumardii* Buckley (SHUM), *Q.stellata* Wangenh (STELL), *Q. suber* L (SUB), *Q. texana* (ningún ejemplar presente en el momento del estudio), *Q. velutina* Lam (VELUT).

Herbívoros y defensas en robles

En la zona de estudio la mayor parte del daño causado por herbivoría en las hojas es realizado por insectos defoliadores como *Tortrix viridana* L. (Lepidoptera: Tortricidae), *Lymantria dispar* L. (Hemiptera: Lymantridae), y *Malacosoma neustria* L. (Lepidoptera: Lasiocampidae) (Moreira et al. 2019). En respuesta al daño por estos herbívoros, los robles poseen una serie de defensas indirectas y directas. Dentro de las defensas directas de robles están los compuestos fenólicos (e.g. taninos condensados, taninos hidrolizables, flavonoides y ligninas), que son tóxicos y repelentes para los herbívoros (Moreira et al. 2018). Por otro lado, dentro de las defensas indirectas destaca la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), cuya finalidad es atraer a los enemigos naturales de los herbívoros (e.g. pájaros, hormigas) (Ghirardo et al. 2012). Estos VOCs son principalmente terpenoides (monoterpenos y sesquiterpenos), pero también fenoles aromáticos, alcoholes y aldehídos. Las defensas directas e indirectas en robles se expresan constitutivamente (siempre presentes a niveles basales) o son inducibles en respuesta al daño por herbívoros (Galmán et al. 2019).

Medición de la herbivoría en las hojas

A finales de la temporada de crecimiento (septiembre de 2019), medimos la altura total de todos los individuos de robles exóticos (n =96). La altura media de estos individuos fue de 96.8 ± 7.27

cm. A continuación, en cada una de las plantas de estas especies de robles exóticos cuantificamos el daño por herbivoría a través de la siguiente escala visual: 0 (ausencia de daño); 1=1-5%; 2=6-10%; 3=11-25%; 4=26-50%; 5=52-71%; 6= >75% (Moreira et al. 2020). Medimos la herbivoría al final de la temporada de crecimiento con el objetivo de minimizar las diferencias fenológicas entre las especies y evaluar la herbivoría acumulada al final de la temporada.

Muestreo de compuestos orgánicos volátiles

En Octubre de 2019 seleccionamos aleatoriamente tres individuos juveniles de cada especie de roble exótica (n = 60) para la recolección de compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) emitidos por las hojas de los robles. Estos muestreos de VOCs se realizaron en la franja horaria comprendida entre las 10:00 h y las 20:00 h (12-20 individuos por día). El muestreo se realizó siguiendo un protocolo preestablecido para la colecta de VOCs (Rasmann et al. 2011) En cada uno de los individuos a muestrear, se seleccionó aleatoriamente una rama en la que se colocó una bolsa de nalophan de 1L de volumen, la cual quedó fijada y sellada con un alambre en la base de la misma. Sobre esa bolsa se realizó un pequeño corte con unas tijeras y se insertó un filtro de adsorción de carbono activo (ANASORB CSC; SKC, Eighty-Four, PA, USA). Una vez ajustados los filtros a la bolsa, éstos se conectaron a unas bombas de muestreo de aire (Sidekick Deluxe MTX SKC) (Figura 2). Al pasar el aire a través del filtro, los VOCs emitidos por la planta quedan retenidos en el carbono activo del interior del filtro. Las bombas estuvieron succionando el aire en el interior de las bolsas durante una hora y media en cada árbol. Tras completar el tiempo de muestreo, los filtros fueron retirados y puestos en hielo seco a -80°C para su posterior análisis mediante la cromatografía de gases.



Figura 2. Bomba de extracción de compuestos orgánicos volátiles en uno de los robles de estudio.

Identificación y cuantificación de los compuestos orgánicos volátiles

Para la identificación y cuantificación de los VOCs en diciembre de 2019 realicé una estancia de una semana en el laboratorio del Dr. Sergio Rasmann en la Universidad de Neuchâtel (Suiza). En primer lugar, procedimos a la extracción de los VOCs de los filtros. Para ello extraemos los volátiles retenidos en el carbono activo haciendo pasar 400 μL de diclorometano a través del filtro y recogimos cada muestra en un vial de cromatógrafo. A cada muestra le añadimos 5 μL de naphthalene (a una concentración de 20 ng ml^{-1}) como estándar interno (IS) para la posterior identificación de los compuestos (Rasmann et al. 2011). Una vez extraídos los VOCs inyectamos 2 μL de cada muestra en un cromatógrafo de gases Agilent 7890 (GC; Agilent, Santa Clara, CA, USA) acoplado a un detector selectivo de masas 5977 (MSD) con una columna HP-5MS de dimensiones 30 m \times 250 μm \times 0.25 μm con capilar de sílice (Agilent, Santa Clara, California, USA). El GC se programó en modo “splitless” y se utilizó helio como gas portador (a un caudal de 0.9 mL min^{-1}). Las condiciones de análisis fueron las siguientes: la temperatura del horno del GC se mantuvo inicialmente a 40°C durante 1 min y a continuación se inició una rampa de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta alcanzar los 240 $^{\circ}\text{C}$.

Una vez finalizados los análisis cromatográficos obtuvimos un cromatograma por cada muestra (ejemplo en Figura 3) de los que obtuvimos las áreas de cada uno de los compuestos (picos en el cromatograma) de la muestra y procedimos a la cuantificación e identificación de los VOCs. Para la identificación de cada uno de los picos de los cromatogramas (es decir los VOCs) comparamos el espectro de masas de iones de los compuestos en la muestra con los de estándares de referencia disponibles en la base de datos NIST 1A v17. Los compuestos identificados pertenecieron a dos grupos: monoterpenos (MT) y sesquiterpenos (ST) (ver tabla 1). Para la cuantificación de cada uno de los VOCs utilizamos el estándar interno (naphthaleno). En particular, usamos la siguiente fórmula para cuantificar la emisión (en ng h^{-1}) de cada uno de los VOCs identificados:

$$Abundancia = \frac{\frac{\text{Área del compuesto}}{\text{Área IS en la muestra}} \times [\text{IS}] \times \text{Vol IS}}{\text{Tiempo de muestreo}}$$

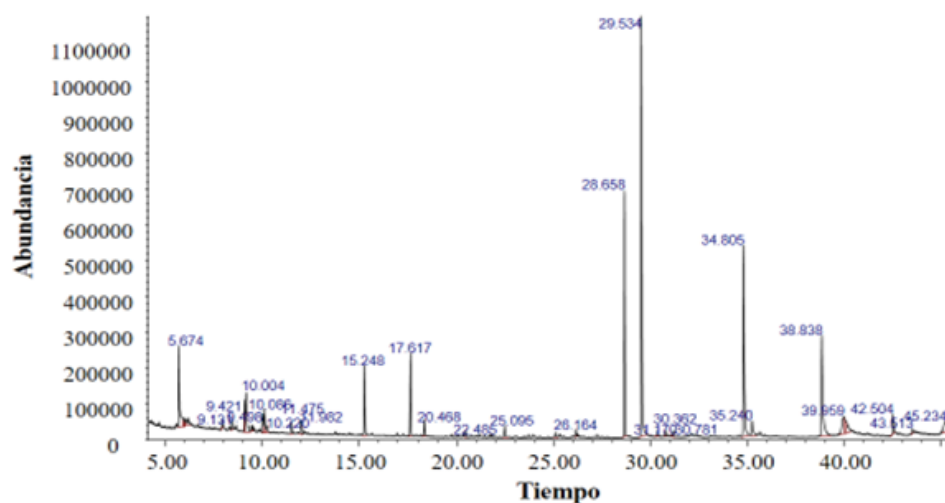


Figura 3. Ejemplo de cromatograma obtenido para un individuo de *Q. agrifolia*. Cada pico representa un compuesto orgánico volátil que aparece en un tiempo de retención (eje X) y a una determinada abundancia (eje Y). Así, las sustancias con mayor tiempo de retención en la columna, serán las últimas que observamos en el cromatograma. En cuanto a la abundancia, esta nos indicará la concentración a las que se encontraron dichos compuestos en la muestra.

Tabla 1. Identificación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de las 20 especies de robles exóticos incluidos en el estudio. MT = monoterpeno, ST = sesquiterpeno.

RT	Compuesto	Grupo	RT	Compuesto	Grupo
5.7	Cl	Otro	22.5	Sesquithujene	ST
6.19	Si	Otro	23.07	α -Farnesene	ST
7.27	3-hexen-1-ol	Otro	23.15	α -Copaene	ST
7.5	Xylene-p	Otro	23.5	β -Bourbonene	ST
7.9	Cyclopentanona-2- 1metilpropil	Otro	23.7	Tetradecane	Otro
8.4	Cyclopentene	Otro	24.3	β -Caryophyllene	ST

9.08	Cyclopentanone,2-(1-methylpropil)	Otro	24.6	β -Cubebene	ST
9.14	Tricyclene	MT	24.8	α -Bergamotene	ST
9.39	α -Thujuene	MT	24.9	β -Funebrene	Otro
9.59	α -Pinene	MT	25.09	Geranylacetone	MT
10	Trimetil hexene	Otro	25.21	Humulene	ST
10.09	Camphene	MT	25.4	Alloaromadendrene	ST
10.2	1-pyrrolidinyloxy,3-amino-2,2,5,5-tetramethyl	Otro	25.5	β -Copaene	ST
10.54	β -Phellandrene	MT	25.7	β -Sesquisabinene	ST
10.9	Sabinene	MT	25.9	Germacrene-D	ST
11.01	β -Pinene	MT	26.04	β -Farnesene	ST
11.47	Nonane	Otro	26.16	α -Selinene	ST
11.57	β -Myrcene	MT	26.26	Bicyclogermacrene	ST
11.9	Octanal	Otro	26.5	α -Muurolene	ST
12.15	β -Carene	MT	26.6	β -Bisabolene	ST
12.76	Limonene-D	MT	26.8	δ -Cadinene	ST
13.45	D-3-carene	MT	26.9	β -Curcumene	ST
13.76	α -Terpinene	MT	27.15	Cedrene	ST
15.1	β -Linalol	MT	27.27	α -Cadinene	ST
15.25	Nonanal	Otro	28.24	Caryophyllene-oxide	ST
17.6	Naphtalene	Internal Standar	28.65	kodaflflex txib	Otro

18.3	Decanal	Otro	29.54	Ethylene-glicol-adipate	Otro
22.1	δ -Elemene	ST	29.9	Muurolool-T	ST
22.4	Toluene-diisocyanate	Otro	30.3	β -Eudesmol-b	ST

Medición de la predación de herbívoros por parte de los enemigos naturales

Para estimar la predación de los insectos herbívoros por parte de los enemigos naturales (e.g. pájaros, hormigas) en octubre de 2019 seleccionamos aleatoriamente entre 3-4 individuos de cada especie de roble exótica (n = 72). En primer lugar procedimos a la fabricación de orugas artificiales de plastilina de color verde simulando el cuerpo de una larva (3 cm de longitud). A continuación fijamos una oruga artificial a una de las ramas de cada roble (una oruga por árbol) con un alambre de 12 cm de longitud. Tras dos semanas, retiramos con extremo cuidado las orugas artificiales y las guardamos para su posterior análisis. Todo este proceso se repitió una vez más volviendo a colocar otras orugas artificiales en las mismas plantas. Finalmente, estimamos la predación a través de las marcas que quedaron en las orugas de plastilina (atacada vs no atacada) siguiendo una guía preestablecida (Figura 4). En las orugas que presentaban marcas, se catalogó el daño entre los siguientes depredadores: insectos, aves, mamíferos y reptiles (Figura 5).

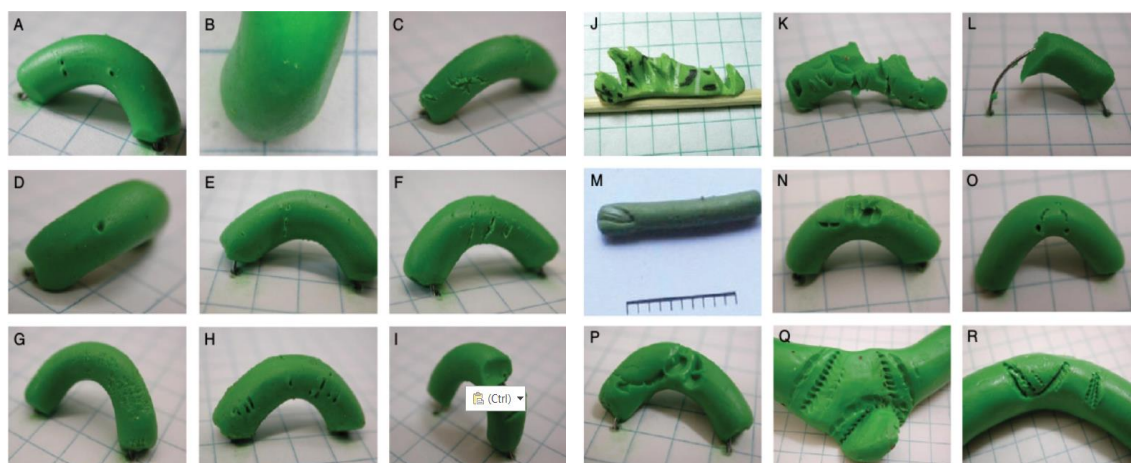


Figura 4. Guía para la estimación de daño por predación en orugas artificiales. Las imágenes A-H muestran ejemplos de daño típico producido por insectos, las imágenes I-M el producido por aves, las imágenes N-P el producido por mamíferos y Q-R el producido por reptiles. Guía obtenida del proyecto de ciencia ciudadana “Oak bodyguards” (<https://sites.google.com/view/oakbodyguards/home/spanish>)



Figura 5. Ejemplos de orugas atacadas. La oruga de la izquierda presenta marcas de predación de pájaro (dejando una marca de su pico en “V” muy pronunciada). En la oruga de la derecha podemos ver marcas de predación por insectos.

Análisis estadísticos

Efecto de la distancia filogenética sobre herbivoría, defensas indirectas y predación por parte del tercer nivel trófico en robles exóticos

Para testar si la distancia filogenética entre especies de robles nativos y exóticos predice el daño causado por los herbívoros en los robles exóticos realizamos regresiones lineales simples a nivel de especie (es decir, usando las medias por especie) entre la distancia filogenética mínima y el daño por herbivoría. La distancia filogenética mínima entre cada especie exótica y una especie nativa se estimó como la mínima longitud total de rama entre dichas especies (Pearse and Hipp 2014). Asimismo, realizamos regresiones por separado para los grupos individuales de VOCs (MT y ST) y para los grupos individuales de predadores (agrupados en invertebrados o vertebrados) con la distancia filogenética mínima, para ver si la distancia filogenética entre especies nativas y exóticas se correlaciona con rasgos de la planta que pueden estar determinando el efecto encontrado sobre herbivoría. Estos análisis se realizaron con la función `lm` en el paquete estadístico `lme4` en el Software R 3.4.1 (R Core Team 2019).

Factores asociados con el efecto de la distancia filogenética sobre herbivoría en robles exóticos

A continuación, dado el efecto significativo de la distancia filogenética encontrado sobre herbivoría (ver Resultados), investigamos si los efectos de la distancia filogenética sobre los patrones de herbivoría en robles exóticos están determinados por factores como las defensas indirectas (VOCs) o la predación de herbívoros por parte del tercer nivel trófico. Para ello realizamos una regresión múltiple a nivel de especie incluyendo la distancia filogenética, los grupos de VOCs (MT y ST) y el ataque de depredadores (insectos y vertebrados) como predictores de la herbivoría en robles exóticos. Si las defensas indirectas (MT y ST) o el ataque por predadores explican el efecto de la distancia filogenética sobre herbivoría, el efecto significativo de la distancia filogenética desaparecerá al incluir estos factores en la regresión múltiple. Los análisis se realizaron con la función `lm` en el paquete estadístico `lme4` en el Software R 3.4.1 (R Core Team 2019).

RESULTADOS

Efectos de la distancia filogenética sobre herbivoría, defensas indirectas y predación por parte del tercer nivel trófico en robles exóticos

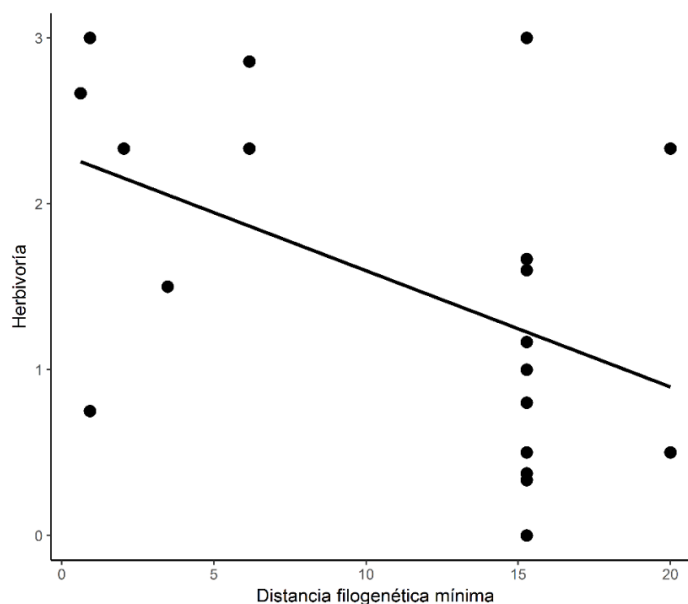
Los resultados de la regresión lineal simple indicaron una asociación negativa significativa entre la distancia filogenética entre los robles exóticos y nativos y la herbivoría en robles exóticos (Tabla 2), es decir, que los robles exóticos que están filogenéticamente más distantes a las especies de robles nativos sufrieron un menor daño por herbivoría (Figura 6).

Al contrario, distancia filogenética entre los robles exóticos y nativos no afectó significativamente ni a la emisión de monoterpenos y sesquiterpenos volátiles (Tabla 2, Figura 7) ni a la predación de herbívoros por parte de vertebrados e insectos (Tabla 2, Figura 8).

Tabla 2. Resultados de las pruebas de regresiones lineales simples para determinar el efecto de la distancia filogenética entre especies de robles exóticos y nativas en la herbivoría, emisión de VOCs (totales, monoterpenos y sesquiterpenos) y la predación por insectos y vertebrados (N=20 especies de roble exóticos). Los valores de P significativos ($P < 0.05$) se resaltan en negrita.

Respuesta	Min_PD		
	Df	F.value	P. value
Herbivoría	1, 17	4,77	0,043
Depredación insectos	1, 17	0,21	0,656
Depredación vertebrados	1, 17	0,04	0,839
Monoterpenos	1, 17	1,65	0,216
Sesquiterpenos	1, 17	1,39	0,254
VOCs totales	1, 17	0,42	0,528

Figura 6. Asociación entre la distancia filogenética mínima entre robles exóticos y nativos y la herbivoría foliar en robles exóticos (N=20 especies). La línea representa la relación predicha del modelo de regresión lineal significativo ($P < 0,05$) (ver Tabla 2). La unidad del eje X es la distancia filogenética mínima por pares entre cada especie exótica y una nativa (separación x2).



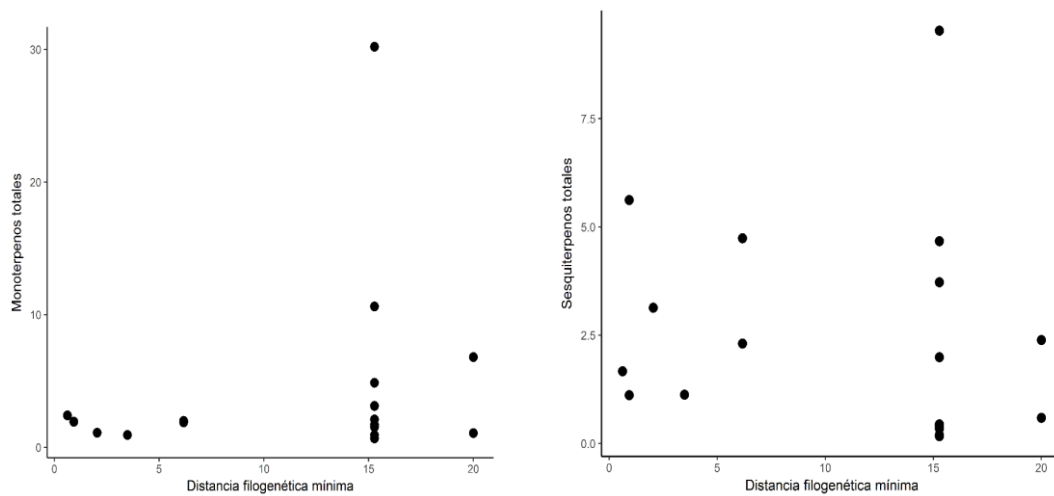


Figura 7. Asociación entre la distancia filogenética mínima entre robles exóticos y nativos y la emisión de monoterpenos y sesquiterpenos en robles exóticos (N=20 especies). La unidad del eje X es la distancia filogenética mínima por pares entre cada especie exótica y una nativa (separación x2).

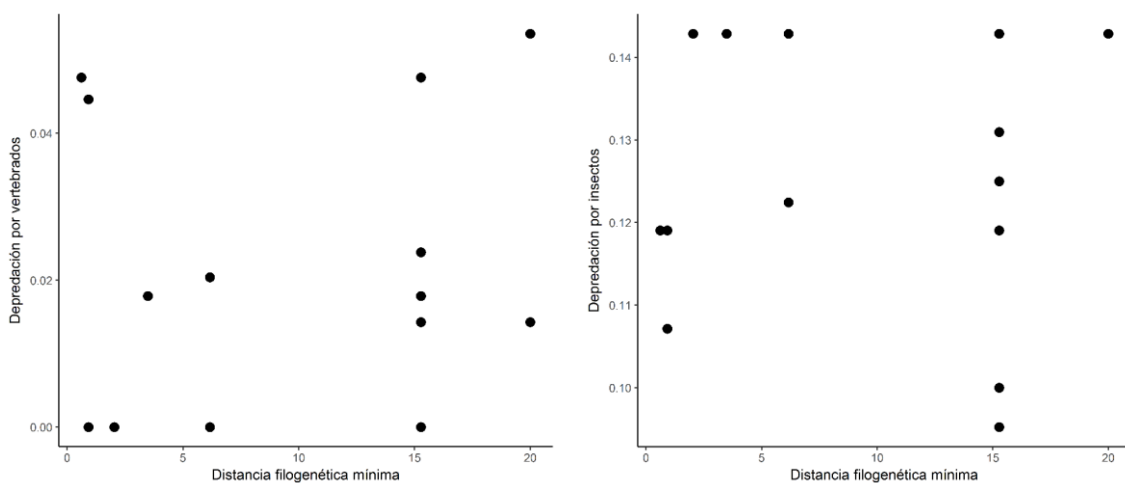


Figura 8. Asociación entre la distancia filogenética mínima entre robles exóticos y nativos y la predación de herbívoros por vertebrados e insectos en robles exóticos (N=20 especies). La unidad del eje X es la distancia filogenética mínima por pares entre cada especie exótica y una nativa (separación x2).

Factores asociados con el efecto de la distancia filogenética sobre herbivoría en robles exóticos

Los resultados de la regresión múltiple indicaron que el efecto de la distancia filogenética entre robles exóticos y nativos sobre la herbivoría en robles exóticos se mantuvo marginalmente significativo (Tabla 2) al incluir los grupos de VOCs estimados (MT y ST) y la predación por insectos o vertebrados en el modelo estadístico (Tabla 3), sugiriendo que ninguno de estos factores están determinando el efecto encontrado.

Tabla 3. Resultados de la regresión múltiple mostrando el efecto de distancia filogenética mínima (Min PD), depredación por insectos, depredación por vertebrados, monoterpenos totales y sesquiterpenos totales sobre herbivoría en las 20 especies de roble incluidas en el estudio. Los valores de P significativos ($P < 0.05$) se resaltan en negrita.

	Herbivoría		
	Df	F.value	P. value
Min PD	1, 13	4,25	0,055
Depredación insectos	1, 13	0,28	0,606
Depredación vertebrados	1, 13	0,20	0,662
Monoterpenos	1, 13	0,96	0,344
Sesquiterpenos	1, 13	0,01	0,983

DISCUSIÓN

Nuestros resultados demostraron que distancia filogenética a las especies de robles nativos determinó la herbivoría foliar por insectos en las especies de robles exóticos. En particular, las especies exóticas más alejadas filogenéticamente de las especies nativas sufrieron un menor daño foliar. Estos resultados concuerdan con los encontrados en la misma parcela de estudio un año antes (2018) (Moreira et al. 2019) y en un arboreto en Norteamérica (Pearse and Hipp 2009, Pearse and Hipp 2014). Estos resultados no solamente se han observado en especies de robles. Por ejemplo, Ness et al. (2011) encontraron que la herbivoría foliar en especies herbáceas exóticas en dos tipos de comunidades en Norteamérica era menor al reducir la distancia filogenética a las especies nativas.

Nuestros resultados también demostraron que la distancia filogenética a las especies nativas no determina ni las defensas indirectas (emisión de VOCs) ni la predación sobre los herbívoros artificiales por parte del tercer nivel trófico (insectos, pájaros) en las especies de robles exóticos. Además, también encontramos que ni la emisión de VOCs ni la predación por parte del tercer trófico determinan los efectos de la distancia filogenética sobre la herbivoría ya que dicho efecto se mantiene significativo una vez incluimos esas variables en el modelo estadístico. Estos resultados contradicen la literatura previa para las defensas directas. Por ejemplo, en nuestra misma parcela de estudio Moreira et al. (2019) observaron que la concentración de compuestos fenólicos (taninos condensados e hidrolizables) y fósforo en las hojas de especies de robles exóticos disminuía al incrementar la distancia filogenética con respecto a las especies nativas. Además, en este mismo estudio se comprobó que tanto la concentración de fósforo (un nutriente muy limitante para los herbívoros; Zas et al. 2006) como la concentración de taninos condensados (unos compuestos fenólicos muy tóxicos para los herbívoros; Mithöfer and Boland 2012) en las hojas determinaban los efectos de la distancia filogenética a las especies nativas en la herbivoría foliar en especies exóticas ya que dicho efecto significativo de la distancia filogenética desaparecía cuando se incluía el fósforo en los modelos estadísticos (Moreira et al. 2019). De forma similar, en un arboreto en Norteamérica (Pearse and Hipp 2009) observaron que las especies de robles exóticos más alejadas filogenéticamente de las especies nativas presentaban valores más elevados de compuestos fenólicos en sus hojas, lo que a su vez determinaba el efecto de la distancia filogenética sobre la herbivoría. Todos estos resultados demuestran que las defensas directas contra los herbívoros podrían jugar un papel más relevante que las defensas indirectas en las invasiones de nuevos hábitats por parte de los robles exóticos (e.g. *Q. rubra* en Europa).

Trabajos futuros en otras especies de plantas ampliamente distribuidas (e.g. *Pinus*, *Populus*) deberían estudiar si la distancia filogenética a las especies nativas determina los patrones de herbivoría y defensas (directas e indirectas) en especies exóticas, con el fin de generalizar nuestros resultados en *Quercus* y poner freno a las potenciales invasiones biológicas en el futuro próximo dentro de un marco de cambio en la biodiversidad global.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, A. A. 2007. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology & Evolution* **22**:103-109.
- Agrawal, A. A. 2011. Current trends in the evolutionary ecology of plant defense. *Functional Ecology* **25**:420-432.
- Alpert, P., E. Bone, and C. Holzappel. 2000. Invasiveness, invasibility and the role of environmental stress in the spread of non-native plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **3**:52-66.
- Elton, C. S. 1958. *The ecology of invasions by animals and plants*. University of Chicago Press, Chicago.
- Funk, J. L., E. E. Cleland, K. N. Suding, and E. S. Zavaleta. 2008. Restoration through reassembly: plant traits and invasion resistance. *Trends in Ecology and Evolution* **23**:695-703.
- Funk, J. L., and H. L. Throop. 2010. Enemy release and plant invasion: patterns of defensive traits and leaf damage in Hawaii. *Oecologia* **162**:815-823.
- Galmán, A., W. K. Petry, L. Abdala-Roberts, A. Butrón, M. de la Fuente, M. Francisco, A. Kergunteuil, S. Rasmann, and X. Moreira. 2019. Inducibility of chemical defences in young oak trees is stronger in species with high elevational ranges. *Tree Physiology* **39**:606-614.
- Ghirardo, A., W. Heller, M. Fladung, J. P. Schnitzler, and H. Schroeder. 2012. Function of defensive volatiles in pedunculate oak (*Quercus robur*) is tricked by the moth *Tortrix viridana*. *Plant, Cell and Environment* **35**:2192-2207.
- Heil, M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* **178**:41-61.
- Hill, S. B., and P. M. Kotanen. 2010. Phylogenetically structured damage to *Asteraceae*: susceptibility of native and exotic species to foliar herbivores. *Biological Invasions* **12**:3333-3342.

- Keane, R. M., and M. J. Crawley. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution* **17**:164-170.
- Kessler, A., and M. Heil. 2011. The multiple faces of indirect defences and their agents of natural selection. *Functional Ecology* **25**:348-357.
- Maron, J. L., and M. Vilà. 2001. When do herbivores affect plant invasion? Evidence for the natural enemies and biotic resistance hypotheses. *Oikos* **95**:361-373.
- Mithöfer, A., and W. Boland. 2012. Plant defence against herbivores: Chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology* **63**:431-450.
- Moreira, X., L. Abdala-Roberts, A. Galmán, A. W. Bartlow, J. C. Berny-Mier y Terán, E. Carrari, F. Covelo, M. de la Fuente, S. Ferrenberg, N. M. Fyllas, Y. Hoshika, S. R. Lee, R. J. Marquis, M. Nakamura, C. S. Nell, M. B. Pesendorfer, M. A. Steele, C. Vázquez-González, S. Zhang, and S. Rasmann. 2020. Ontogenetic consistency in oak defence syndromes. *Journal of Ecology* **en prensa**.
- Moreira, X., B. Castagneyrol, L. Abdala-Roberts, J. C. Berny-Mier y Terán, B. G. H. Timmermans, H. H. Bruun, F. Covelo, G. Glauser, S. Rasmann, and A. J. M. Tack. 2018. Latitudinal variation in plant chemical defences drives latitudinal patterns of leaf herbivory. *Ecography* **41**:1124-1134.
- Moreira, X., C. Vázquez-González, M. Encinas-Valero, F. Covelo, B. Castagneyrol, and L. Abdala-Roberts. 2019. Greater phylogenetic distance from native oaks predicts escape from insect leaf herbivores by non-native oak saplings. *American Journal of Botany* **106**:1202-1209.
- Morrison, W. E., and M. E. Hay. 2011. Herbivore preference for native vs. exotic plants: generalist herbivores from multiple continents prefer exotic plants that are evolutionarily naïve. *PLoS ONE* **6**:e17227.
- Ness, J. H., E. J. Rollinson, and K. D. Whitney. 2011. Phylogenetic distance can predict susceptibility to attack by natural enemies. *Oikos* **120**:1327-1334.
- Núñez-Farfán, J., J. Fornoni, and P. L. Valverde. 2007. The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **38**:541-566.

- Parker, J. D., and M. E. Hay. 2005. Biotic resistance to plant invasions? Native herbivores prefer non-native plants. *Ecology Letters* **8**:959-967.
- Pearse, I. S., and A. L. Hipp. 2009. Phylogenetic and trait similarity to a native species predict herbivory on non-native oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:18097–18102.
- Pearse, I. S., and A. L. Hipp. 2014. Native plant diversity increases herbivory to non-natives. *Proceedings of the Royal Society B* **281**:20141841.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rasman, S., A. C. Erwin, R. Halitschke, and A. A. Agrawal. 2011. Direct and indirect root defences of milkweed (*Asclepias syriaca*): trophic cascades, trade-offs and novel methods for studying subterranean herbivory. *Journal of Ecology* **99**:16-25.
- Richardson, D. M., and M. Rejmánek. 2011. Trees and shrubs as invasive alien species – a global review. *Diversity and Distributions* **17**:788-809.
- Rogers, W. E., and E. Siemann. 2004. The role of herbivores in exotic plant invasions: insights using a combination of methods to enhance or reduce herbivory Pages 329-355 *in* W. W. Weisser and E. Siemann, editors. *Insects and ecosystem function*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Turlings, T. C. J., and M. Erb. 2018. Tritrophic interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: mechanisms, ecological relevance, and application potential. *Annual Review of Entomology* **63**:433-452
- Zas, R., X. Moreira, and L. Sampedro. 2011. Tolerance and induced resistance in a native and an exotic pine species: relevant traits for invasion ecology. *Journal of Ecology* **99**:1316–1326.
- Zas, R., L. Sampedro, E. Prada, M. J. Lombardero, and J. Fernández-López. 2006. Fertilization increases *Hylobius abietis* L. damage in *Pinus pinaster* Ait. seedlings *Forest Ecology and Management* **222**:137-144.