



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas

Programa de Doctorado: Biogeociencias

“Fenoles en *Castanea sativa* Mill.: desde el monte a la industria”

“Phenols in *Castanea sativa* Mill.: from forest to industry”

TESIS DOCTORAL

José Francisco Fuente Maqueda

Oviedo 2018

Fuente-Maqueda, F. (2018). Fenoles en *Castanea sativa* Mill.: desde el monte a la industria. Tesis Doctoral. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo (España).

**RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL**

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Fenoles en <i>Castanea sativa</i> Mill.: desde el monte a la industria	Inglés: Phenols in <i>Castanea sativa</i> Mill.: from forest to industry
2.- Autor	
Nombre: JOSÉ FRANCISCO FUENTE MAQUEDA	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: BIOGEOCIENCIAS	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

RESUMEN (en español)

Los fenoles constituyen una parte importante del llamado metabolismo secundario de las plantas. Sus funciones son muy variadas, formando parte de compuestos estructurales como la lignina, hormonales como el ácido salicílico y, sobre todo, en la interacción del vegetal con su entorno, actuando como fitoalexinas, sustancias alelopáticas o disuasorios nutritivos. Sin embargo, el interés analítico en estas especies químicas se promovió por el papel que desempeñan en alimentación, farmacología y en numerosos procesos industriales como el curtido del cuero, envejecimiento del vino y otras bebidas o en la durabilidad de la madera.

Castanea sativa Miller es una especie con notable importancia económica y ambiental en el Principado de Asturias, la presencia de estos compuestos le confiere un valor añadido en los productos derivados, como la madera, la castaña o los subproductos destinados a la obtención de biomoléculas de interés, además de representar una potencial herramienta para la permanencia de la especie en un entorno de cambio climático.

A pesar del gran interés potencial del castaño y de los fenoles, se dispone de poca información en ambos campos y menos aun considerándolos conjuntamente. Por esto, con el ánimo de fomentar la especie y el uso de los productos derivados de ella, los objetivos planteados en esta tesis son: optimizar la metodología del análisis fenólico para distintos tejidos y órganos del castaño, valorar la importancia del perfil fenólico en la interacción ecosistema x árbol y determinar la influencia de la gestión forestal en el contenido fenólico como acción preventiva en las defensas de *C. sativa*.

El procedimiento analítico optimizado permitió obtener el perfil fenólico de todos los tejidos y órganos de interés de la especie.

Para la determinación de las interacciones entorno/planta se valoraron dos zonas contrastantes desde el punto de vista productivo, distinta Calidad de Estación (CE), dentro de la Comunidad Autónoma, que se comprobó modifican el perfil fenólico de los órganos y tejidos de esta especie de forma diferencial. Los órganos con mayor interacción con el entorno, como pueden ser las hojas o las cortezas, muestran un incremento general de estos metabolitos en la zona más desfavorable para la especie, concejo de Caso, y por el contrario los órganos menos expuestos, como puede ser la madera, muestran mayor acúmulo en la zona más favorable, concejo de Allande. En base a estos resultados se constata que el principal producto derivado de esta especie, la madera, se verá favorecida por una buena CE, no sólo en la cantidad producida sino también en la calidad, al aportarle estos compuestos una mayor durabilidad en su uso en construcción y un mayor potencial para tonelería. Por el contrario, la mayor concentración de metabolitos secundarios en los órganos externos de los árboles de Caso, que coinciden con los caducos o con los que se desprenden del árbol por diferentes causas, modificaran el entorno potenciando aspectos desfavorables como la menor disponibilidad de nutrientes, al actuar negativamente sobre la microbiota.

Las actuaciones que se realizan en el monte, como podas y claras, tienen un efecto beneficioso sobre la incidencia de la principal enfermedad del castaño en Asturias, el chancro



producido por *Cryphonectria parasitica*. Sin embargo, este efecto parece deberse a una menor presencia del hongo debido a la mejora de las condiciones ambientales, como mayor insolación y aireación, ya que no parece existir relación directa con la modificación observada en el perfil fenólico. Si bien, el papel de los fenoles en las defensas del árbol se puede presumir a partir de la mayor concentración detectada en el mes de julio, periodo en el que, según la bibliografía, la reacción frente a la enfermedad es mayor, y de su efecto inhibitor en el crecimiento *in vitro* de *C. parasitica* y hongos de pudrición de la madera.

RESUMEN (en Inglés)

Phenols form an important part of the so-called secondary metabolism of plants, having a variety of functions: they are involved in structural compounds such as lignins, in hormonal compounds such as salicylic acid, and, especially, in the interaction between a plant and its environment, where they act as phytoalexins, allelopathic substances and feeding deterrents. However, analytical interest in these chemical species is driven by the role they play in foodstuffs, pharmacology and in numerous industrial processes such as leather tanning, the ageing of wine and other drinks and in the durability of wood.

Castanea sativa Miller is a species of significant economic and environmental importance in the Principality of Asturias, the phenols confer added value to the products derived from it, such as wood and chestnuts, as well as sub-products used to obtain biomolecules of interest, in addition to providing a potential tool for the endurance of the species under a climate change scenario.

Despite the great potential interest in and value of the chestnut, and of phenols, little information is available in relation to either, and still less which considers the two together. Therefore, and with the aim of promoting the species and the use of products derived from it, the objectives of this thesis are: to optimise the methodology for phenolic analysis of the various tissues and organs of the sweet chestnut; to evaluate the importance of the phenolic profile of sweet chestnut in terms of the interaction between tree and environment; and determine the influence of forest management on phenolic content as a preventative measure to protect *C. sativa*.

The optimised analytic procedure enabled the phenolic profile of all the tissues and organs of interest of the species to be established.

To determine environment/plant interactions, two geographic zones within the Autonomous Community were evaluated which contrasted in terms of productivity, different site quality (SQ), and the results demonstrated that the phenolic profiles of the organs and tissues were differentially modified depending on location. The organs with the greatest interaction with the environment, such as leaves and bark, showed a general increase in phenols in the area where conditions were least favourable for this species, the municipality of Caso, and in contrast, the organs less exposed to the environment, such as wood, showed the greatest accumulation of phenols in the more favourable municipality of Allande. Based on these results, the principal product derived from this species, wood, will benefit from a good SQ, not only with respect to the quantity produced, but also in terms of quality, since these compounds confer increased durability in the use of this material in construction, as well as increasing its potential for cooperage. In contrast, the higher concentration of secondary metabolites in the external organs of the trees in Caso, in effect those which fall to the ground (naturally or otherwise), cause modifications in the environment which drive unfavourable conditions, such as reducing nutrient availability, through their negative impact on the microbiota.

Forestry interventions such as pruning and thinning have a beneficial effect on the incidence of the principal disease affecting the sweet chestnut in Asturias, the canker caused by *Cryphonectria parasitica*. However, this effect would appear to be due to the lower presence of mould because of the improvement in environmental conditions, such as increased light and ventilation in as much as there appears to be no relationship with the modification observed in the phenolic profile. The role of phenols in the defence mechanisms of the tree can, however, be assumed from the greater concentrations detected in July, the period when, according to the literature, the tree has the greatest reaction to the disease, as well as the *in vitro* inhibitory effect of phenols on *C. parasitica* and wood rotting fungi.

Esta tesis ha sido realizada en:

- **Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA).**

Departamento de Investigación. Área de Cultivos Hortofrutícolas y Forestales. Programa Forestal (PIF).

Finca Experimental de la Mata, Grado, Principado de Asturias (España).



- **Centro Tecnológico y Forestal de la Madera (CETEMAS).**
Pumarabule, Carbayín, Siero, Principado de Asturias (España).



- **Universidad de Oviedo.**
Facultad de Biología, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Área de Fisiología Vegetal.
Oviedo, Principado de Asturias (España).



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Financiación de la investigación:

- **Proyecto “Perfiles fenólicos en *Castanea sativa* Mill. y su interés desde el monte a la industria” (RTA2011-00135-00-00), subvencionado a través del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) del Ministerio de Ciencia e Innovación de España.**



- **Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)**



Por y para LÓF

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todo el personal del SERIDA, CETEMAS y Universidad de Oviedo que me ha ayudado en la elaboración de esta tesis.

Y agradezco de forma especial el apoyo de mi familia.

Que fáciles y cómodos serían unos agradecimientos así de simples, pero también serían muy poco justos con aquellas personas que dedicaron parte de su tiempo a que esta tesis fuese posible. Seguro que hay variados protocolos para establecer prioridades a la hora de nombrar a las personas más destacadas, por peso e importancia en la tesis, por orden de aparición en el transcurso de esta, por orden alfabético, por cercanía,... Se haga como se haga, lo más probable es que siempre quede alguien sin nombrar, y que debería estar, así que, para este supuesto, que me perdonen aquellas personas que no nombre en estos agradecimientos y que consideren que si debiera hacerlo.

En pleno Mundial de Fútbol Rusia 2018 y en la recta final de esta tesis, me resulta difícil poder disfrutar del fútbol como me gustaría. Así que, en un intento de combinar ambos ámbitos, ejerceré de entrenador y seleccionaré al 11 que considero titular para el partido de esta tesis:

1. (Portero) Antonio Fernández: Veterano experto en este tipo de partidos, numerosas son las tesis que le avalan, no para obtener el título de Doctor, sino para ayudar a otros a conseguirlo. Por todas las muestras que me ayudaste a procesar y todos los ensayos en los que estuvimos hombro con hombro, gracias Antonio.
2. (Lateral derecho) Laura González: Compañera polivalente, en campo o en laboratorio. Da igual que tengamos que recoger lixiviados, que inocular hongos, ahí estas con tu mejor actitud dispuesta a sacar el trabajo adelante. Gracias Laura.
3. (Lateral izquierdo) Juan Carlos Hernández: “Sherpa” asturiano todoterreno de campo, da igual las condiciones meteorológicas que haya, 40 °C o 40 cm de nieve, si hay que coger muestras se cogen. Por hacerme estar cerca del corazón de Asturias, esa Asturias de intensa naturaleza, ese indómito El Engertal, gracias Juan Carlos.
4. (Central) Lucía Rodríguez: Tu cuerpo no es de central, pero tu carácter y actitud hacen desear tenerte en el mismo equipo cuando hay que “remangarse” para sacar algo adelante. Siempre dispuesta a echar una mano, bien de forma directa o simplemente facilitando las cosas para que uno las haga. 11 años llevamos compartiendo despacho y laboratorio. A veces, las relaciones laborales y personales se desgastan con el tiempo, sin embargo,

mi impresión es que nuestro día a día cada vez nos hace más compañeros. Gracias Lucía.

5. (Mediocentro) Isabel Feito: Calidad, experiencia y cercanía. Superior inmediato, 11 años a “tus órdenes” y que siga siendo así. Además de mi responsable laboral, codirectora de tesis, siempre has estado preocupada por que las cosas fueran por el camino que mejor creías. El que esta tesis sea como es, es en gran parte debido a ti. Como “abogada del diablo” siempre me has hecho ver y pensar las cosas desde variados puntos de vista. Por toda tu ayuda, muchas gracias Isabel.
6. (Mediapunta) Belén Fernández: Sólo hemos tenido un Trabajo Fin de Máster para coincidir, el origen de esta tesis. Tiempo más que de sobra para darme cuenta de lo importante que es la experiencia bien gestionada. Tu jubilación impidió que formases parte activa de esta tesis, aun así, en estuviste presente en su origen. Gracias Belén.
7. (Extremo izquierdo) Andrea Hevia: Frescura, agilidad, movimiento,... Tienes otro ritmo. Tu capacidad de adaptación al más alto nivel hace de ti una persona con la que uno estaría encantado de colaborar en cualquier investigación. Que cosas tiene la vida, el año pasado por motivos laborales nos distanciamos físicamente, sin embargo, lejos de hacerlo también laboralmente, seguimos manteniendo el contacto y continuaste ayudándome muy gratamente para poder finiquitar los resultados dendroquímicos que aparecen en esta tesis. Por esto y tu ánimo, gracias Andrea.
8. (Extremo derecho) Manuel Alonso-Graña: Siempre está bien saber posicionarse, y ahí tu ayuda fue indispensable. Tanto en la ubicación de las parcelas valoradas en esta tesis, como en la información sobre la gestión forestal realizada, y en la elaboración de mapas de situación, tu ayuda siempre fue muy provechosa. Además de esto, tu forma de ser hace que tratar contigo sea muy agradable. Gracias Manuel.
9. (Mediapunta) Ana Rodríguez: Distinción. Una visión experta más externa. Codirectora de mi tesis, todavía me pregunto ¿cómo fuiste capaz de aceptar unirme a esta aventura? Mi sensación contigo es de deuda. A pesar de no vernos mucho, siempre que he necesitado cualquier cosa de ti, siempre me has ayudado y animado. Tus correcciones y comentarios creo que aportaron a esta tesis un mejor entendimiento de esta. Muchas gracias Ana.
10. (Mediocentro) Juan Majada: Un auténtico 10. Si alguien sabe “tirar del carro” y “echarse el equipo a la espalda” ese eres tú. Creador y organizador de trabajo. El Programa de Investigación SERIDA-CETEMAS sigue dando buenos resultados, en gran parte, por tu visión investigadora. Tus conocimientos y “gran mano izquierda” hace posible seguir investigando el entorno forestal asturiano. Aunque el tiempo no te sobra, siempre lo has tenido para escucharme y hablar conmigo. Muchas gracias Juan.
11. (Delantero) Ângelo Kidelman Dantas: Dicen que Vicente Del Bosque (exseleccionador nacional de fútbol) se inspiró en él para crear la posición del “falso 9”. Brasileño asturiano del occidente. Experto reproductor, vegetal

y asexual. Tu carácter alegre, divertido y sociable ha hecho que durante los años que compartimos despacho esta tesis fuese más amena y agradable. Espero que algún día podamos volver a trabajar juntos. Por tu forma de ver la vida, gracias Ángelo.

El “jugador número 12”, es algo más que un suplente dispuesto a salir a jugar para aportar lo que haga falta en un momento concreto, generalmente, es el empuje que la afición da al equipo con su ánimo. Para mí, este jugador de lujo sería todo el personal del SERIDA, CETEMAS y Universidad de Oviedo que en algún momento me mostraron su apoyo y ayuda. Destacar de forma especial a Elena Canga, por su disposición en todo momento a ayudarme en lo que ella pudiera (consejo forestal, discusión de ciertas ecuaciones, cuestiones de formato o, algo tan simple como importante, escuchar, aconsejar y animar).

Tampoco hay que olvidar la cantera. Gracias a aquellos alumnos de prácticas y Trabajos Fin de Grado o Máster que, por diversos motivos, se han acercado a esta tesis. Como punta de lanza de este colectivo, “Santiago Michavila Puente-Villegas, el mejor resinero que conozco en este país”. Posiblemente no seas la mejor persona extrayendo resina *in situ*, pero seguro que algún día los pinos y sus resinas te estarán muy agradecidos por tus investigaciones.

Para mí, tan importante como el entorno laboral es el familiar. Si soy quien soy y estoy donde estoy, es gracias a la educación que mis padres me han dado. Juani y Pepe, siempre os estaré agradecidos por cómo me criasteis, educasteis y preparasteis para la vida. Ahora que soy padre, soy más consciente de los sacrificios que hicisteis por mí. De esta tesis también os corresponde una parte. Muchas gracias.

Dicen que lo mejor se suele dejar para el final. Estoy de acuerdo. Lucía Sánchez, mi esposa y madre de mi hijo, sé que estos últimos meses han sido difíciles por mi intención de finalizar esta tesis en este curso 2017-2018, mi poca vida familiar ha hecho que tú te multipliques y saques las cosas adelante con menos ayuda. Por tu esfuerzo, paciencia, ayuda y ánimo en todo momento, muchísimas gracias. Sin tu comprensión, posiblemente, el final hubiera sido otro.

Por último, mi hijo, Óliver Fuente, 4 años y medio. Lo eres todo para mí, desde que naciste eres el eje sobre el que giramos tu madre y yo. Tus preguntas de estos meses (¿Cuánto te falta para venir? ¿Hoy también tienes que ir a trabajar? Y si nos vas a trabajar, ¿qué pasa?) me han hecho exprimirme al máximo para no prolongar más esta tesis y poder pasar todo el tiempo que pueda contigo, jugando y divirtiéndonos los LÓF.

¡MUCHAS GRACIAS!

Fran.

ABREVIATURAS, SIGNOS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ACN	Acetonitrilo
AE	Ácido elágico
AEMET	Agencia Estatal de Meteorología
AG	Ácido gálico
AIC	Akaike's information criterion (criterio de información de Akaike)
AIEF	Área de Inventario y Estadísticas Forestales
All	Allande
ANOVA	Analysis of variance (análisis de la varianza)
AWCD	Average well colour development (promedio del desarrollo de color por pocillo)
(+)C	(+)-Catequina hidratada
CCAA	Comunidades Autónomas
CE	Calidad de estación
CEE	Comunidad Económica Europea
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
CRAD	Capacidad de retención de agua disponible
Cs	Caso
DAD	Diode array detector (detector de matriz de diodos)
DGCEAMN	Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental y Medio Natural
DMS	Diferencia mínima significativa
DO	Densidad óptica
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de (+)-catequina hidratada
Ed	Editor // Editorial
EE	Error estándar de la media

EFC	Extracto fenólico de corteza de <i>Castanea sativa</i> Miller
EFM	Extracto fenólico de madera de <i>Castanea sativa</i> Miller
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (y otros)
Ets	Elagitaninos
EUA	Estados Unidos de América
FBPM	Fenoles de bajo peso molecular
FT	Fenoles totales
GM	Galato de metilo
g_{pf}	Gramos de peso fresco
g_{ps}	Gramos de peso seco
GPS	Global positioning system (sistema de posicionamiento global)
Gts	Galotaninos
H	Índice de Shannon
HPLC	High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alto rendimiento)
IBM	International Business Machines
I A-D	Índice/s de abundancia-dominancia
IFT₂₈₀	Índice de fenoles totales a 280 nm
ips	Impactos por segundo
IS	Índice de sitio
ISO	International Organization for Standardization (Organización Internacional para la Estandarización)
J	Índice de Pielou
líq	Líquido
m	Masa (magnitud física)
MO	Materia orgánica
MeOH	Metanol
meq	Miliequivalente

n	Tamaño de la muestra
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida
NSU	Number of substrates used (número de sustratos utilizados)
p	Probabilidad de error al rechazar la hipótesis nula con los valores obtenidos
PM	Peso molecular
ps	Peso seco
PVDF	Polyvinylidene difluoride (polidifluoruro de vinilideno)
qCO₂	Cociente metabólico
R²	Coefficiente de determinación
ρ_{ap}	Densidad aparente
RB	Respiración basal
RIS	Respiración inducida por sustrato
rpm	Revoluciones por minuto
RS	Residuo sólido
SAR	Sodium adsorption ratio (relación de adsorción de sodio)
Sat	Saturación
sp	Especie/s
SPSS	Statistical package for the social sciences (paquete estadístico para ciencias sociales)
t₀	Inicio del ensayo
t₁₂	12 meses después del inicio del ensayo
T^a_{amb}	Temperatura ambiente
T^a_{con}	Temperatura de conservación
T^a_{mol}	Temperatura de molienda
TC	Taninos condensados
TH	Taninos hidrolizables
UmA	Unidades de miliabsorbancia

UNE-EN	Una Norma Española - European Norm
UTM	Universal transverse Mercator (transversal de Mercator universal)
v	Volumen (magnitud física)
veg	Vegetal/es
&	y (alternativa gráfica de la conjunción copulativa latina <i>et</i>)

ÍNDICE

Capítulo 1: Introducción a los fenoles en <i>Castanea Sativa</i> Miller.....	3
1.1 Fenoles.....	3
1.1.1 Definición y estructura química.....	3
1.1.2 Fenoles en los vegetales.....	5
1.1.3 Aplicaciones de los fenoles.....	6
1.1.4 Determinación de los fenoles.....	7
1.2 Castaño (<i>Castanea sativa</i> Miller).....	9
1.2.1 <i>Castanea sativa</i> en Asturias.....	10
1.3 Fenoles en castaño.....	12
1.4 Ecosistema.....	13
1.5 Fenoles en las interacciones Ecosistema x Castaño.....	18
1.6 Gestión en monte bajo de castaño en Asturias.....	20
1.7 Planteamiento y objetivos de esta tesis.....	21
1.8 Bibliografía.....	22
Capítulo 2: Descripción metodológica de la caracterización fenólica en castaño....	33
2.1 Introducción.....	33
2.2 Material y métodos.....	36
2.2.1 Productos químicos.....	36
2.2.2 Material vegetal.....	36
2.2.3 Extracción de compuestos fenólicos.....	37
2.2.4 Fenoles totales.....	38
2.2.5 Taninos condensados.....	39
2.2.6 Taninos hidrolizables.....	40
2.2.7 Análisis estadístico.....	41

2.3 Resultados y discusión.....	42
2.3.1 Optimización metodológica.....	42
2.3.1.1 Determinación de fenoles totales y taninos condensados e hidrolizables.....	44
2.3.1.2 Efecto de la temperatura de conservación en muestras foliares.....	47
2.3.1.3 Efecto de la temperatura de molienda en muestras foliares.....	49
2.3.1.4 Modificación del procedimiento de extracción y secado de las fracciones orgánicas respecto al protocolo de referencia.....	50
2.3.1.5 Comparación del protocolo de referencia frente a otro de carácter exclusivamente enológico para muestras de duramen.....	52
2.3.2 Validación del método.....	53
2.4 Bibliografía.....	57

Capítulo 3: Influencia del ecosistema en el desarrollo de *Castanea sativa* Miller....67

3.1 Introducción.....	67
3.2 Material y métodos.....	71
3.2.1 Zonas de estudio: características y productividad.....	71
3.2.2 Clima.....	73
3.2.3 Inventario florístico.....	74
3.2.4 Suelo.....	75
3.2.5 Análisis químico elemental foliar.....	76
3.2.6 Análisis químico elemental del tronco.....	76
3.2.7 Composición fenólica de la corteza, albura y duramen del tronco.....	76
3.2.7.1 Material vegetal.....	77
3.2.7.2 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos.....	77
3.2.8 Valoración del índice de chancro en campo (IChC).....	78
3.2.9 Crecimiento <i>in vivo</i> de <i>Cryphonectria parasitica</i> en ramas <i>ex situ</i>	79
3.2.10 Durabilidad de la madera de castaño en función de su contenido fenólico.....	80
3.2.10.1 Tratamientos extractivos.....	80

3.2.10.1.1 Prueba de deslavado (UNE-EN 84:1997)	80
3.2.10.1.2 Vaporización.....	81
3.2.10.2 Fenoles totales.....	81
3.2.10.3 Ensayo de durabilidad.....	82
3.2.11 Análisis estadístico.....	82
3.3 Resultados y discusión.....	84
3.3.1 Zonas de estudio: características y productividad.....	84
3.3.2 Clima.....	86
3.3.3 Inventario florístico.....	91
3.3.4 Suelo.....	95
3.3.5 Estatus nutricional foliar.....	99
3.3.6 Análisis químico elemental del tronco.....	102
3.3.7 Composición fenólica de la corteza, albura y duramen del tronco.....	107
3.3.8 Crecimiento <i>in vivo</i> de <i>Cryphonectria parasitica</i> en ramas <i>ex situ</i>	110
3.3.9 Durabilidad de la madera de castaño en función de su contenido fenólico.....	112
3.4 Bibliografía.....	115

Capítulo 4: Influencia de *Castanea sativa* Miller en el ecosistema..... 131

4.1 Introducción.....	131
4.2 Material y métodos.....	134
4.2.1 Composición fenólica en amentos, erizos, hojas y ramas.....	134
4.2.1.1 Zonas de estudio.....	134
4.2.1.2 Material vegetal.....	134
4.2.1.3 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos.....	135
4.2.1.4 Estimación del potencial aporte fenólico que recibe el suelo.....	135
4.2.2 Degradación de la hojarasca.....	136
4.2.2.1 Pérdida de biomasa.....	136

4.2.2.2 Fenoles totales.....	137
4.2.2.3 Cenizas.....	137
4.2.2.4 Análisis elemental.....	138
4.2.3 Estudio de la meso y macrofauna y actividad microbiana del suelo.....	138
4.2.3.1 Estudio meso y macro faunístico.....	138
4.2.3.2 Análisis microbiológico.....	140
4.2.4 Análisis estadístico.....	141
4.3 Resultados y discusión.....	141
4.3.1 Composición fenólica en amentos, erizos, hojas y ramas.....	141
4.3.2 Degradación de la hojarasca.....	148
4.3.2.1 Pérdida de biomasa.....	148
4.3.2.2 Fenoles totales.....	149
4.3.2.3 Cenizas.....	150
4.3.2.4 Análisis elemental.....	150
4.3.3 Meso y macrofauna y actividad microbiana del suelo.....	153
4.3.3.1 Estudio meso y macro faunístico.....	153
4.3.3.2 Análisis microbiológico.....	158
4.4 Bibliografía.....	161

Capítulo 5: Influencia de la gestión forestal en las defensas de *Castanea sativa* Miller.....171

5.1 Introducción.....	171
5.2 Material y métodos.....	174
5.2.1 Ecosistema, composición fenólica y chancro.....	174
5.2.1.1 Zona de estudio.....	174
5.2.1.2 Valoración del Índice de Chancro en Campo (IChC)	175
5.2.1.3 Suelo.....	175

5.2.1.4 Estatus nutricional foliar.....	175
5.2.1.5 Degradación de la hojarasca.....	175
5.2.1.6 Composición fenólica en ramas.....	176
5.2.1.6.1 Material vegetal.....	176
5.2.1.6.2 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos.....	176
5.2.1.7 Crecimiento <i>in vivo</i> de <i>Cryphonectria parasitica</i> en ramas <i>ex situ</i>	177
5.2.2 Efecto de la aplicación exógena de extractos fenólicos en el crecimiento de <i>Cryphonectria parasitica</i>	177
5.2.2.1 Obtención y caracterización de los extractos fenólicos.....	177
5.2.2.2 Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Cryphonectria parasitica</i> en presencia de extractos fenólicos de corteza y madera de <i>Castanea sativa</i>	178
5.2.2.3 Aplicación de los extractos fenólicos a planta juvenil de <i>Castanea sativa</i>	178
5.2.2.4 Composición fenólica del tronco de <i>Castanea sativa</i> tras la aplicación de los extractos fenólicos.....	179
5.2.2.5 Crecimiento <i>in vivo</i> de <i>Cryphonectria parasitica</i> en planta juvenil de <i>Castanea sativa</i> tratada con extractos fenólicos.....	179
5.2.2.6 Crecimiento <i>in vivo</i> de <i>Cryphonectria parasitica</i> en ramas <i>ex situ</i>	179
5.2.2.7 Evolución de <i>Castanea sativa</i> juvenil tras la inoculación de <i>Cryphonectria parasitica</i>	179
5.2.3 Aplicación de extractos fenólicos de <i>Castanea sativa</i> como tratamiento antifúngico protector de la madera.....	180
5.3 Resultados y discusión.....	180
5.3.1 Ecosistema, composición fenólica y chancro.....	180
5.3.1.1 Zonas de estudio: características y productividad.....	180
5.3.1.2 Índice de Chancro en Campo.....	181
5.3.1.3 Suelo.....	181
5.3.1.4 Estatus nutricional foliar.....	184
5.3.1.5 Degradación de la hojarasca.....	185
5.3.1.5.1 Pérdida de biomasa.....	185

5.3.1.5.2 Fenoles totales.....	186
5.3.1.5.3 Cenizas.....	187
5.3.1.5.4 Análisis elemental.....	188
5.3.1.6 Composición fenólica en ramas.....	188
5.3.1.7 Crecimiento <i>in vivo</i> de <i>Cryphonectria parasitica</i> en ramas <i>ex situ</i>	194
5.3.2 Efecto de la aplicación exógena de extractos fenólicos en el crecimiento de <i>Cryphonectria parasitica</i>	195
5.3.2.1 Caracterización de los extractos fenólicos.....	195
5.3.2.2 Crecimiento <i>in vivo</i> de <i>Cryphonectria parasitica</i> en presencia de extractos fenólicos de corteza y madera de <i>Castanea sativa</i>	196
5.3.2.3 Composición fenólica del tronco de <i>Castanea sativa</i> tras la aplicación de los extractos fenólicos.....	197
5.3.2.4 Inoculación <i>in vivo</i> de <i>Cryphonectria parasitica</i> en tronco <i>in situ</i>	200
5.3.2.5 Crecimiento <i>in vivo</i> de <i>Cryphonectria parasitica</i> en ramas <i>ex situ</i>	201
5.3.2.6 Evolución de <i>Castanea sativa</i> juvenil tras la inoculación de <i>Cryphonectria parasitica</i>	202
5.3.3 Aplicación de extractos fenólicos de <i>Castanea sativa</i> como tratamiento antigúngico protector de la madera.....	204
5.4 Bibliografía.....	207
Conclusiones.....	215

Capítulo 1

CAPÍTULO 1

Introducción general

¿Por qué fenoles en *Castanea sativa* Miller?

- 1) Porque *C. sativa* es la especie más representativa de los bosques del Principado de Asturias (noroeste de España).
- 2) Porque el castaño es una de las especies forestales que mayor contenido fenólico presenta en sus órganos y tejidos.

1.1 FENOLES

1.1.1 Definición y estructura química

Fenoles, polifenoles o compuestos fenólicos. Denominados de cualquiera de estas tres formas es como se hace referencia a aquellos compuestos químicos que poseen al menos un grupo fenol (hidroxibenceno), es decir, un benceno con un grupo hidroxilo de sustituyente (**Figura 1.1**).

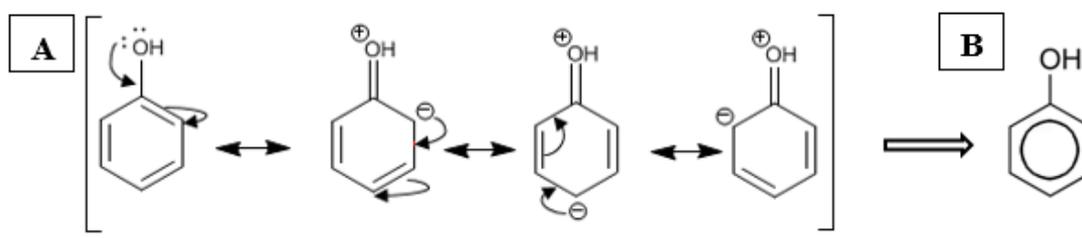


Figura 1.1. A: Formas resonantes del fenol. B: Forma gráfica de representar en una única estructura química las diferentes formas resonantes del fenol.

A partir del fenol (C_6H_5OH , 94.11 g mol^{-1}) los fenoles se forman por incorporación de sustituyentes al anillo aromático. Esto hace que la variedad de estos compuestos sea muy grande, abarcando desde los fenoles simples (fenoles de bajo peso molecular), formados por la unidad básica y pequeños sustituyentes (grupos hidroxilo, carboxilo, alcóxidos o hidrocarburos acíclicos), hasta polímeros complejos, creados por la unión de varias unidades de cicloalcanos policíclicos, como los taninos. Los taninos se clasifican en dos categorías, según su biosíntesis y sus propiedades químicas, los taninos condensados (TC) y los hidrolizables (TH) (Khanbabaee & van Ree, 2001). Los TC, también conocidos como proantocianidinas, ya que producen antocianidinas

cuando se despolimerizan en condiciones oxidativas, y se forman a partir de flavanoles (3 y 4-oles y 3,4-dioles) (Andersen, 2001; Shahidi & Naczk, 2003) (**Figura 1.2**).

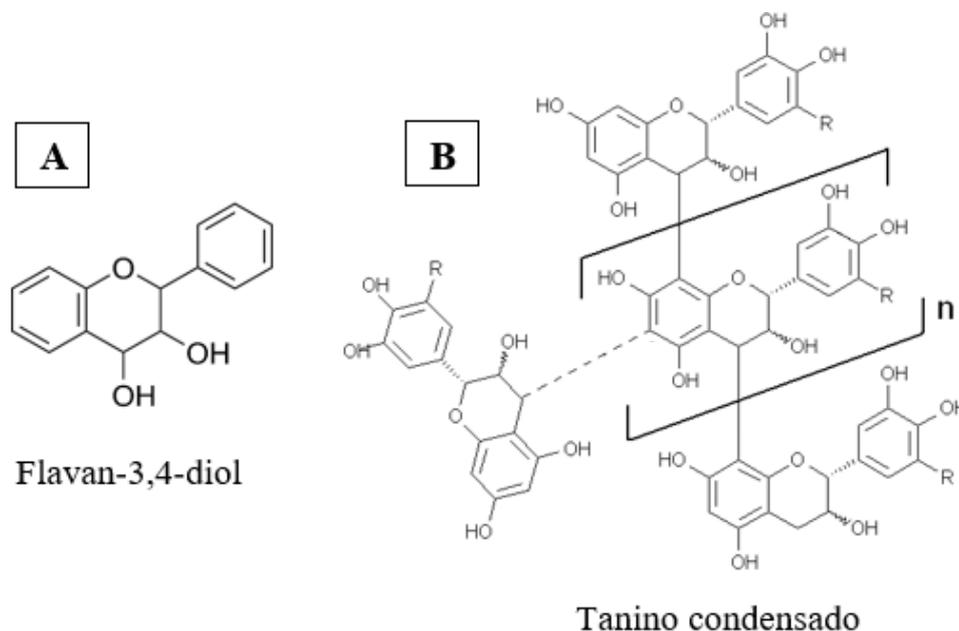


Figura 1.2. A: Flavan-3,4-diol (2-fenil-3,4-dihidro-2H-cromeno-3,4-diol). B: Estructura polimérica de tanino condensado (imagen creada por Nono64, dominio público desde Wikimedia Commons). n: grado de polimerización.

Los TH son derivados del ácido gálico (AG), que es esterificado para formar un núcleo poliol con un carbohidrato, donde los grupos galoil pueden nuevamente ser esterificados y unidos oxidativamente entre sí formando complejas estructuras (Hagerman, 2002). Los TH se degradan con calor y en presencia de ciertos ácidos, como HCl o H₂SO₄, a sus unidades básicas, AG y ácido elágico (AE, dímero estable del AG), lo que da lugar a clasificarlos como galotaninos (Gts) y elagitaninos (Ets), respectivamente (**Figura 1.3**). Los Gts son los TH más simples, estando formada su estructura básica por esteres poligaloil de glucosa, siendo su prototipo la β -1,2,3,4,6-pentagaloil-*O*-D-glucopiranososa (PGG, C₄₁H₃₂O₂₆, 940.68 g mol⁻¹). Los Ets se caracterizan por tener en su estructura AE, dímero del AG.

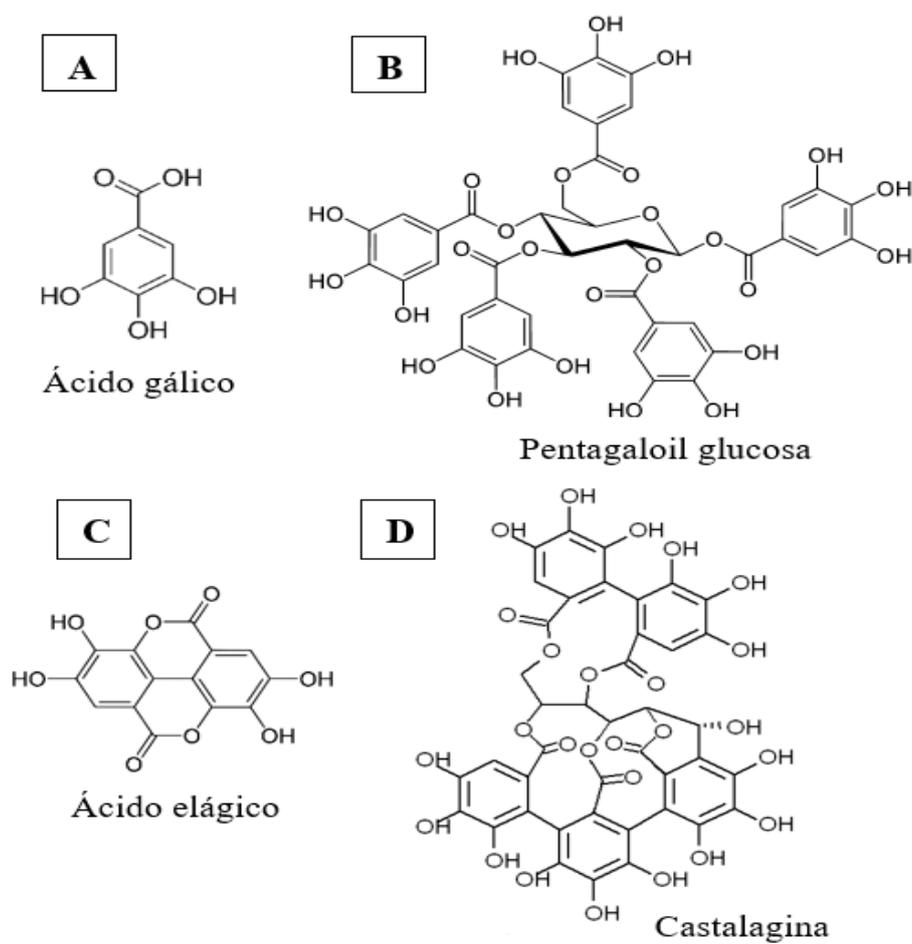


Figura 1.3. Estructuras químicas de los compuestos producto de la degradación de los galotaninos, ácido gálico (A), y elagitaninos, ácido elágico (C). B: Ester de poligaloil glucosa, galotanino. D: Castalagina, elagitanino (imagen creada por Nono64, GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>) desde Wikipedia Commons).

1.1.2 Fenoles en los vegetales

Los fenoles constituyen una parte importante del llamado metabolismo secundario de las plantas, denominación debida a que se creía que por esta vía sólo se formaban sustancias de desecho o carentes de función para las plantas. Estos metabolitos secundarios derivan biosintéticamente de ciertos compuestos primarios, estando ambas clases de metabolismos interconectadas resultando difícil establecer una clara diferenciación entre ellas, siendo habitual que su biosíntesis se produzca en fases específicas del desarrollo y en períodos de estrés, lo que implica que la expresión del metabolismo secundario se basa en un proceso de diferenciación (Piñol *et al.*, 2008). Desde el punto de vista de la Fisiología Vegetal, los compuestos fenólicos se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellos que se sintetizan durante el desarrollo normal de la planta y los que se sintetizan en respuesta al medio (Beckman, 2000). En la síntesis de fenoles también se da una regulación genética influenciada por factores ambientales (Fernandez-Orozco *et al.*, 2010).

Los compuestos fenólicos incluyen casi 10000 compuestos con propiedades muy diversas, pudiendo actuar como compuestos de defensa, repeliendo a algunos herbívoros, captadores de polinizadores y dispersores de semillas, protectores de la radiación ultravioleta (UV) perjudicial, estructurales en la planta y alelopáticos, reduciendo el crecimiento de plantas competidoras cercanas (Samanta *et al.*, 2011; Fürstenberg-Hägg *et al.*, 2013; Sánchez-Sánchez & Morquecho-Contreras, 2017).

Las numerosas investigaciones químicas, biológicas y farmacológicas llevadas a cabo sobre los fenoles están ampliando el conocimiento e importancia de estos compuestos en la vida humana. Estos descubrimientos plantean nuevas formas de clasificar y estudiar sus propiedades (Okuda & Ito, 2011). El aumento exponencial del número de publicaciones científicas a nivel internacional que incluían la palabra “phenolic” da una idea del interés por estos compuestos (**Figura 1.4**). Yang & Guido (2016) se centraron en los últimos años de este siglo en dar una visión general de las medidas realizadas para estos compuestos, destacando el progresivo incremento de las investigaciones realizadas para mejorar el análisis tanto cualitativo como cuantitativo de los últimos años.

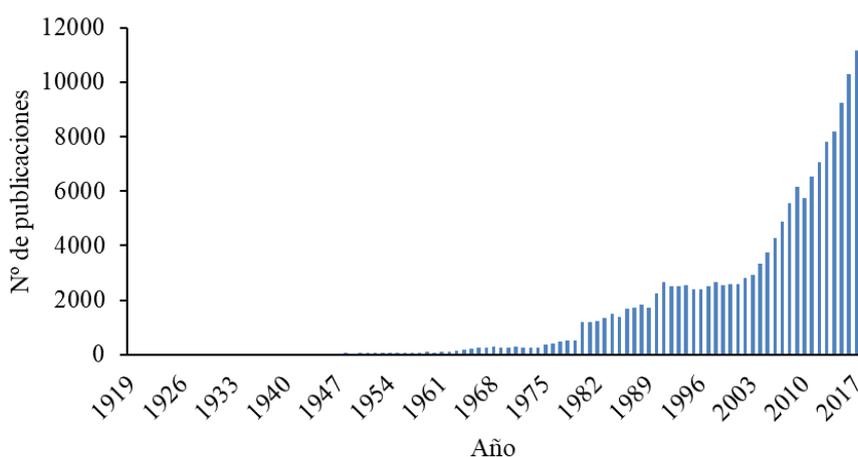


Figura 1.4. Número de publicaciones científicas divulgadas internacionalmente que incluyen en su título la palabra “phenolic”, desde 1919 (primera publicación) hasta 2017 (último año completo hasta el momento). Fuente: Web of Science (Reuters, 2012).

1.1.3 Aplicaciones de los fenoles

Es difícil encontrar un sector en el que los fenoles no tengan cabida, bien de forma natural o como aditivos. Esta gran aplicabilidad se debe a sus variadas propiedades: antioxidantes (Sochor *et al.*, 2010; Motilva *et al.*, 2013; Tuyen *et al.*, 2017), antimicrobianas, antifúngicas (Helm *et al.*, 1997), quelantes (Mila *et al.*, 1996) o protectoras de la radiación UV (Almeida *et al.*, 2015).

La alimentación, como actividad industrial o comercial de productos alimenticios, es donde más valor se da a los compuestos fenólicos, diferenciando dos grupos principales: 1) alimentos cuyo contenido fenólico es intrínseco al propio producto y 2) productos a los que se les incorpora o incrementa este tipo de compuestos. Arapitsas (2012) considera que estos productos representan uno de los mayores avances en la ciencia de los alimentos modernos, destacando, además de su papel en la calidad e inocuidad, su significativa contribución al sabor, color y estabilidad, siendo cada vez más reconocidos sus beneficios en la salud humana (Freitas & Naves, 2010).

En sectores como tonelería, enología o envejecimiento de bebidas (alcohólicas o no) el interés por el conocimiento fenólico es de suma importancia, ya que estos compuestos tienen la capacidad de alterar las propiedades organolépticas de los alimentos (Mosedale, 1995; Keulder, 2006; Sanz *et al.*, 2012; Canas, 2017). En tonelería, el uso de ciertas partes del tronco del árbol está condicionado por la distribución radial de los fenoles, tanto los fenoles totales (FT) como los Ets aumentan desde la médula hasta la diferenciación del duramen con la albura, disminuyendo fuertemente en la albura (Eichhorn *et al.*, 2017). El secado y tostado de la madera usada para tonelería son también dos procesos importantes, ya que alteran la composición fenólica y, por lo tanto, las propiedades organolépticas de los productos almacenados en estos recipientes de madera (Cadahía *et al.*, 2001; Vivas, 2005; Sanz *et al.*, 2010b). Chira & Teissedre (2013) elaboraron un perfil sensorial en el que relacionaron significativamente el contenido en Ets con la astringencia y amargor de vinos envejecidos con maderas tostadas con diferentes métodos. Respecto a su papel en la salud, los TC presentes en los vinos actúan como supresores de compuestos vasoconstrictores, como el péptido endotelina-1, mejorando así la vascularización de los vasos sanguíneos de nuestro organismo (Corder *et al.*, 2006). Este interés en alimentación y salud hizo que, a pesar de la limitación de estándares comercialmente disponibles, la investigación sobre los alimentos ofrezca en la actualidad una gran cantidad de trabajos sobre la optimización de la extracción, identificación y cuantificación de TH (Arapitsas, 2012), siendo estos el primer grupo de fenoles analizados químicamente.

En sectores como la construcción, la madera también es una materia prima en la que hay que tener en cuenta a estos compuestos, ya que de su composición y estado dependerá su destino final. Los taninos tienen un papel importante en la conservación de la madera de uso industrial y la defensa frente a enfermedades que atacan a este tejido (Helm *et al.*, 1997).

1.1.4 Determinación de los fenoles

A pesar de las numerosas investigaciones sobre estos compuestos, son escasos los trabajos que concretan cantidades en su ingesta, y menos frecuente es ver comparativas entre alimentos o tratamientos específicos. Esto es así, en parte, por la falta de consenso en la elección de métodos validados y estandarizados para el análisis fenólico, lo cual es necesario para poder desarrollar bases de datos del contenido fenólico de los alimentos y así establecer unos valores de ingesta (Motilva *et al.*, 2013).

Alcanzar este objetivo universal no es tarea fácil, ya que aun obviando el factor más determinante, la comunicación y acuerdos entre personas, la gran variedad de muestras, destinos de estas, recursos disponibles y compuestos a analizar, hace difícil establecer una metodología y perfil fenólico estándar. Al igual que Yang & Guido (2016) abordaron bibliográficamente unos aspectos comunes en los análisis fenólicos (muestreo, preservación, preparación y análisis de muestras), nosotros tratamos de valorarlos experimentalmente. El perfil fenólico que consideramos adecuado para poder caracterizar fenólicamente diferentes órganos y tejidos vegetales fue el análisis de FT, que indican el contenido total de este tipo de compuestos, TC y TH (Gts y Ets), agrupando en estas dos familias químicas de alta masa molecular, entre 500 y 30 000 Da (Serrano *et al.*, 2009), los compuestos tánicos objeto de estudio.

Los FT ofrecen la información mínima requerida para caracterizar una muestra vegetal en cuanto a la cantidad de compuestos fenólicos que presenta, la cual puede ser suficiente como criterio de selección en la búsqueda de plantas con cierta cantidad de este tipo de compuestos. Los taninos, tanto los TC como los TH, destacan, a nivel fisiológico de la planta, por su función defensiva frente a microorganismos y herbívoros (Scalbert, 1991; Hagerman *et al.*, 1998). Algunos de estos compuestos están presentes en órganos vegetales muy activos, como pueden ser las hojas, donde actúan como disuasorios frente a herbívoros, bien por presentar una baja palatabilidad o por reacciones más complejas con otros compuestos, como algunas proteínas, de forma que inactivan ciertas enzimas digestivas, causando un efecto negativo sobre la digestibilidad y aprovechamiento de nutrientes (Min *et al.*, 1998). Otros taninos, presentes en mayor medida en órganos estructurales, como el duramen de la madera actúan como agentes protectores frente a microorganismos patógenos, como pueden ser algunos hongos, bacterias e insectos, evitando el ataque de estos y los importantes, incluso letales, daños que le producirían al árbol (Laks *et al.*, 1988).

La enorme complejidad del metabolismo fenólico hace difícil unificar metodologías útiles para distintos fines y efectivas para diferentes materiales. Las dificultades abarcan desde la recogida y procesado de las muestras, hasta la cuantificación final. Optimizar la eficiencia de extracción manteniendo la integridad de los compuestos no siempre es fácil y mucho menos tratándose de matrices complejas como las que se trabajan en el mundo forestal. Cuando las especies son leñosas, las diferencias entre los distintos tipos de tejidos hacen que las muestras difieran tanto en cantidad como en tipo de compuestos mayoritarios (Cadahía *et al.*, 1996; Vasconcelos *et al.*, 2010).

Los pasos previos a la cuantificación fenólica son, a veces, muy tediosos y laboriosos, como en los casos en que se requieren distintos tipos de hidrólisis (ácidas y/o alcalinas e incluso enzimáticas) (Robards, 2003). No obstante, en función del uso final que tenga la información que queremos generar, puede ser conveniente realizar un tipo u otro de valoración y no siempre está justificada la extracción completa de los compuestos, siendo en este sentido la uniformización metodológica de difícil abordaje.

1.2 CASTAÑO (*Castanea sativa* Miller)

El castaño pertenece al orden *Fagales*, familia *Fagaceae*, género *Castanea* y, según recoge Pereira-Lorenzo & Ramos-Cabrer (2004), incluye 12 especies (*Castanea sativa* Miller, *C. crenata* Siebold & Zucc., *C. mollissima* Blume, *C. seguinii* Dode, *C. davidii* Dode, *C. henryi* Rehder & Wilson, *C. dentata* Borkhausen, *C. pumila* Miller, *C. ashei* Sudworth, *C. floridana* Ashe, *C. alnifolia* Nuttall y *C. paucispina* Ashe), siendo la primera mencionada la que denominamos castaño europeo.

“El castaño, especie noble por excelencia, proporciona fruto, madera, sombra y enriquece y mejora extraordinariamente las condiciones del suelo en el que vive. Se encuentra en el mundo representado por varias especies; las más notables son, entre otras: *Castanea dentata*, *C. pumila* y *C. chrysophilla* en Norteamérica, *C. mollissima* y *C. crenata* en Asia, y *C. sativa* en Europa” (Jara, 1978). Esta simple presentación del castaño sirve para mostrar su multifuncionalidad y amplia extensión por todo el mundo.

Especie de porte alto, con árboles que superan los 35 m, muy ramificados y de copa amplia y esférica. El sistema radical es poco profundo, pero extenso y robusto. Son muy longevos, con crecimiento rápido durante los primeros años de desarrollo, que luego se ralentiza. La fructificación puede iniciarse a los 12 años cuando crece de forma aislada y en bosque se retrasa a los 20-25 años (Viéitez *et al.*, 1999). Las flores masculinas se agrupan en amentos erectos, mientras que las femeninas lo hacen en número de 1 a 3 formando cúpulas. La floración se produce entre mayo-junio. La polinización tiene lugar fundamentalmente por el viento y por los insectos, por eso se favorece por temperaturas cálidas y se dificulta por exceso de humedad. Los frutos, conocidos como castañas, aparecen en número de uno a tres, cubiertos antes de la madurez por una capa espinosa denominada erizo, que se abre en cuatro valvas, cuando se produce la maduración. Son del tamaño de una nuez, en forma de corazón, tienen una cáscara lisa y coriácea, de color marrón oscuro brillante. (Álvarez, 2013).

El rango altitudinal del castaño se sitúa desde el nivel del mar hasta los 1 500 metros, si bien, las mayores superficies se encuentran entre los 400 y 900 metros (Pereira-Lorenzo *et al.*, 2001a y b). Distinguiendo su uso, se considera que los mejores árboles frutales se encuentran entre los 200 y los 600 m, mientras que para los árboles de uso maderero ese óptimo se sitúa entre los 500 y 1 000 m (García, 2011).

En España se consideró como una especie introducida por los romanos, pero estudios recientes confirmaron su existencia anterior a la romanización, ya que se encontraron restos de las hogueras de cuevas prehistóricas y restos de polen que así lo confirmaron (Roces-Díaz *et al.*, 2018).

La extensión del castaño en España es de unas 440 000 ha, según el 4^a Inventario Forestal Nacional (AIEF, 2012), centradas en Asturias, Lugo, Orense, León y Salamanca, aunque está presente en casi todas las Comunidades Autónomas (CCAA), incluyendo las insulares Canarias. Por comunidades, de las mencionadas solo Asturias se centra en la producción de madera, siendo las castañas dirigidas al autoconsumo y contrariamente, el resto de CCAA, son las responsables de la producción española de

fruto. La producción de castaña en España rondó 40 000 t en 2015, ocupando el tercer puesto a nivel de Europa, después de Italia y Portugal. En conjunto, la producción de este fruto en Europa fue de 187 000 t, que frente a 1 650 000 t que produce China, es una cantidad bastante limitada, pero avalada por las mejores características organolépticas de la castaña europea frente a la china (*C. mollissima*).

1.2.1 *Castanea sativa* en Asturias

El Perfil Ambiental de España 2016 (DGCEAMN, 2017) recoge que Asturias presenta un 72.6 % de bosques y áreas forestales de toda la superficie del suelo, frente al 54.7 % de España. Según el 4º Inventario Forestal Nacional para el Principado de Asturias (AIEF, 2012), dentro de este potencial forestal, 770 549.93 ha, el 57.4 % corresponde a monte de arbolado denso, con un 85.8 % de este arbolado formado por especies frondosas, de las cuales *C. sativa* está presente en 80 560.05 ha, lo que supone el 7.6 % de la superficie de Asturias y el 49.5 % de los castañares de España. Además de esta importante masa forestal de castaño, en Asturias esta especie tiene el valor añadido de su fuerte integración social, tanto paisajística como cultural, haciendo que *C. sativa* sea una especie de suma importancia para esta región. Por si esto no fuera suficiente, otro aspecto tanto o más importante, es el hecho de que el área cantábrica, y en particular Asturias, fue uno de los principales refugios climáticos del castaño hace más de 20 000 años (Roces-Díaz *et al.*, 2018).

La toponimia asturiana es rica en cuanto a la terminología empleada para el monte de castaño: castañal, castañar, castañeu, castañeru o castañeda. El arraigo de esta especie, muy apreciada en el medio rural por ser fuente de alimento y madera desde la antigüedad, hace que numerosas plazas, calles y barrios de Asturias hagan referencia en sus nombres a esta especie (García, 2005). Constituye junto con el roble la esencia del bosque mixto asturiano desde el nivel del mar hasta la montaña, donde deja paso al bosque de hayas.

La producción de fruto se asocia a cultivares seleccionados localmente que se injertaban tradicionalmente sobre patrones de semilla. Actualmente también es frecuente el uso de patrones clonales con diferentes resistencias a enfermedades o más tolerantes al estrés abiótico. En las nuevas plantaciones, o para el reinjerto de plantas adultas, se hace necesario seleccionar adecuadamente los cultivares para lograr producciones de calidad. Esta selección requiere de una prospección adecuada así como de una valoración morfológica, genética y agronómica. Dado el desconocimiento de los cultivares locales de castaño en las diferentes regiones españolas, incluyendo Asturias, durante las dos últimas décadas se ha hecho un esfuerzo considerable en estas evaluaciones, así como en la conservación de su germoplasma. La prospección o búsqueda de cultivares injertados y su posterior identificación, se inició en Asturias gracias a la financiación recibida del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y del Ministerio de Ciencia y Tecnología a través de los proyectos de investigación 1FD1997-0955-C03-02 y AGL2003-09874-C0-02, respectivamente, del Principado de Asturias, a través del Instituto de Desarrollo Rural (IDR) y del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), así como de la Escuela

Politécnica Superior de Lugo, perteneciente a la Universidad de Santiago de Compostela. Los estudios de caracterización morfológica y genética se recogen en Pereira-Lorenzo *et al.* (2005), y han permitido clasificar 42 cultivares asturianos en dos grandes grupos, principales y secundarios, atendiendo además, al interés comercial y a la dispersión del cultivar (Díaz Hernández *et al.*, 2009). En base a estos trabajos se logró la inclusión en el Registro de Variedades Comerciales de 11 cultivares tradicionales: ‘Bacoa’, ‘Chamberga’, ‘Doriga’, ‘Grúa’, ‘Llanisca’, ‘Miguelina’, ‘Navexa’, , ‘Pelona’, ‘Rapuca’, ‘Valduna’, y ‘Vaquera’ (Ciordia *et al.*, 2016; Orden APM/207/2017). El material se encuentra recogido en una colección activa de germoplasma, ubicada en el SERIDA de Villaviciosa y Grado.

Como ya se comentó en el apartado anterior, actualmente en Asturias, los castaños se aprovechan más por su madera, a pesar de que el sector de la madera, bastante deprimido durante los últimos tiempos, pero muy importante en esta comunidad durante años, parece estar resurgiendo con una tendencia creciente a la utilización de esta madera para distintas aplicaciones, si bien su uso estructural y de madera de apariencia siguen siendo los sectores más relevantes (Gayo, 2016). La resistencia intrínseca de esta madera a los ataques de los organismos destructores cuando aún no le ha sido aplicado ningún tratamiento de protección (Bobadilla *et al.*, 2005), es una de las razones fundamentales que hizo que su uso se fomentase para construcciones tan típicas en nuestra comunidad autónoma como son los hórreos, paneras y cabazos. La alta durabilidad en el exterior, que hace que pueda permanecer incluso bajo tierra en zonas húmedas (Bobadilla *et al.*, 2005) determinó su utilización en cierres ganaderos e incluso ligada a la minería y a la cestería. El duramen es capaz de resistir pudriciones y el ataque de insectos debido a su riqueza en taninos, pero no así la albura (Vignote & Martínez, 2006), que tradicionalmente se eliminaba mecánicamente o quemándola, lo que incrementaba aún más su durabilidad.

En ocasiones, la madera de castaño presenta anomalías como las acebolladuras, relacionadas generalmente con la mala o nula gestión; las pudriciones, provocadas por la presencia de patógenos e incrementadas por el abandono de los montes y la presencia de taninos, que si bien suele ser positiva por actuar de forma preventiva frente a plagas y enfermedades, en ocasiones la hidrólisis y transformación oxidativa de los Ets, especialmente vescalagina y castalagina provoca un amarronamiento de la madera. También el cambio de color puede ser por amarilleamiento, relacionándose en este caso más con la actividad enzimática del hongo *Paecilomyces variotii* (Bauch *et al.* 1991), aunque en esta especie y para algunos autores como Koch (2008) es una acción combinada. Además del hongo mencionado, la madera de castaño es atacada por otros hongos xilófagos, siendo los basidiomycetes los más frecuentes. Estos hongos pueden atacar a la lignina, como en el caso de *Trametes versicolor* (L.) Lloyd y *Stereum sanguinolentum* (Alb. & Schwein.) Fr., dejando la celulosa y dando lugar a restos fibrosos de color blanco o amarillento, denominada podredumbre blanca. Si el hongo ataca la celulosa se genera una pudrición roja o parda, como en el caso de *Phaeolus schweinitzii* (Fr.) Pat. y *Phellinus pini*, (Brot.) Bondartsev & Singer, ya que los restos

son fundamentalmente de lignina, En general, el hongo causante de pudrición blanca reduce la resistencia a la compresión de la madera, mientras que la pudrición marrón y la blanda disminuye su capacidad de pandeo (Gayo, 2016).

En tonelería, aunque se utiliza mayoritariamente el roble (*Quercus robur*, *Q. petraea*, *Q. alba*), en Asturias el uso del castaño se mantuvo ligado a la sidra fundamentalmente. La madera de castaño es rica en elagitaninos (Lampire *et al.*, 1998; Lei, 2002) y sus niveles pueden ser incluso superiores a los del roble (Sanz *et al.*, 2010a), aunque también se sabe que influyen variables como el nicho ecológico (Prida *et al.*, 2006), ya que las frondosas pueden tener madera muy variable según el modelo de crecimiento que hayan seguido.

Todos estos aspectos en los que interviene la composición fenólica constituyen la base de la importancia de estos compuestos, pero quizá lo más destacable sea el hecho de actuar como agentes protectores naturales.

1.3 FENOLES EN CASTAÑO

Eichhorn *et al.* (2017) determinaron el contenido fenólico en la madera de castaño (*C. sativa*) y lo compararon con el obtenido en otras especies, obteniendo unos valores superiores a los observados en roble (Fernández de Simón *et al.*, 2006), haya (Albert *et al.*, 2003) o cerezo (Sanz *et al.*, 2010a). Aunque en algunos casos los fenoles tengan efectos no deseados, como ciertas coloraciones de la madera debidas a la degradación o reactividad de lo TH (Koch, 2008), la mayor durabilidad que proporcionan a este tejido hace que sean muy deseables en la mayoría de los casos. Otros tejidos del castaño, en principio no aprovechables, como la corteza (Lampire *et al.*, 1998) y los que recubren al grano del fruto (Vázquez *et al.*, 2009; De Vasconcelos *et al.*, 2010) también presenta un alto contenido fenólico, lo que les convierte en potenciales fuentes de bioproductos. Esta riqueza fenólica del castaño no es uniforme para todas sus especies, sino que varía entre ellas, como muestran Cooper & Rieske (2008) para *C. mollissima* y *C. denticata*.

No hay que olvidar la castaña, recurso siempre presente en la alimentación humana y animal, cuyo grano es altamente apreciado en gastronomía. La presencia de fenoles en esta parte del fruto (De Vasconcelos *et al.*, 2007) es un valor añadido.

1.4 ECOSISTEMA

¿Qué es un bosque?

Díaz & Vázquez (2004):

“Se trata de un ecosistema que funciona como una unidad básica de la naturaleza, que comprende tanto el conjunto de organismo vivos que lo integran, como el ambiente físico y químico en el que se desarrollan, y que funciona a base de energía, en principio procedente toda ella del sol”.

La geografía y climatología de Asturias conducen a la existencia de distintos tipos de bosques, generando un paisaje muy diverso. Estos bosques, condicionados por varios factores, se caracterizan fundamentalmente en función del clima y del suelo. En base a estos dos factores, el castaño es una especie heliófila y silicícola, que requiere un clima suave, no soportando condiciones extremas, en cuanto a temperaturas y precipitaciones, durante largas temporadas. El rango de temperatura media anual para que esta especie se desarrolle bien está entre 6 y 16° C. Prefiere suelos sueltos y profundos, de unos 50 cm y con una baja proporción de arcilla para evitar encharcamientos (Ceballos *et al.*, 1971). El pH del suelo debe ser ácido, entre 4 y 7 (Bourgeois, 1992). La alta presencia de Ca provoca clorosis, pero podrá sobrevivir mientras el suelo no contenga caliza activa en los horizontes superficiales y la precipitación sea suficiente como para que se produzca el lavado hacia niveles bajos del perfil del suelo (García & Outeriño, 1997). Por el contrario, en suelos ácidos carentes de Ca, la relación Al/Ca se eleva y actúa negativamente sobre el crecimiento del castaño, particularmente sobre el tronco (Viéitez *et al.*, 1999). En la **Tabla 1.1** se muestran algunas características del suelo de los castaños.

Tabla 1.1. Características de los distintos suelos de castaño. Fuente: Viéitez *et al.* (1999).

Potencialidad	Mala	Mediocre	Media	Buena	Excelente
Humus	dismoder	moder	mull-moder	mull-ácido	mull-mesótrofo
pH	<4 y >6.5	4.5	4.5-5.0	5	5.5-6.0
Profundidad	<40cm	40-50cm	50-60cm	60-80cm	>80cm
Textura	Arcillosa Arcillo-limosa	Limoso-arcilloso Limo-fino	Arenosa-granulosa Areno-arcillosa	Arenosa-limosa Limoso-arenosa	Arenosa-limosa Limoso-arenosa

C. sativa forma masas mixtas con *Quercus robur*, *Q. pyrenaica*, *Q. suber*, *Pinus pinaster*, *P. sylvestris*, *Fagus sylvatica* y también se asocia a *Alnus glutinosa*, *Rhamnus frangula*, *Fraxinus angustifolia*, *Crataegus monogyna*, *Ulex europaeus* (Ceballos *et al.*, 1971), pero tiende a formar masas puras.

Para poder valorar la influencia del ecosistema en el desarrollo de *C. sativa*, y viceversa, se seleccionaron 2 zonas de Asturias separadas geográficamente, Allande (occidente) y Caso (oriente), con 3 parcelas en cada zona. Estas parcelas pertenecen a las 75 parcelas permanentes de 15 m de radio representativas de los castaños asturianos que el Programa de Investigación Forestal SERIDA/CETEMAS estableció para proyectos basados en el estudio de esta especie, seleccionando masas de monte bajo de *C. sativa*. De los datos tomados y analizados de estas 75 parcelas se crearon tablas de producción de densidad variable (Menéndez-Miguélez *et al.*, 2016), ajustadas en función de un modelo de altura dominante, obteniendo así los índices de sitio (IS) a la edad de referencia de 20 años para esta especie, y estimando indirectamente su calidad de estación (CE). Las parcelas objeto de estudio en esta tesis se seleccionaron, además de por su distanciamiento geográfico, por su diferente CE.

Las condiciones edafoclimáticas repercuten en el desarrollo y productividad vegetal, siendo necesaria la evaluación o nueva modelización de los modelos de IS creados en condiciones medioambientales diferentes (Subedi *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2011). En cuanto a los castaños del noroeste de España, las mejores calidades, mayores IS, están asociados con mayor precipitación de verano, menor altitud y ausencia de largos períodos de heladas, para plantaciones juveniles en Galicia (Álvarez-Álvarez *et al.*, 2010). Para masas de monte bajo maduras en el Principado de Asturias, se asocian a mayor contenido en Mg intercambiable del suelo y menor temperatura media del mes más cálido (Afif-Khoury *et al.*, 2011), mayor porcentaje de arena y menor de arcilla en el suelo, mayor precipitación de primavera y menor de verano y menor temperatura media anual (Menéndez-Miguélez *et al.*, 2015).

Respecto al clima, los climogramas obtenidos para la zona centro del Principado de Asturias (Oviedo), procedentes de los datos publicados en la Guía Resumida del Clima en España (1981-2010) (AEMET, 2012) para tres series temporales de 30 años cada una, se muestran en la **Figura 1.5**.

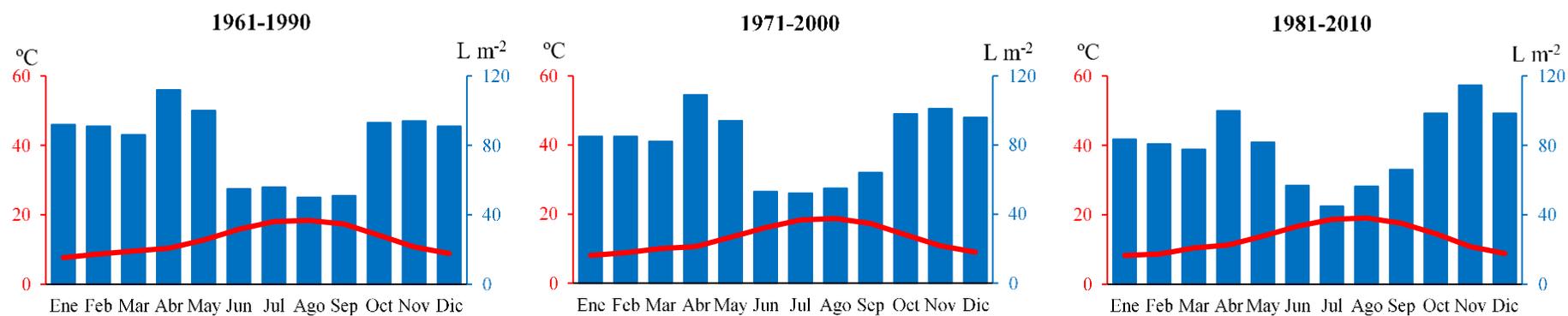


Figura 1.5. A: Climogramas de referencia climática del Principado de Asturias (Oviedo) para las series temporales de los años 1961-1990, 1971-2000 y 1981-2010. En rojo se muestran los valores y representaciones de las temperaturas medias, y en azul las precipitaciones medias.

Estos climogramas muestran una tendencia concordante con la situación de cambio climático en la que nos encontramos inmersos al evaluarlos consecutivamente (1961-1990, 1971-2000 y 1981-2010), ya que se llega a apreciar un aumento de la temperatura, mayor número de horas de sol, a pesar de la disminución de días despejados e incremento de los nubosos, y reducción de días cubiertos, con niebla, tormenta y granizo (**Tabla 1.2**). Los valores extremos registrados en este período entre 1961 y 2010 en Oviedo fueron una temperatura máxima absoluta de 36.4 °C (el 7 de septiembre de 1988), una temperatura mínima absoluta de -6 °C (el 7 de enero de 1985) y una precipitación máxima absoluta de 110 mm (el 6 de mayo de 1975). Tanto estas series climáticas como los valores extremos evidencian uno de los motivos por los cuales el castaño se mantuvo como especie prioritaria en nuestra Comunidad Autónoma, el clima favorable para su desarrollo (Conedera *et al.*, 2016), a pesar del abandono sufrido en el siglo pasado y de la interrelación de la distribución de la especie con el manejo del hombre.

Tabla 1.2. Parámetros climáticos anuales de referencia para el Principado de Asturias (Oviedo) de las series temporales entre los años 1961-1990, 1971-2000 y 1981-2010. En negrita los valores que muestran una tendencia clara de cambio en las series temporales analizadas.

	1961-1990	1971-2000	1981-2010
Temperatura media (°C)	12.7	12.9	13.3
Temperatura máxima media (°C)	16.8	17	17.4
Temperatura mínima media (°C)	8.4	8.8	9.1
Precipitación media (L m ⁻²)	971	973	959.7
Precipitación máxima media (L m ⁻²)	1323	1323	1261.3
Precipitación mínima media (L m ⁻²)	-	733	732.8
Humedad relativa (%)	78	78	78
Racha máxima media viento (Km/h)	190	190	173
Días despejados	36.5	33	31.3
Horas sol	1686	1711	1756
Días helada	9.4	8	9.1
Días nubosos	172.2	177	185.2
Días cubiertos	156.5	155	148.8
Días niebla	103.2	100	97.6
Días precipitación apreciable	184	175	175.8
Días tormenta	21.7	20	19.4
Días granizo	9.2	8	6.1
Días nieve	5.6	5	5.0

El análisis de posibles escenarios de cambio climático en Asturias (González & Anadón, 2011) muestra la evolución de precipitación y temperatura para esta comunidad, obteniendo una ligera tendencia negativa en la precipitación anual (disminuyendo ligeramente en invierno y primavera, y aumentando en el otoño) y un

claro proceso generalizado de aumento de la temperatura (con un mayor incremento durante primavera y verano, y una ligera disminución en otoño). Las proyecciones basadas en el aumento de la escala de los experimentos de simulación de clima bajo distintos escenarios de emisiones hacen esperar una reducción en las precipitaciones y un aumento en la temperatura media, esperando cambios más importantes en las precipitaciones y temperaturas durante el verano, siendo de mayor intensidad en los extremos occidental y oriental.

Según Gomes-Laranjo *et al.* (2012), el castaño europeo ocupa zonas del sur de Europa, correspondientes principalmente a los países mediterráneos, situados entre los 27° N y 53° N, donde los impactos del cambio climático pueden ser más significativos. La gran extensión del castaño en Europa durante miles de años ha inducido adaptaciones a largo plazo y de esta manera una cierta especialización de genotipos de acuerdo con las características edafoclimáticas locales. Además, Pereira-Lorenzo *et al.* (2010) comprobaron que las áreas de castaño del sur de la Península Ibérica fueron colonizadas por genotipos de la región norte ibérica, por lo que esta especie tiene potencial para adaptarse a nuevas condiciones climáticas.

Además del clima, las propiedades fisicoquímicas de los suelos son condicionantes fundamentales del hábitat, estando ambos íntimamente relacionadas. La precipitación y la temperatura causan cambios en el suelo y, por ello, el cambio climático global que estamos sufriendo repercutirá también en los suelos, erosionándolos y empobreciéndolos. No obstante, en zonas boscosas es incuestionable el valor protector de las masas de castaño, por la densidad de la cubierta, la profundidad de la capa foliar y el espesor y esponjosidad de la cubierta muerta.

Según los Mapas de Clases Agrológicas y Usos Agrarios Generales del Principado de Asturias (SITPA-IDEAS, 2012), la zona agroclimática en la que se clasifican todas las parcelas objeto de estudio es la IV, correspondiente a un tipo de clima Patagoniano húmedo (Papadakis, 1980), definido por un invierno tipo Avena (temperatura media de las mínimas absolutas del mes más frío: >-10 °C; temperatura media de las máximas del mes más frío: 5-10 °C) y un verano tipo Triticum (duración de la estación libre de heladas: 2.5-4.5 meses; temperatura media de las máximas de los meses más cálidos: >17 °C para 4 meses). Los diferentes grados de vulnerabilidad degradativa de los suelos de ambas zonas, en función de los valores de erosión hídrica potencial, son indicativos del riesgo de erosión de estas superficies en caso de ser eliminada la cobertura vegetal.

Las condiciones edafoclimáticas son las que moldearán y definirán el ecosistema, formado por un fauna y flora concreta adaptada a esas condiciones. Los microorganismos son una de las comunidades más afectadas por las variaciones producidas en estas condiciones (Castro *et al.*, 2010; Evans & Wallenstein, 2014; Docherty *et al.*, 2015), con la repercusión correspondiente dada su actividad en la degradación y transformación de la materia orgánica que enriquece los suelos.

1.5 FENOLES EN LAS INTERACCIONES ECOSISTEMA x CASTAÑO

El metabolismo de los compuestos fenólicos en las plantas está condicionado por el entorno en el que se desarrolla la especie de interés, tratándose en muchos casos de una forma de respuesta al ambiente en el que esta crece, siendo habitual que las plantas forestales, de largos periodos de vida, pasen por situaciones medioambientales muy variables, lo que implica que el contenido fenólico también varíe en el tiempo en función de estas condiciones del entorno. A nivel ecológico, los fenoles que mayor importancia tienen son aquellos que están implicados en las variadas interacciones entorno/planta, como por ejemplo Gts en *Betula pubescens* (Ossipov *et al.*, 1997) o proantocianidinas (TC) en *Swainsona formosa* (Panjehkeh *et al.* 2010). En el castaño, las defensas dependientes del ácido jasmónico están relacionadas con la cantidad de hidroxitaninos y TC que tienen las hojas y tallos, pero difieren entre *C. mollissima* y *C. dendra* (Cooper & Rieske, 2008).

El poder antioxidante de los fenoles, posiblemente su propiedad más conocida, es mostrada bien a través de su capacidad para oxidarse y proteger así a otras moléculas, como los ácidos grasos, las proteínas y los carbohidratos, o bien al actuar estabilizando radicales libres, y parece ser general en el mundo vegetal (Zivkovic *et al.*, 2009). Otra función importante de los fenoles es su capacidad quelante frente a metales, que de otra forma podrían ser tóxicos para los tejidos, por lo que pueden actuar como protectores.

Las plantas no disponen de un sistema inmunitario similar al de los animales, sin embargo, poseen diferentes niveles de defensa que van desde la barrera física a la entrada del patógeno hasta mecanismos de tipo bioquímico o molecular desencadenados ante la presencia del mismo. La gran diferencia con el animal radica en no disponer de células de defensa, sino que cada célula se podría considerar como autónoma en la respuesta al patógeno (Zipfel, 2008). No obstante, en algunos tejidos de la planta se observa la presencia de células que parecen estar destinadas al almacenaje de sustancias fenólicas, que son liberadas en el momento en que la planta sufre cualquier tipo de agresión. Estas células se encuentran en sitios estratégicos. La liberación de los fenoles de estas células daría lugar a una respuesta primaria, consistente en la lignificación de la zona o la formación de una barrera química. También pueden dar lugar a una respuesta secundaria, a través de la modificación hormonal, pues alteran la síntesis, compartimentación y degradación de las hormonas. El caso mejor conocido es el metabolismo auxínico, sobre el que los compuestos fenólicos actúan incrementando la síntesis vía triptófano, reduciendo el transporte, favoreciendo así la acumulación y disminuyendo la oxidación del ácido indolacético (Beckman, 2000).

En el castaño, la falta de nutrientes, mayor densidad de pies y ensombrecimiento son factores favorables al desarrollo de enfermedades como el chancro, causada por el hongo *Cryphonectria parasitica* (Griffin, 1986), por lo que la gestión del bosque, que mejora estos aspectos, favorece el control de esta u otras enfermedades. Por tanto, un aspecto muy interesante es valorar el efecto que el entorno o la gestión realizada tiene sobre los compuestos que se suponen juegan un papel defensivo en la planta. En este sentido, algunos trabajos apuntan a que factores como la insolación pueden actuar

favorablemente, incrementando las defensas, como es el caso de *Fagus* frente al ataque de hongos que provocan el “damping-off” (Ichihara & Yamaji, 2009). Estos autores concluyen que las plántulas con mayor iluminación resisten mejor debido a la formación de peridermis y síntesis de compuestos fenólicos. En algunas especies de *Quercus* se ha observado que las variaciones estacionales de taninos se correlacionan con la aparición de minadoras y que el contenido en vesicalagina se relaciona negativamente con la presencia de esta plaga (Yarnes *et al.*, 2008).

Del chancro del castaño se sabe que *C. parasitica* produce enzimas que despolimerizan varios componentes de la pared celular del castaño. La poligalacturonasa difunde del micelio del hongo hacia el tejido sano del árbol, causando la despolimerización del polipeptato de la lámina media (componente que adhiere las paredes celulares). La destrucción de la lámina media deja accesibles los polisacáridos de la pared celular que serán degradados, reabsorbiendo el hongo el material degradado e iniciando así su relación parasitaria (Hwang, 2001). Ya que la degradación de los polisacáridos de la pared celular, catalizada por enzimas hemicelulasas y celulasas, es un factor importante en la invasión de las células del hospedador, inhibir este proceso es una de las formas de resistencia más obvias. Hay dos mecanismos para llevarlo a cabo: la formación de una barrera fisicoquímica, que consiste en incrementar ligninas o sustancias tipo ligninas entre la pared celular y el patógeno que impidan el paso de las enzimas del patógeno, o la formación de una barrera química que consistiría en modificaciones de la propia pared que impidieran la unión enzima-sustrato, tales como los ácidos fenólicos (Friend, 1975).

Los resultados obtenidos en los estudios sobre la relación entre las sustancias químicas obtenidas a partir de castaños y su resistencia a *C. parasitica* son variados y, en ocasiones, contradictorios (Speilman, 2003). Diversos extractos de corteza han mostrado una clara diferenciación entre árboles de distinta resistencia (Nienstaedt, 1953). Aparentemente, la resistencia sería una combinación de tipo y cantidad de taninos determinada, asociada a otros factores desconocidos. La defensa del árbol podría estar centrada en la corteza interna. *C. parasitica* es capaz de aprovechar los taninos de la planta para obtener energía y carbono. No obstante, parece que estos mismos taninos o algunas enzimas (como las peroxidases) juegan un papel importante en detener el avance del hongo en los árboles resistentes (Cook, 1915; Chung *et al.*, 2008).

La ventaja de realizar planteamientos integrales que promuevan las defensas constitutivas de la planta es el hecho de que se aprovecha el efecto que diferentes factores bióticos y abióticos tiene sobre estas, aun cuando no siempre se conozcan de forma explícita. De esta forma se pueden abordar problemas actuales, pero también se fomenta la lucha frente a situaciones que puedan presentarse en el futuro. Así, en el castaño de Asturias, y por extensión en el resto de la Cornisa Cantábrica, la mayor preocupación se centra actualmente en el chancro, pero también existen otras enfermedades que, aunque con menor incidencia, afectan también a nuestros árboles, como es el caso de la tinta, provocada por *Phytophthora cinnamomi* (Gomes-Laranjo *et*

al., 2004). Además, existen numerosas plagas, que aunque no pongan en peligro a la planta, causan grandes pérdidas a nivel del fruto, tales como *Pammene fasciana*, *Cydia splendana*, *Cydia fagiglandana* o *Balaninus elephas* (González-Valera *et al.*, 2008), pero otras sí que representan un riesgo para la planta, como es la provocada por *Dryocosmus kuriphilus*, conocida como avispa del castaño (Moriya *et al.*, 2003; Bernardo *et al.*, 2013; Cerasa & Massa, 2016), y que está aumentando su población exponencialmente año a año en los castañares asturianos. Esta avispa forma agallas en pecíolos y nervio central de la hoja. Los mecanismos de defensa frente a *D. kuriphilus* o la formación de las agallas podrían estar relacionados con el metabolismo secundario, siendo un interesante campo de investigación actual y futura.

1.6 GESTIÓN EN MONTE BAJO DE CASTAÑO EN ASTURIAS

Actualmente la problemática principal del castaño en Asturias es el gran abandono que sufren los castañares. Antiguamente, se aplicaban turnos variables en función del aprovechamiento, 5-6 años para cestería, 15-25 años para taninos, 30-50 años para viguetas, 50-80 años para duelas y muebles, y 80-100 años para carpintería y ebanistería. El aprovechamiento del monte justificaba plenamente las actuaciones que hoy se han abandonado al dejar de tener la repercusión económica que tenían años atrás.

El desarrollo del monte bajo en Asturias se debe a la gran capacidad del castaño para producir brotes, incluso a partir de cepas viejas, tales como las de los ejemplares de fruto abandonados. La corta se realiza en parada vegetativa para favorecer el vigor del brote. Después de la corta del árbol adulto, cada cepa produce brotes (chirpiales) que tienen tendencia a individualizarse formando su propio sistema radical. La eliminación de cepas originales, en la medida de lo posible, cuando hayan pasado varias rotaciones, se denomina traslación de cepas, y es importante para que tenga lugar una sucesiva renovación del castañar (Álvarez, 2013). Los rebrotes crecen a mayor velocidad que las plantas utilizadas en repoblaciones de monte alto debido a que aprovechan el potente sistema radical de la planta original. En los primeros 10 años, la mortalidad natural entre los chirpiales es muy intensa por competencia. Estos montes bajos permiten obtener madera delgada muy rápido y, tras la realización de claras periódicas, también madera gruesa de calidad, dando lugar a un tipo de monte llamado fustal sobre cepa. Este tipo de monte es uno de los más productivos dentro de las especies europeas de frondosas, sobre todo en suelos escasos de nutrientes (Bourgeois, 1992).

Amorini *et al.* (2001) observaron un efecto positivo en el estado sanitario del castañar tras una gestión apropiada, eliminando aquellos árboles con chancro más avanzado y manteniendo los más vigorosos, reduciendo la susceptibilidad a *C. parasitica* y cicatrizando chancros no muy avanzados, haciéndolos no letales y alcanzando un equilibrio ecológico entre el huésped y el parásito en el ecosistema forestal gestionado.

Así, una correcta gestión forestal repercutirá favorablemente en la calidad y productividad del castaño, en su entorno ecológico y en la sociedad, tanto cultural como económicamente.

1.7 PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Por todo lo comentado con anterioridad: importancia de los fenoles, vivir en Asturias (importante zona castañera) y por el potencial fenólico de *C. sativa*, se propuso y consiguió el proyecto “Perfiles fenólicos en *Castanea sativa* Mill. y su interés desde el monte a la industria” (RTA2011-00135-00-00), que fue subvencionado a través del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) del Ministerio de Ciencia e Innovación de España. Este proyecto fue el origen de esta tesis, titulada “Fenoles en *Castanea sativa* Mill.: desde el monte a la industria”, con la que, además de generar un mayor conocimiento científico de esta especie a través de su contenido fenólico, también se pretendió revalorizar *C. sativa* para impulsar su mayor y mejor aprovechamiento, consiguiendo así mayores rentabilidades económicas para los propietarios de los castaños y hacer ver que la intervención humana en la gestión forestal de los castaños asturianos es necesaria para el bien de todos.

El trabajo que se propone plantea como hipótesis que un manejo más racional de los castaños, a través de la selección de zonas idóneas para las nuevas plantaciones y la intervención en aquellas masas que sean susceptibles de serlo, revertirá en una mejora del propio bosque y de los productos y subproductos que obtendríamos del mismo, con la participación activa en todos los procesos del metabolismo secundario del árbol.

Objetivo general

Valorar la influencia del ecosistema y la intervención humana en el perfil fenólico de *Castanea sativa* Miller y el potencial uso de los bioproductos derivados con base fenólica para diferentes aplicaciones.

Objetivos específicos

1. Optimizar la metodología del análisis fenólico en castaño.
2. Estudiar la influencia del Índice de Sitio sobre el perfil fenólico en distintos tejidos.
3. Evaluar la vinculación de la mejora del monte tras su gestión con el contenido fenólico en los diferentes tejidos
4. Determinar el potencial de los productos y subproductos del castaño para su uso directo o como bioproductos

1.8 BIBLIOGRAFÍA

AEMET (Agencia Estatal de Meteorología) (2010). Guía resumida del clima en España (1981-2010). Servicio de Banco Nacional de Datos Climatológicos, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (España).

Afif-Khoury, E.; Álvarez-Álvarez, P.; Fernández-López, M. J.; Oliveira-Prendes, J. A. & Cámara-Obregón, A. (2011). Influence of climate, edaphic factors and tree nutrition on site index of chestnut coppice stands in north-west Spain. *Forestry*, 84 (4): 385-396.

AIEF (Área de Inventario y Estadísticas Forestales) (2012). Cuarto Inventario Forestal Nacional: Principado de Asturias. Ed. Dirección General de Desarrollo Rural y Política Forestal del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (España). 58 pp.

Albert, L.; Hofmann, T.; Németh, Z. I.; Rétfalvi, T.; Koloszar, J.; Varga, S. & Csepregi, I. (2003). Radial variation of total phenol content in beech (*Fagus sylvatica* L.) wood with and without red heartwood. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 61 (3), 227-230.

Almeida, I. F.; Pinto, A. S.; Monteiro, C.; Monteiro, H.; Belo, L.; Fernandes, J.; Bento A. R.; Duarte T. L.; Garrido J.; Bahia, M. F.; Sousa J. M. & Costa, P. C. (2015). Protective effect of *C. sativa* leaf extract against UV mediated-DNA damage in a human keratinocyte cell line. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 144: 28-34.

Álvarez, I. (2013). Relación de datos climáticos y edáficos con el crecimiento de *Castanea Sativa* Mill. en el centro y oriente de Asturias. Proyecto Fin de Grado, Universidad de Oviedo (España).

Álvarez-Álvarez, P.; Díaz-Varela, E.; Cámara-Obregón, A. & Afif-Khoury, E. (2010). Relating growth and nutrition to site factors in young chestnut plantations established on agricultural and forest land in northern Spain. *Agroforestry Systems*, 79 (3): 291-301.

Andersen, Ø. M. (2001). Anthocyanins. En eLS (Ed.): 1-8.

Arapitsas, P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food chemistry*, 135 (3): 1708-1717.

Bauch, J.; Hundt, H. V.; Weißmann, G.; Lange, W. & Kubel, H. (1991). On the causes of yellow discolorations of oak heartwood (*Quercus* Sect. *Robur*) during drying. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 45 (2): 79-86.

Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57 (3): 101-110.

- Bobadilla, E. A.; Pereyra, O.; Silva, F. & Stehr, A. M. (2005). Durabilidad natural de la madera de dos especies aptas para la industria de la construcción. *Floresta*, 35 (3): 419-428.
- Bourgeois, C. (1992). *Le Châtaignier: un arbre, un bois*. Institut pour le Development Forestier, París (Francia).
- Cadahía, E.; Conde, E.; García-Vallejo, M. C. & Fernández de Simón, B. (1996). Gel permeation chromatographic study of the molecular weight distribution of tannins in the wood, bark and leaves of *Eucalyptus spp.* *Chromatographia* 42 (1-2): 95-100.
- Ceballos, L.; de Córdoba, F. & de la Torre, J. R. (1971). *Árboles y arbustos de la España peninsular*. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes, Sección de Publicaciones, Madrid (España). 512 pp.
- Cadahía, E.; Muñoz, L.; Fernández de Simón, B. & García-Vallejo, M. C. (2001). Changes in low molecular weight phenolic compounds in Spanish, French, and American oak woods during natural seasoning and toasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1790-1798.
- Canas, S. (2017). Phenolic Composition and Related Properties of Aged Wine Spirits: Influence of Barrel Characteristics. A Review. *Beverages*, 3 (55): 1-22.
- Chira, K. & Teissedre, P. L. (2013). Extraction of oak volatiles and ellagitannins compounds and sensory profile of wine aged with French winewoods subjected to different toasting methods: Behaviour during storage. *Food Chemistry*, 140 (1-2): 168-177.
- Chung, H. J.; Kwon, B. R.; Kim, J. M.; Park, S. M.; Park, J. K.; Cha, B. J.; Yang, M. S. & Kim, D. H. (2008). A tannic acid-inducible and hypoviral-regulated laccase3 contributes to the virulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21 (12): 1582-1590.
- Ciordia, M.; Pererira-Lorenzo, S.; Ramos-Cabrera, A. & Díaz, B. (2016). Asturias, paraíso de castañas. *Tecnología Agroalimentaria Boletín informativo del SERIDA*, 18: 21-27.
- Conedera, M.; Tinner, W.; Krebs, P.; de Rigo, D. & Caudullo, G. (2016). *Castanea sativa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. En: San-Miguel-Ayán, J.; de Rigo, D.; Caudullo, G.; Houston Durrant, T. & Mauri, A. (Eds.), *European Atlas of Forest Tree Species* (Publications Office of the European Union, Luxembourg): 78-79.
- Cook, M. T. & Wilson, G. W. (1915). The influence of the tannin content of the host plant on *Endothia parasitica* and related species. *Botanical Gazette*, 60 (5): 346-361.
- Cooper, W. R. & Rieske, L. K. (2008). Differential responses in American (*Castanea dentata* Marshall) and Chinese (*C. mollissima* Blume) chestnut (*Fagales: Fagaceae*) to foliar application of jasmonic acid. *Chemoecology*, 18: 121-127.

Corder, R.; Mullen, W.; Khan, N. Q.; Marks, S. C.; Wood, E. G.; Carrier, M. J. & Crozier, A. (2006). Oenology: red wine procyanidins and vascular health. *Nature*, 444: 566.

De Vasconcelos, M. C. B. M.; Bennet, R. N.; Quideaub, S.; Jacquet, R.; Rosa, E. & Ferreira-Cardoso, J. (2010). Evaluating the potential of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruit pericarp and integument as a source of tocopherols, pigments and polyphenols. *Industrial Crops and Products*, 31: 301–311.

De Vasconcelos, M. C. B. M.; Bennet, R. N.; Rosa, E. & Ferreira-Cardoso, J. (2007). Primary and secondary metabolite composition of kernels from three cultivars of portuguese chestnut (*Castanea sativa* Mill.) at different stages of industrial transformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3508-3516.

DGCEAMN (Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental y Medio Natural) (2017). Perfil Ambiental de España 2016. Ed. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid (España). 335 pp.

Díaz, T.E. & Vázquez, A. (2004). Guía de los Bosques de Asturias. Ed. Trea, S. L., Gijón (España). 287 pp.

Díaz-Hernández, M. B.; Ciordia-Ara, M.; Ramos-Cabrer, A. M. & Pereira-Lorenzo, S. (2009). Cultivares de castaño (*Castanea sativa* Mill.) de Asturias. Ed. KRK-SERIDA,, Asturias, 90 pp.

Eichhorn, S.; Erfurt, S.; Hofmann, T.; Seegmueller, S.; Németh, R. & Hapla, F. (2017). Determination of the phenolic extractive content in sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Wood. *Wood Research*, 62 (2): 181-196.

Fernández de Simón, B.; Sanz, M.; Cadahía, E.; Poveda, P. & Broto, M. (2006). Chemical characterization of oak heartwood from Spanish forests of *Quercus pyrenaica* (Wild.). Ellagitannins, low molecular weight phenolic, and volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (21): 8314-8321.

Fernandez-Orozco, R., Li, L., Harflett, C., Shewry, P. R., & Ward, J. L. (2010). Effects of environment and genotype on phenolic acids in wheat in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (17): 9341-9352.

Freitas, J. B. & Naves, M. M. V. (2010). Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. *Revista de Nutrição*, 23 (2): 269-279.

Friend, J. (1975). Lignification in infected tissue. Capítulo 14 en *Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships*, Ed. Elsevier: 291-302.

Fürstenberg-Hägg, J.; Zagrobelny, M. & Bak, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (5): 10242-10297.

- García, A. (2011). Inventarios florísticos en masas de monte bajo de *Castanea sativa* en Asturias. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Oviedo (España).
- García, J. L. (2005). Toponimia asturiana: el porqué de los nombres de nuestros pueblos. Ed. Prensa Asturiana. On line: <https://mas.lne.es/toponimia/> (27/06/2018).
- García, J. M. & Outeiriño, A. (1997). Recuperación de alternativas agroforestales tradicionales: aptitud para el cultivo del castaño de los suelos de la comarca de Monterrei (Galicia, España). Actas del I Congreso Forestal Hispano-Luso, 6: 45-50.
- Gayo, J. I. (2016). Efecto de taninos de castaño (*Castañea sativa* Mill.) sobre el crecimiento de hongos *in vitro*. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Oviedo (España).
- Griffin, G. J. (1986). Chestnut blight and its control. Horticultural Reviews, 8: 291-336.
- Gomes-Laranjo, J.; Araújo-Alves, J.; Ferreira-Cardoso, J.; Pimentel-Pereira, M.; Abreu, C. G. & Torres-Pereira, J. (2004). Effect of chestnut ink disease on photosynthetic performance. Journal of Phytopathology, 152 (3): 138-144.
- Gomes-Laranjo, J.; Dinis, L.-T.; Martins, L.; Portela, E.; Pinto, T.; Ciordia, M.; Feito, I.; Majada, J.; Peixoto, F.; Pereira, S.; Ramos, A. M.; Zhang, C.; Martins, A. & Costa, R. (2012). Characterization of chestnut behavior with photosynthetic traits. Capítulo 3, en: Applied Photosynthesis. Mohammad Mahdi Najafpour (Ed.): 47-80. ISBN 978-953-51-0061-4.
- González, F. & Anadón, R. (2011). Análisis de escenarios de cambio climático en Asturias. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras del Principado de Asturias. Viceconsejería de Medio Ambiente. Oficina para la Sostenibilidad, el Cambio Climático y la Participación. ISBN: 978-84-694-2848-1
- González, G. & González, A. (2008). Plagas y enfermedades del castaño. Tecnología Agroalimentaria: Boletín Informativo del SERIDA, 5: 37-42.
- Hagerman, A. E. (2002). Hydrolyzable tannin structural chemistry. Tannin handbook: 1-8.
- Hagerman, A. E.; Riedl, K. M.; Jones, G. A.; Sovik, K. N.; Ritchard, N. T.; Hartzfeld, P. W. & Riechel, T. L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. Journal of agricultural and food chemistry, 46 (5): 1887-1892.
- Helm, R. F., Ranatunga, T. D. & Chandra, M. (1997). Lignin-hydrolyzable tannin interactions in wood. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45 (8): 3100-3106.
- Hwang, P. (2001). Conversion of virulent *Cryphonectria parasitica* from the Lula lake land trust to hypovirulent strains. Tesis Doctoral, Universidad de Tennessee (EUA).
- Ichihara, Y. & Yamaji, K. (2009). Effect of light conditions on the resistance of current-year *Fagus crenata* seedlings against fungal pathogens causing damping-off in a natural

beech forest: fungus isolation and histological and chemical resistance. *Journal of Chemical Ecology*, 35 (9): 1077-1085.

Jara, A. (1978). El Castaño, árbol frutal. Hojas divulgadoras, Nº 23-24/78 HD, Ministerio de Agricultura (España).

Keulder, D. B. (2006). The influence of commercial tannin additions on wine composition and quality Tesis Doctoral, Universidad de Stellenbosch, (Sudáfrica).

Khanbabaee, K. & van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural product reports*, 18 (6): 641-649.

Koch, G. (2008). Discolouration of wood in the living tree and during processing. En: Conference COST E53, Delft (Países Bajos): 11-18.

Laks, P. E.; McKaig, P. A. & Hemingway, R. W. (1988). Flavonoid biocides: wood preservatives based on condensed tannins. *Holzforschung*, 42 (5): 299-306.

Lampire, O.; Mila, I.; Raminosa, M.; Michon, V.; Du Penhoat, C. H.; Faucheur, N.; Laprevote, O. & Scalbert, A. (1998). Polyphenols isolated from the bark of *Castanea sativa* Mill. Chemical structures and auto-association. *Phytochemistry*, 49 (2): 623-631.

Lei, Z. (2002). Monomeric ellagitannins in oaks and sweetgum. Tesis Doctoral, Virginia Polytechnic Institute and State University (EUA).

Menéndez-Miguélez, M.; Álvarez-Álvarez, P.; Majada, J. & Canga, E. (2015). Effects of soil nutrients and environmental factors on site productivity in *Castanea sativa* Mill. coppice stands in NW Spain. *New Forests*, 46 (2): 217-233.

Menéndez-Miguélez, M.; Álvarez-Álvarez, P.; Majada, J. & Canga, E. (2016). Management tools for *Castanea sativa* coppice stands in northwestern Spain. *Bosque (Valdivia)*, 37 (1): 119-133.

Mila, I.; Scalbert, A.; & Expert, D. (1996). Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry*, 42 (6): 1551-1555.

Min, B. R.; Barry, T. N.; Attwood, G. T. & McNabb, W. C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106 (1-4): 3-19.

Mosedale, J. R. (1995). Effects of oak wood on the maturation of alcoholic beverages with particular reference to whisky. *Forestry*, 68 (3): 203-230.

Motilva, M. J.; Serra, A. & Macià, A. (2013). Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: an overview. *Journal of Chromatography A*, 1292: 66-82.

Nienstaedt, H. (1953). Tannin as a factor in the resistance of chestnut, *Castanea* spp., to the chestnut blight fungus, *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, 43: 32-38.

- Nunes, L.; Patrício, M.; Tomé, J. & Tomé, M. (2011). Modeling dominant height growth of maritime pine in Portugal using GADA methodology with parameters depending on soil and climate variables. *Annals of Forest Science*, 68 (2): 311-323.
- Okuda, T. & Ito, H. (2011). Tannins of constant structure in medicinal and food plants—hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16 (3): 2191-2217.
- Orden APM/207/2017, de 7 de marzo, por la que se dispone la inclusión de diversas variedades de distintas especies en el Registro de Variedades Comerciales. Boletín Oficial del Estado, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (España), 60 (11/03/2017), Sección III: 18161-18165.
- Ossipov, V.; Loponen, J.; Ossipova, S.; Haukioja, E. & Pihlaja, K. (1997). Gallotannins of birch *Betula pubescens* leaves: HPLC separation and quantification. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25 (6): 493-504.
- Panjehkeh, N.; Backhouse, D. & Taji, A. (2010). Role of proanthocyanidins in resistance of the legume *Swainsona formosa* to *Phytophthora cinnamomi*. *Journal of phytopathology*, 158 (5): 365-371.
- Papadakis, J. (1980). El clima. Con especial referencia a los climas de América Latina, Península Ibérica, ex Colonias Ibéricas y sus potencialidades agropecuarias, Editorial Albatros, Buenos Aires, Argentina.
- Pereira-Lorenzo, S.; Costa, R. M. L.; Ramos-Cabrer, A. M.; Ribeiro, C. A. M.; da Silva, M. F. S.; Manzano, G. & Barreneche, T. (2010). Variation in grafted European chestnut and hybrids by microsatellites reveals two main origins in the Iberian Peninsula. *Tree genetics & genomes*, 6 (5): 701-715.
- Pereira-Lorenzo, S. & Ramos-Cabrer, A. M. (2004). Chestnut, an ancient crop with future. En *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops*, Ed. Springer (Países Bajos), Volumen 1: 105-161.
- Pereira-Lorenzo, S.; Ramos-Cabrer, A. M.; Díaz-Hernández, B.; Ascasíbar-Errasti, J.; Sau, F. & Ciordia-Ara, M. (2001a). Spanish chestnut cultivars. *HortScience*, 36 (2): 344-347.
- Pereira-Lorenzo, S.; Ramos-Cabrer, A. M.; Díaz-Hernández, B. & Ciordia-Ara, M. (2005). Características morfológicas e isoenzimáticas de los cultivares de castaño (*Castanea sativa* Mill.) de Asturias. Ed. Monografías INIA, Serie Agrícola, 16.
- Pereira-Lorenzo, S.; Rios, D.; González-Pérez, J.; Cubas, F.; Perdomo, A.; Calzadilla, C. & Ramos-Cabrer, A. M. (2001b). Chestnut cultivars on the Canary Islands. *For Snow Landsc Res*, 76, 445-450.

Piñol, M. T.; Palazón, J. & Cusidó, R. M. (2008). Capítulo 17 “Introducción al metabolismo secundario”, en Fundamentos de Fisiología Vegetal, Azcón-Bieto, J. & Talón, M. (eds.), McGraw-Hill Interamericana (edit.), Madrid, 2ª ed.: 323-348.

Reuters, T. (2012). Web of Science. <https://www.webofknowledge.com> (19/06/2018).

Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000 (1-2): 657-691.

Roces-Díaz, J. V.; Jiménez-Alfaro, B.; Chytrý, M.; Díaz-Varela, E. R. & Álvarez-Álvarez, P. (2018). Glacial refugia and mid-Holocene expansion delineate the current distribution of *Castanea sativa* in Europe. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 491: 152-160.

Samanta, A.; Das, G. & Das, S. K. (2011). Roles of flavonoids in plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6 (1): 12-35.

Sánchez-Sánchez, H. & Morquecho-Contreras, A. (2017). Chemical Plant Defense Against Herbivores. Capítulo 1 en *Herbivores*, InTechOpen: 3-28.

Sanz, M.; Cadahía, E.; Esteruelas, E.; Muñoz, A. M.; Fernández de Simón, B.; Hernández, T. & Estrella, I. (2010a). Phenolic compounds in cherry (*Prunus avium*) heartwood with a view to their use in cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (8): 4907-4914.

Sanz, M.; Cadahía, E.; Esteruelas, E.; Muñoz, A. M.; Fernández de Simón, B.; Hernández, T. & Estrella, I. (2010b). Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (17): 9631–9640.

Sanz, M.; de Simón, B. F.; Cadahía, E.; Esteruelas, E.; Muñoz, A. M.; Hernández, M. T. & Estrella, I. (2012). Polyphenolic profile as a useful tool to identify the wood used in wine aging. *Analytica Chimica Acta*, 732: 33-45.

Serrano, J.; Puupponen-Pimiä, R.; Dauer, A.; Aura, A-M. & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53 (Suppl. 2): S310–S329.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30 (12): 3875-3883.

SITPA-IDEAS (2012). Mapas de Clases Agrológicas y Usos Agrarios Generales. Sistema de Información Territorial e Infraestructura de Datos Espaciales del Principado de Asturias. On line:

<http://sitpa.cartografia.asturias.es/Geoportal/extlayout.aspx?userId=MO/NQxQuLBE=&lang=es> (01/02/2018).

- Shahidi, F. & Naczki, M. (2003). Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Press. 576 pp.
- Sochor, J.; Zitka, O.; Skutkova, H.; Pavlik, D.; Babula, P.; Krska, B.; Horna, A.; Adam, V.; Provaznik, I. & Kizek, R. (2010). Content of phenolic compounds and antioxidant capacity in fruits of apricot genotypes. *Molecules*, 15: 6285-6305.
- Speilman, L. (2003). The role of fungal competition and tannin chemistry in chestnut and oak resistance to *Cryphonectria parasitica*. Tesis de Honor, Department of Biology, Sweet Briar College, Virginia (EUA).
- Subedi, N.; Sharma, M. & Parton, J. (2009). An evaluation of site index models for young black spruce and jack pine plantations in a changing climate. Climate change research report (CCRR-15), Applied Research and Development, Ontario Forest Research Institute, Ministry of Natural Resources (Canada). 26 pp.
- Tuyen, P. T.; Xuan, T. D.; Khang, D. T.; Ahmad, A.; Quan, N. V.; Tu Anh, T. T.; Anh, L. H. & Minh, T. N. (2017). Phenolic Compositions and Antioxidant Properties in Bark, Flower, Inner Skin, Kernel and Leaf Extracts of *Castanea crenata* Sieb. et Zucc. *Antioxidants*, 6 (31): 1-14.
- Vázquez, G.; González-Alvarez, J.; Santos, J.; Freire, M. S. & Antorrena, G. (2009). Evaluation of potential applications for chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial crops and products*, 29: 364–370.
- Viéitez Cortizo, E.; Viéitez Madriñan, M.L.; Viéitez Madriñan, F. (1999). O Castiñeiro: Bioloxía e patoloxía. Consello da Cultura Galega, Santiago de Compostela (España). 274 pp.
- Vignote, S. & Martinez, I. (2006) *Tecnología de la madera*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid (España). 363 pp.
- Vivas, N. (2005). *Manual de tonelería destinado a usuarios de toneles*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (España). 231 pp.
- Yang, X. Q. & Guido, J. E. (2016). An overview of plant phenolics measurement. *Advances In Food Technology and Nutritional Sciences*, SE (2): S34-S44.
- Yarnes, C. T.; Boecklen, W. J. & Salminen, J. P. (2008). No simple sum: seasonal variation in tannin phenotypes and leaf-miners in hybrid oaks. *Chemoecology*, 18 (1): 39-51.
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in immunology*, 20 (1): 10-16.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2

Descripción metodológica de la caracterización fenólica en castaño

2.1 INTRODUCCIÓN

Los fenoles constituyen una parte importante del llamado metabolismo secundario de las plantas. Hoy en día, se sabe que, además de tener una función en la propia célula que las sintetiza, estas sustancias también tienen una gran actividad en el metabolismo vegetal, formando parte de compuestos estructurales como la lignina, hormonales como el ácido salicílico y, sobre todo, en la interacción de la planta con su entorno, por ejemplo como fitoalexinas (García-Mateos & Pérez-Leal, 2003; Arruda *et al.*, 2016), sustancias alelopáticas (Li *et al.*, 2010; He *et al.*, 2012; Al Harun *et al.*, 2015; Cheng & Cheng, 2015; Gelsomino *et al.*, 2015) o disuasorios nutritivos (Rehman *et al.*, 2012; Fürstenberg-Hägg *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014; Kula & Lazorič, 2015; Sánchez-Sánchez & Morquecho-Contreras, 2017).

El interés en el estudio de los compuestos fenólicos se debe en gran medida a que desempeñan un papel trascendente en la alimentación humana, pues contribuyen de forma importante a las propiedades organolépticas y nutritivas de alimentos y bebidas. No obstante, la importancia que han adquirido en las últimas décadas las sustancias bioactivas, entre las que se encuentran los fenoles (Helmja *et al.*, 2007), se corresponde con el hecho de haber encontrado una relación directa entre la presencia de determinados compuestos y la salud humana (Freitas & Naves, 2010). Esto ha dado lugar a la revalorización del consumo de ciertos alimentos y como consecuencia a fomentar el interés de determinadas dietas, como la mediterránea, o al desarrollo de numerosos alimentos funcionales. En este sentido, la funcionalidad que tienen para nuestra salud no es más que una aplicación de su función en la planta, como es el caso de su papel como antioxidantes (Sochor *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista de la Fisiología Vegetal, cómo ya se ha comentado en la Introducción General, los compuestos fenólicos se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellos que se sintetizan durante el desarrollo normal de la planta y los que se producen en respuesta al medio (Beckman, 2000). El interés generado entorno a estas sustancias bioactivas, ha servido para fomentar el desarrollo de metodologías analíticas en vegetales, que en otras circunstancias no hubieran tenido un tratamiento similar. El metabolismo fenólico, propio de microorganismos y plantas, ha sido uno de los principales beneficiarios de este interés. A nivel ecológico, los fenoles están implicados en muchas de las respuestas de las plantas al entorno, sean éstas frente a cambios bióticos (herbivoría, enfermedades causadas por ciertos organismos, alelopatía) o abióticos (estrés térmico, hídrico o lumínico) (Akula & Ravishankar, 2011). Las respuestas de defensa de las plantas dependientes del ácido jasmónico están relacionadas con la cantidad de taninos condensados (TC) e hidrolizables (TH) que

tienen en las hojas y tallos, pero difieren incluso entre especies, como es el caso de *Castanea mollissima* y *C. dentata* (Cooper & Rieske, 2008).

La especie escogida para este estudio es el castaño (*C. sativa* Miller). Esta es una especie multifuncional que ha adquirido un notable interés en todas aquellas zonas donde crece, debido a su capacidad para generar recursos: alimento, madera, energía y otro tipo de bienes como el paisaje que ofrece su entorno. El Principado de Asturias se encuentra dentro de las regiones autonómicas de España en las cuales el castaño es mayoritario y su conservación es de sumo interés, pues de ella dependieron tradicionalmente sectores como el ganadero (engorde del cerdo), alimenticio (directamente a través del fruto o de forma indirecta en su uso para cestería o tonelería), energético (reflejado en la leña, hoy revalorizada en residuos de biomasa) o el sector industrial y de construcción (interés de la madera dada su resistencia y durabilidad).

El análisis fenólico en especies forestales se centra, en la mayoría de los casos, en especies de alto valor económico en el sector maderero, siendo las más estudiadas roble (Cadahía *et al.*, 2001; Fernández de Simón *et al.*, 2006; Ockels *et al.*, 2007), castaño (Lampire *et al.*, 1998; De Vasconcelos *et al.*, 2010) y más recientemente cerezo (Sanz *et al.*, 2010a).

La presencia de compuestos fenólicos en el fruto también es relevante, pues la castaña ha sido y es una alternativa muy viable en la alimentación humana y animal (Vázquez *et al.*, 2009) debido a su precio, producción y a su interés en la obtención de harinas sin gluten destinadas a la alimentación en celíacos (Demirkesen *et al.*, 2010). La valoración del contenido fenólico realizada en tres variedades de castaña portuguesa muestra un contenido significativo de estos compuestos (De Vasconcelos *et al.*, 2007), lo que le confiere un considerable valor debido a la presencia de ciertas sustancias fenólicas beneficiosas para la salud.

Cuando se plantea el estudio del metabolismo fenólico de una especie o del contenido de estos compuestos en un material de interés, el primer problema a que nos enfrentamos es definir el método analítico más adecuado, ya que comparar resultados fenólicos procedentes de distintos trabajos es difícil, debido a la gran cantidad de factores de los que depende un perfil fenólico y la gran variedad metodológica existente para este tipo de caracterización. Independientemente de la especie vegetal con la que se trabaje, el principal problema para la intercomparación de estos resultados se debe a la falta de uniformidad metodológica. Aunque existe un método normalizado para la cuantificación de los fenoles totales (FT) (Folin & Ciocalteu, 1927), descrito por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (2011), para muestras líquidas, las discrepancias comienzan desde la forma de recoger y procesar las muestras y se mantienen hasta la cuantificación final. Los puntos más críticos a la hora de establecer una ruta metodológica estandarizable son: 1) Toma de muestra (época y parte vegetal a muestrear); 2) Almacenamiento de la muestra hasta su procesado (temperatura y tiempo de almacenamiento); 3) Preparación de la muestra para la extracción (muestra fresca/seca, tipo de secado y troceado/molienda); 4) Extracción (solvente, pH, tiempo,

temperatura, agitación y oscuridad); 5) Fraccionamiento (extracciones sólido-líquido y líquido-líquido, solventes, pH, re-extracciones y fases intermedias); 6) Cuantificación (evaporación de solventes, redisolución y estándar de referencia). Yang & Guido (2016) abordaron bibliográficamente algunos de estos aspectos comunes en los análisis fenólicos.

La metodología extractiva empleada (solvente, temperatura, tiempo y proceso) es uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta, tanto para mantener la integridad de los compuestos como para mejorar la eficiencia de extracción (Bedgood *et al.*, 2005; Padda & Picha, 2007; De Vasconcelos *et al.*, 2010) y minimizar el efecto de matriz. La sensibilidad química de algunos fenoles hace que ciertas variaciones metodológicas sean suficientes para cambiar el resultado del contenido fenólico en un mismo tipo de muestra (Robards, 2003; Serrano *et al.*, 2009; Leitao *et al.*, 2011; Sanz *et al.*, 2012; Barbosa-Pereira *et al.* 2013; Munekata *et al.*, 2016). Las posibles interferencias matriciales, variables en función del tipo de material vegetal a analizar, pueden ser suficientes como para que ciertos compuestos no sean detectados. Cuando las especies son leñosas, las diferencias entre los distintos tipos de órganos/tejidos hacen que las muestras difieran tanto en cantidad como en tipo de compuestos (Cadahía *et al.*, 1996; De Vasconcelos *et al.*, 2010). Pero, además, el metabolismo de estas sustancias fenólicas está condicionado por el entorno, tratándose en muchos casos de una forma de respuesta al ambiente en el que la planta crece, siendo habitual que estas plantas, de largos periodos de vida, pasen por situaciones medioambientales muy variables, lo que implica que el contenido y composición fenólica también varíe en el tiempo en función de estas condiciones medioambientales.

Los pasos previos a la cuantificación fenólica son, a veces, muy tediosos y laboriosos, como en los casos en que se requieren distintos tipos de hidrólisis ácidas y/o alcalinas e incluso enzimáticas (Robards, 2003). No obstante, en función del uso final que tenga la información que queremos generar, puede ser conveniente realizar un tipo u otro de valoración, y no siempre está justificada la extracción completa de los compuestos. Así, por ejemplo, cuando el interés radica en valorar los fenoles de la madera por su influencia en el envejecimiento de vinos y aguardientes en toneles, se justificaría más la extracción hidroalcohólica sin más procesado muestral que la obtención del tamaño de muestra apropiado para dicho fin, pues de todos los compuestos que constituyan la madera sólo van a ser activos los que sean capaces de solubilizarse en esas condiciones (Madrera *et al.*, 2010). Por el contrario, cuando se trata de valorar la resistencia de la madera en construcción, cercado de parcelas u otro tipo de aplicaciones estructurales, donde los fenoles también tienen un papel fundamental, pues actúan como agentes protectores naturales, se suelen valorar únicamente los solubles en agua. Sin embargo, se debería conocer también la composición total, ya que a lo largo del envejecimiento de la madera se producen interacciones bióticas y abióticas con el entorno que dan lugar a transformaciones y liberaciones de compuestos que podrían no ser solubles en agua inicialmente, pero que

si lo serían tras los cambios producidos y, por tanto, con posibilidad de influir en la durabilidad de la madera.

En base a todo lo descrito anteriormente, y tomando como referencia la metodología descrita por Sanz *et al.* (2010b), el objetivo que se plantea en este capítulo es desarrollar un protocolo analítico aplicable a cualquier material vegetal, que permita uniformizar y facilitar el análisis fenólico en muestras vegetales de distinto origen y con diferente finalidad.

2.2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1 Productos químicos

Los productos químicos empleados se obtuvieron de diferentes fuentes comerciales: ácido elágico (AE), ácido gálico (AG), (+)-catequina hidratada, galato de metilo (GM), cloruro de acetilo, reactivo de fenol Folin-Ciocalteu, tetrahidrofurano y vainillina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Química SL (Madrid, España); acetonitrilo y metanol ultragrado se compraron a ROMIL Ltd. (Cambridge, Reino Unido); ácido fórmico y éter dietílico eran de BDH Prolabo (Leuven, Bélgica); carbonato sódico y sulfato sódico anhidro fueron suministrados por Panreac Química SAU (Barcelona, España); etanol y metanol para análisis procedían de JT Baker (Phillipsburg, EEUU); acetato de etilo fue obtenido en Merck (Darmstadt, Alemania) y ácido sulfúrico de Scharlau Chemie SA (Barcelona, España).

2.2.2 Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron diferentes órganos y tejidos de castaños (*C. sativa*) de monte bajo: corteza exterior e interior, albura y duramen de troncos, madera y corteza de ramas, hojas, amentos y erizos, cáscara, tegumento y grano de los frutos. Troncos, ramas, hojas, amentos y erizos se recogieron de castañares situados en el occidente y oriente del Principado de Asturias (noroeste de España), en los concejos de Allande y Caso, respectivamente. Las castañas procedieron de un castañar situado en Sela da Loura, perteneciente al concejo de Vegadeo (occidente asturiano).

Las muestras de corteza exterior e interior, albura y duramen se obtuvieron a partir de discos de troncos recién apeados que se trasladaron hasta el laboratorio a temperatura ambiente. Asimismo, las castañas también se llevaron a temperatura ambiente, transportándose el resto de las muestras a 4 °C. Una vez en el laboratorio, los discos de los troncos se acondicionaron a temperatura ambiente durante 5 meses, las ramas se descortezaron y trocearon ambas partes (madera y corteza) guardándolas a -80 °C y las hojas, amentos y erizos se almacenaron directamente a esa misma temperatura. Las castañas se conservaron a 4 °C hasta su secado en estufa de aire forzado (Digitronic, JP SELECTA, Barcelona, España) durante 72 h a 40 °C, tras lo cual se separaron los diferentes tejidos, almacenándose posteriormente a -80 °C.

El peso seco de las muestras de tronco se calculó tras el secado de una parte de éstas en estufa de aire forzado durante 24 h a 102 °C. Las ramas, hojas, amentos y erizos se liofilizaron (LyoQuest -55, Telstar Technologies SL, Tarrasa, España). Todas las muestras fueron molidas en molino criogénico (Freezer/Mill 6770, SPEX SamplePrep Inc., New Jersey, EE. UU.) y conservadas a -80 °C hasta llevar a cabo la extracción fenólica.

2.2.3 Extracción de compuestos fenólicos

La extracción de los compuestos fenólicos se basó en la metodología descrita por Sanz *et al.* (2010b) y el método seleccionado está esquematizado en la **Figura 2.1**. Las muestras molidas (1 g por muestra) se sometieron a una extracción sólido-líquido, empleando como solvente 100 mL de metanol/agua (purificada tipo II, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) (1:1, v/v), a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación invertida (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Reax2, Schwabach, Alemania) durante 24 h. Los extractos se filtraron en un embudo tipo Büchner a través de filtros de microfibra de vidrio Whatman GF/B (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Reino Unido) de 37 mm de diámetro, y el metanol se eliminó en rotavapor (Heidolph Instruments, Laborota4002-control, Alemania) a una velocidad de rotación de 50 rpm y temperatura del baño de agua de 35 °C. Este extracto acuoso se llevó a 50 mL con agua purificada tipo II (Merck) (extracto I) y se tomó una alícuota de 3 mL, que se conservó a -20 °C hasta realizar la valoración del contenido en FT. El resto del extracto I se sometió a una extracción líquido-líquido con 20 mL de éter dietílico, tres veces (extracto II), y la fase acuosa restante se volvió a someter a otra extracción líquido-líquido por triplicado con 20 mL de acetato de etilo (extracto III). El extracto acuoso final (extracto IV) se liofilizó y guardó a -80 °C hasta llevar a cabo la cuantificación de los TH, diferenciando entre galotaninos (Gts) y Ets. A los extractos II y III se les adicionó la cantidad necesaria de sulfato sódico anhidro para eliminar el agua presente en las distintas fases orgánicas, guardándolos a 4 °C hasta el día siguiente, que se decantaron y lavaron sus residuos sólidos (sulfato sódico solvatado) dos veces con los solventes de cada fase orgánica, para finalmente llevarlos a sequedad. Este proceso de secado se realizó inicialmente en el rotavapor a las condiciones mencionadas anteriormente, hasta reducir el volumen de los extractos por debajo de 1 mL, para posteriormente llevarlos a sequedad total en microtubos en un evaporador centrífugo (Jouan RC1010+RCT90, Thermo Electron Industries SAS, Chateau-Gontier, Francia) y guardando los residuos sólidos secos a -20 °C hasta la cuantificación fenólica correspondiente, fenoles de bajo peso molecular (FBPM) en los residuos sólidos secos provenientes del extracto II (análisis no realizados) y TC en los residuos sólidos secos del extracto III.

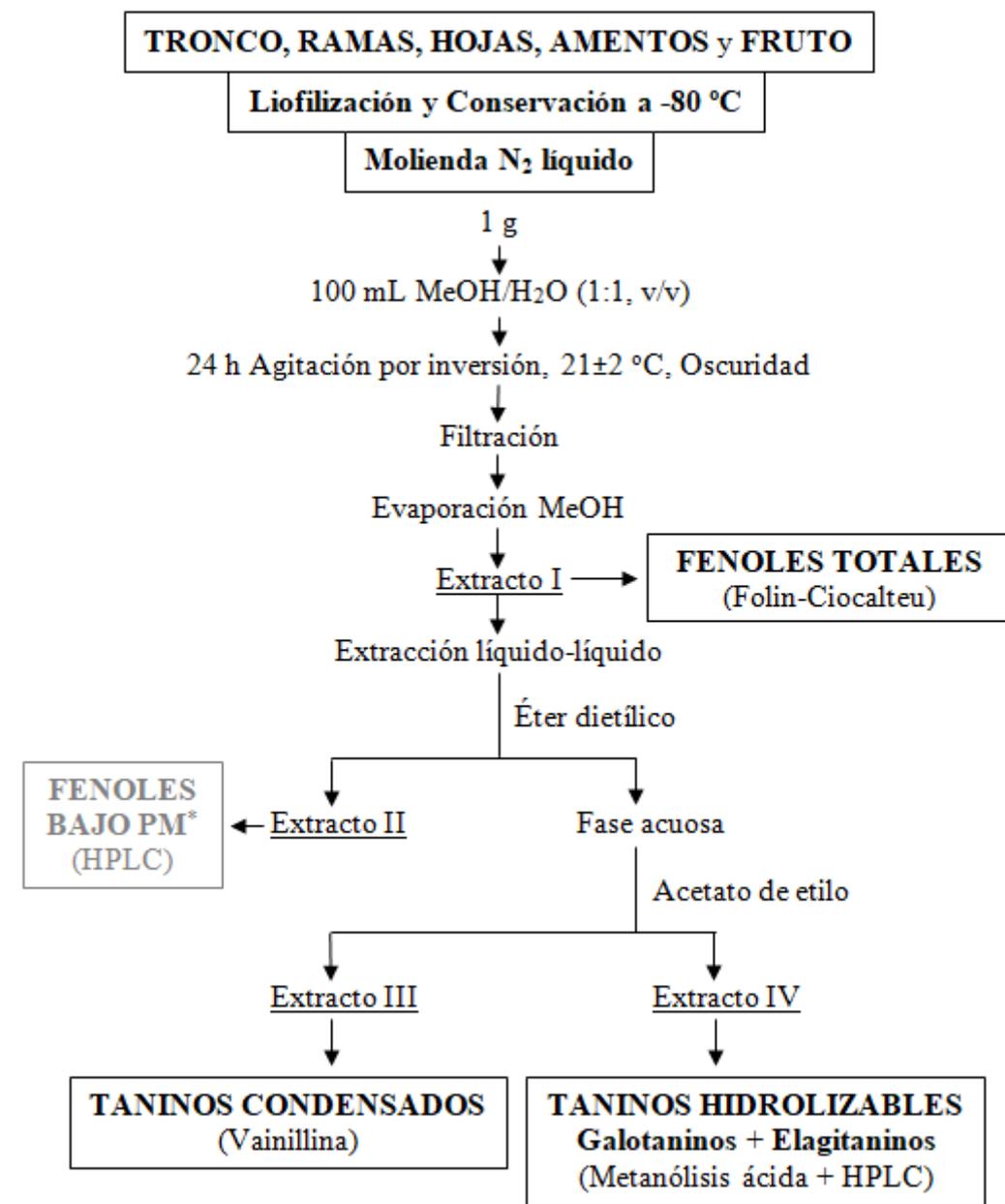


Figura 2.1. Esquema de la extracción y caracterización fenólica.

* Fenoles de bajo peso molecular (FBPM) no valorados.

2.2.4 Fenoles totales

Los FT se valoraron en la alícuota tomada del extracto I, mediante el ensayo Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), basado en las determinaciones de tirosina y triptófano en proteínas llevadas a cabo por Folin & Ciocalteu (1927), y cuyo método fue adaptado para la valoración de FT con varias modificaciones a lo largo del tiempo, y que la Organización Internacional de la Viña y el Vino (2011) describe y detalla. Ensayo fundamentado en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu. Para la cuantificación de los FT se empleó como estándar de referencia AG, disuelto y diluido en agua (ultrapura tipo I, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), expresando el contenido fenólico total como mg equivalentes de AG por g

de peso seco (mg EAG g_{ps}^{-1}). Las concentraciones para la recta de calibración fueron: 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 0.8 mg AG mL^{-1} .

El orden y proporción de muestra y reactivos empleados en el ensayo de Folin-Ciocalteu fue el siguiente:

Blanco/Estándar/Muestra:H₂O:Reactivo Folin-Ciocalteu:Na₂CO₃ 20% (m/v) acuoso
(3.3:71.7:5:20, v/v/v/v)

El análisis se realizó en microplaca de 96 pocillos (Sero-Wel, Bibby Scientific Ltd, Staffordshire, Reino Unido), y se adicionaron los siguientes volúmenes en cada pocillo: 10 μ L de blanco (H₂O), estándar o muestra + 215 μ L de H₂O + 15 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu + 60 μ L de Na₂CO₃ 20% (m/v) acuoso. Una vez añadidos todos los reactivos, la microplaca se llevó al espectrofotómetro (Synergy HT, BIOTEK Instruments, Winoosk, EE. UU.), donde a 25 °C se agitó 30 s, incubó 30 min y realizó la lectura espectrofotométrica (densidad óptica, DO) a 750 nm. Cada microplaca contenía un blanco, las nueve concentraciones del estándar para obtener la recta de calibración y las muestras. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

2.2.5 Taninos condensados

Los TC se determinaron en el residuo sólido seco procedente del extracto III rediseuelto y diluido en metanol. El residuo rediseuelto se filtró a través de filtros de PVDF Millex-HV de 0.45 μ m de tamaño de poro y 13 mm de diámetro (Merck Millipore Ltd., Carrigtwohill, Irlanda). El método que se empleó para su cuantificación fue el de la vainillina, teniendo en cuenta algunas de las conclusiones alcanzadas por Sun *et al.* (1998). Como estándar de referencia se usó (+)-catequina hidratada, disuelta y diluida en metanol, y expresado el contenido en TC como mg equivalentes de (+)-catequina por g de peso seco (mg EC g_{ps}^{-1}). Las concentraciones de (+)-catequina para la recta de calibración fueron: 0.015, 0.03, 0.07, 0.125, 0.225, 0.35 y 0.5 mg mL^{-1} .

El orden y proporción de muestra y reactivos empleados en el ensayo de la vainillina fue el siguiente:

Blanco/Estándar/Muestra:vainillina 1% (m/v_{MeOH}):H₂SO₄ 10% (v/v_{MeOH})
(20:40:40, v/v/v)

El análisis, al igual que para los FT, se realizó en microplaca de 96 pocillos, y se adicionaron los siguientes volúmenes en cada uno de ellos: 60 μ L de blanco (MeOH), estándar o muestra + 120 μ L de vainillina 1% (m/v_{MeOH}) + 120 μ L de H₂SO₄ 10% (v/v_{MeOH}). Una vez añadidos todos los reactivos, la microplaca se llevó al espectrofotómetro, donde a 30 °C se agitó 30 s, incubó 15 min y realizó la lectura espectrofotométrica a 500 nm. Cada microplaca contenía un blanco, las siete concentraciones del estándar para obtener la recta de calibración y las muestras. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

2.2.6 Taninos hidrolizables

Los TH (Gts y Ets) se analizaron en el residuo sólido seco procedente del extracto IV. Se pesaron 20 mg de este residuo en tubos de vidrio de 1.5 cm de diámetro y 10 cm de altura con tapón de rosca resistente a alta temperatura, y se sometieron a una reacción de metanólisis ácida mediante la adición de 2 mL de metanol (grado HPLC) y 0.2 mL de ácido sulfúrico 96% (m/m, 1.84 g mL⁻¹) (Hartzfeld *et al.*, 2002), en atmósfera de N₂, para minimizar la presencia de O₂ y evitar así la degradación oxidativa del AG a altas temperaturas (Inoue & Hagerman, 1988), a 85 °C, en baño de aceite con agitación en las muestras durante 3 h. Una vez a temperatura ambiente las muestras metanolizadas se filtran a través de filtros de PVDF Millex-HV (Millipore Ireland BV, Carrigtwohill, Irlanda) de 0.45 µm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro, y se guardan a 4 °C hasta su análisis por HPLC. Tras la metanólisis, la mayoría de los TH son degradados a sus unidades constitutivas básicas, AG (procedente de los Gts), que se transforma en GM por reacción con el metanol en medio ácido caliente, y AE, procedente de los Ets. Estos dos compuestos son los que se cuantificaron por HPLC para expresar el contenido en TH como mg de GM por g de peso seco (mg GM g_{ps}⁻¹), para los Gts, y mg de AE por g de peso seco (mg AE g_{ps}⁻¹), para los Ets. Tras la metanólisis no debe aparecer AG, debido a su transformación íntegra en GM, pero para asegurar el 100% de esa transformación, se confirmó su ausencia en los cromatogramas de las muestras.

El sistema de HPLC utilizado fue un equipo Varian modelo ProStar (Varian Inc., Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EE. UU.) con dos módulos de suministro de solvente modelo 210, inyector automático modelo 410, detector de matriz de fotodiodos modelo 335, desgasificador Alltech (Alltech Associates Inc., Illinois, EE. UU.) modelo 590 y software de control cromatográfico Galaxie versión 1.9 (Varian Inc., Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EE. UU.). La separación cromatográfica se realizó en base a los parámetros establecidos por Bobinaitè *et al.* (2012). Como columna cromatográfica se usó una Brisa “LC²” C18 de 5 µm y 25 x 0.46 cm (Teknokroma Analítica SA, Barcelona, España), a temperatura ambiente. La fase móvil consta de ácido fórmico 0.1% (v/v) acuoso (eluyente A) y acetonitrilo/metanol/ácido fórmico (84.9:15:0.1, v/v/v) (eluyente B). El GM y el AE presentes en la solución producto de la metanólisis realizada al residuo sólido del extracto IV se analizaron con el gradiente de elución: 0-20 min, desde 5% a 30% de B en A; 20-30 min, desde 30% a 90% de B en A; 30-35 min, 90% de B en A; 35-40 min, desde 90% a 5% de B en A; 40-45 min, 5% de B en A. La velocidad de flujo fue 1 mL min⁻¹. El volumen de muestra inyectado fue de 100 µL. Cada una de las muestras metanolizadas se diluyeron en la proporción adecuada con la fase móvil inicial de la cromatografía (5% de B en A) y fueron analizadas una única vez. Los cromatogramas fueron monitorizados a 271 y 252 nm para el GM y AE, respectivamente. La identificación de estos compuestos fue llevada a cabo por comparación de sus tiempos de retención y espectros de absorción con sus correspondientes estándares (**Figura 2.2**). La concentración de cada compuesto fue calculada a través de la recta de calibración obtenida con sus estándares a distintas concentraciones en las mismas condiciones cromatográficas que las muestras. Las

concentraciones de cada estándar para la recta de calibración fueron: 0.2, 2.5, 5, 7.5, 10 y 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cada concentración de los estándares fue inyectada por triplicado. Destacar que, si bien las solubilidades del AG y el GM no son problemáticas, si lo es la del AE, que requiere una mezcla metanol/tetrahidrofurano (24:1, v/v) para disolver el estándar sólido y obtener una solución madre (Bobinaitė *et al.*, 2012), a partir de la cual se realizan las diluciones correspondientes con la fase móvil inicial de la cromatografía (5% de B en A).

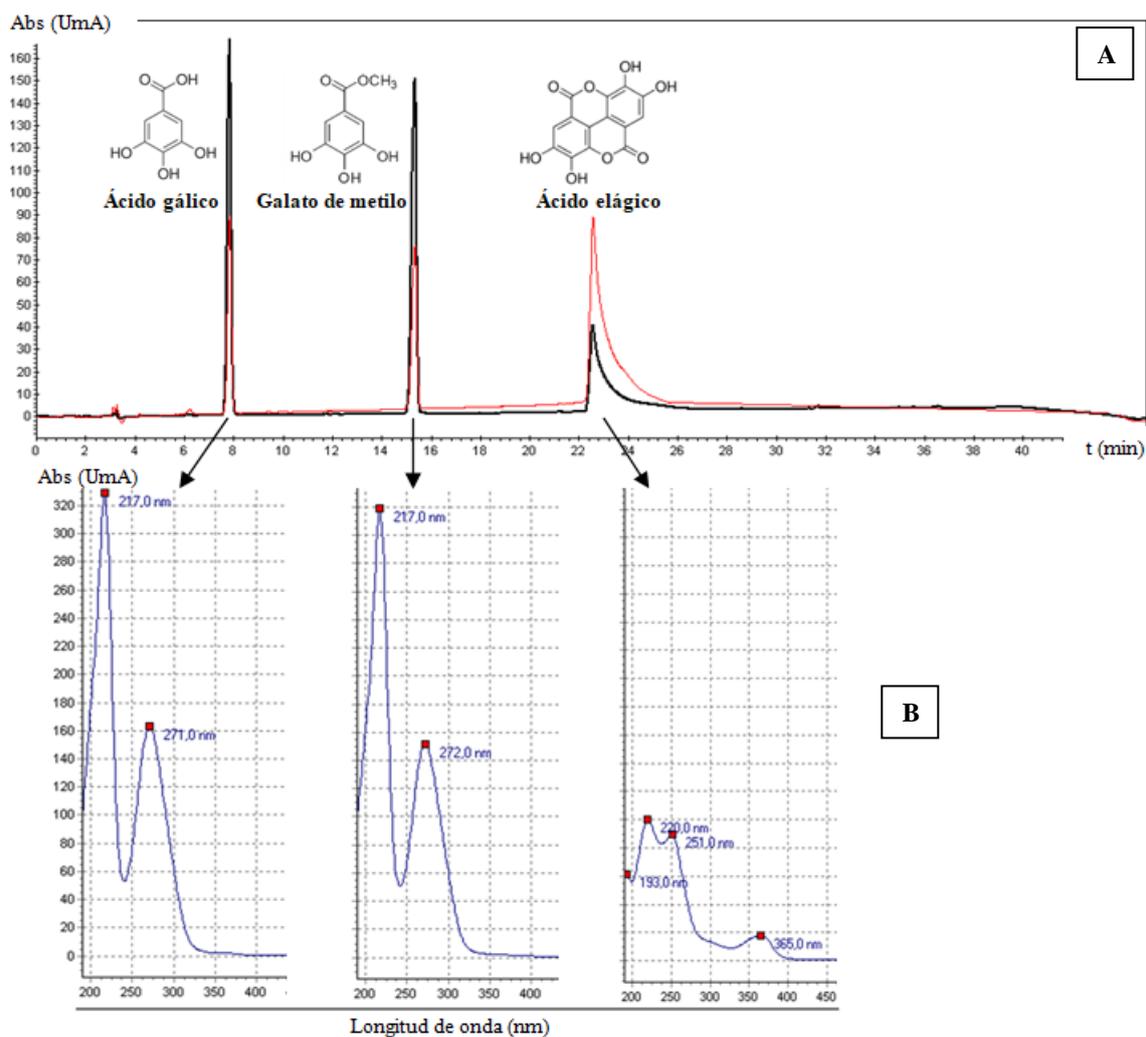


Figura 2.2. A: Cromatogramas de HPLC-DAD monitorizados a las longitudes de onda de 271 (negro) y 252 (rojo) nm de los estándares analizados en la degradación de los taninos hidrolizables tras la reacción de metanólisis. **B:** Espectros de absorción de cada estándar.

2.2.7 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos cuantitativos obtenidos se llevó a cabo con el programa informático IBM SPSS Statistics 23.0. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron en base a un análisis de varianza (ANOVA), por

comparación de medias y considerando un modelo lineal general con pruebas *post hoc* para un nivel de significación de 0.05.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La metodología descrita en el apartado anterior es el compendio de una optimización previa donde se valoraron algunos de aquellos parámetros metodológicos que pueden alterar los resultados de una caracterización fenólica. Estos parámetros incluyen desde el tipo de muestra (material vegetal), que en este caso fueron hojas y duramen de castaño, temperatura de conservación (T^a_{con}) (4, -20 y -80 °C), temperatura de molienda (T^a_{mol}) (T^a ambiente y ≤ -195.8 °C, T^a de ebullición del N₂ líquido a una atmósfera de presión), alternativas al protocolo considerado de referencia (Sanz *et al.*, 2010b) y la comparación de este frente a otro de carácter exclusivamente enológico (Madrera *et al.*, 2010). Una vez establecida una metodología adecuada, se validó en los distintos órganos/tejidos del castaño mencionados en el apartado 2.2.2.

2.3.1 Optimización metodológica

El material vegetal de partida sobre el que se vaya a realizar la caracterización fenólica es un aspecto muy importante a tener en cuenta. En órganos complejos y activos, como pueden ser las hojas y amentos, durante el tiempo que transcurre desde la toma de muestra hasta su análisis, su composición es fácil que varíe, en mayor o menor grado, en función del estado y temperatura de conservación de las muestras y del tiempo transcurrido hasta su análisis. Los materiales vegetales empleados en la optimización metodológica, hojas (recolectadas de planta clonal de castaño híbrido *C. crenata* x *C. sativa*) y duramen (procedente de un disco de unos 2 cm de espesor cortado a 1.3 m de la base del tronco de *C. sativa*), fueron seleccionados debido a la gran diferencia matricial entre ambos. Las hojas *in vivo* son uno de los órganos vegetales más complejos a nivel bioquímico, debido a la gran cantidad de procesos fisiológicos que en ellas se pueden llegar a dar. Por el contrario, el duramen es una parte con una función más estructural y de menor complejidad metabólica.

Además de los parámetros relacionados con la conservación y procesado de las muestras, previos a la extracción, se trató de optimizar diferentes aspectos de ésta y de la cuantificación de los compuestos de interés. En la **Figura 2.3** se esquematizan los protocolos evaluados. Como referencia se utilizó el descrito por Sanz *et al.* (2010b), protocolo VI de la **Figura 2.3**. Las extracciones para cada uno de ellos se realizaron por cuadruplicado.

La extracción y separación de los compuestos fenólicos de diferente naturaleza química (FBPM, TC y TH) se realizó mediante extracciones líquido-líquido, cuya separación se basa en la diferente solubilidad de estos compuestos en dos solventes no miscibles, en este caso, uno orgánico (éter dietílico o acetato de etilo) y agua.

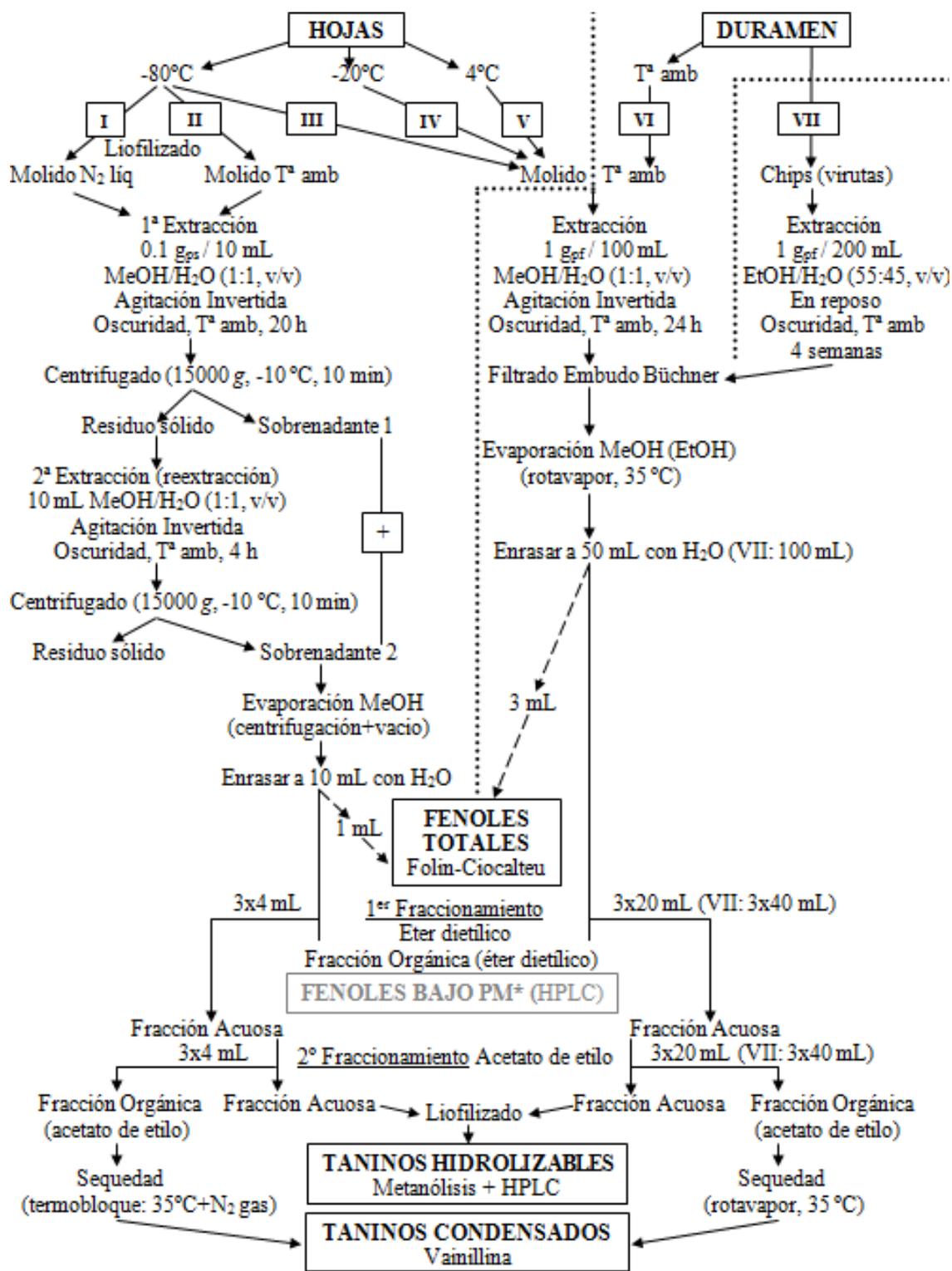


Figura 2.3. Esquema de las distintas metodologías empleadas. Los protocolos I y II introducen modificaciones con respecto al protocolo VI en el procesamiento de las muestras y la metodología extractiva. Los protocolos III, IV y V valoran el efecto de la T^a_{con} sobre las muestras foliares. Los protocolos VI y VII describen metodologías recogidas en la bibliografía para el procesamiento de muestras de duramen con destino enológico.

* Fenoles de bajo peso molecular (FBPM) no valorados.

2.3.1.1 Determinación de Fenoles Totales y Taninos Condensados e Hidrolizables

De las distintas familias fenólicas obtenidas en el fraccionamiento esquematizado en la **Figura 2.1** (FT, FBPM, TC y TH: Gts y Ets), la optimización analítica para su posterior cuantificación se centró en FT, TC y TH.

Los FT, cuantificados mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, admitido internacionalmente para analizar el contenido fenólico total, cuyo fundamento y forma de llevarlo a cabo varía poco de unos trabajos a otros, hace que los resultados obtenidos puedan ser comparados entre sí con mínimas consideraciones. Este ensayo, a pesar de las interferencias matriciales que otros compuestos puedan aportar, tanto por exceso (compuestos no fenólicos que reaccionan de forma similar en la reacción redox que se produce en este ensayo) como por defecto (apantallamiento o captación de compuestos fenólicos por otros compuestos que impidan que la reacción de intercambio electrónico se produzca), es el más usado debido a su relativa simplicidad, en base a lo cual se seleccionó para comparar la eficacia extractiva de las diferentes metodologías. Como estándar para la recta de calibración se utilizó el AG, en un rango amplio de concentraciones, consiguiendo una buena linealidad, en base a los correspondientes coeficientes de determinación (R^2). En las regresiones lineales obtenidas en el rango de concentración de AG, desde 0.0125 hasta 0.6 mg AG mL⁻¹, R^2 varió entre 0.9991 y 0.9998.

Los FBPM, extraídos con el éter dietílico del primer fraccionamiento, no se cuantificaron en este trabajo. La extracción de estos compuestos fenólicos se realizó, en primer lugar, para facilitar la extracción y cuantificación de los TC, reduciendo de esta forma la presencia de posibles compuestos interferentes, y, en segundo lugar, una vez caracterizado el perfil fenólico general, para concretar a nivel individual aquellos compuestos fenólicos de interés con una finalidad más específica. La cuantificación de estos compuestos, en la cual se está trabajando en la actualidad, se lleva a cabo mediante HPLC.

Los métodos utilizados para la cuantificación de los TC muestran considerables diferencias de fundamento entre unos y otros, debido a la diversidad y complejidad de las estructuras de estos compuestos, tal y como recogen Schofield *et al.* (2001) en una revisión al análisis de los TC, lo que implica una gran disparidad en la forma de expresar los resultados obtenidos. De ellos, uno de los más usados es el ensayo de la vainillina. Para su empleo hay que tener en cuenta varios factores críticos (naturaleza y concentración del ácido empleado, tiempo y temperatura de reacción, concentración de vainillina, estándar utilizado y presencia de agua y sustancias interferentes) que hacen variar los resultados obtenidos mediante este ensayo (Sun *et al.*, 1998). La cuantificación de los TC aquí realizada se llevó a cabo mediante este ensayo, considerando algunas de las conclusiones alcanzadas por Sun *et al.* (1998) en una reevaluación y optimización de varios parámetros que afectan principalmente a su sensibilidad. Parte de la mejora analítica se basó en valorar el efecto de reducción de la sensibilidad de este ensayo que causa la presencia de agua en el solvente de

reconstitución de las muestras y estándar ((+)-catequina). Los solventes comparados son metanol/agua (MeOH/H₂O, 1:1, v/v), usado por Sanz *et al.* (2010b), y metanol, propuesto por Sun *et al.* (1998). Los resultados obtenidos con ambos solventes (**Tabla 2.1**), tanto para el estándar como para la muestra utilizada (duramen procesado según protocolo VI), corroboraron los mejores resultados del metanol como solvente, ya que permitió aumentar considerablemente la sensibilidad del ensayo, rebajando los límites de detección y cuantificación, además de mejorar la linealidad (R²).

Tabla 2.1. Contenido de Taninos Condensados (mg equivalentes de (+)-catequina/g de peso fresco) para muestras de duramen de *Castanea sativa* con redisolución del extracto a analizar en MeOH/H₂O y MeOH (media ± EE). * Diferencia significativa entre solventes (ANOVA, comparación de medias, p ≤ 0.005, n=16). DO: Densidad óptica (absorbancia por unidad de longitud, UmA cm⁻¹).

Solvente	Estándar ((+)-catequina)				R ²	Duramen (mg EC g _{pf} ⁻¹)
	Mínimo		Máximo			
	mg mL ⁻¹	DO	mg mL ⁻¹	DO		
MeOH/H ₂ O	0.12	0.016 ±0.00050	2	0.185 ±0.0010	0.998	0.250* ±0.0061
MeOH	0.02	0.029 ±0.00050	0.5	0.884 ±0.0055	0.9998	0.291* ±0.011

La optimización del análisis de los TH (Gts y Ets) se realizó sólo cualitativamente, en base a los cromatogramas obtenidos tras las diferentes metanólisis ácidas realizadas a las muestras de duramen de castaño. El procedimiento para llevar a cabo la metanólisis es un aspecto determinante en la cuantificación de estos compuestos, ya que la posterior resolución cromatográfica dependerá del grado de degradación que los TH sufran con esta reacción. Se evaluaron tres tipos de metanólisis sobre muestras extraídas según el protocolo VI. Inicialmente, se compararon las metanólisis empleadas por Sanz *et al.* (2010b), con metanol/ácido clorhídrico 6 M (MeOH/HCl, 9:1, v/v), 120 °C y 160 min, y la descrita por Lei *et al.* (2001), con disolución anhidra de HCl metanólico (proporción 190 µL cloruro de acetilo/mL MeOH), 100 °C y 60 min. Las condiciones cromatográficas establecidas para la obtención de los cromatogramas de la muestra sin reacción de metanólisis y para las degradadas por ésta fueron las usadas por Lei *et al.* (2001). Los cromatogramas obtenidos tras estas dos metanólisis se muestran en la **Figura 2.4** (cromatograma B). Posteriormente se probó una tercera, basada en la llevada a cabo por Hartzfeld *et al.* (2002), con metanol/ácido sulfúrico (MeOH/H₂SO₄, 10:1, v/v) en atmósfera de N₂, 85 °C y 180 min, tiempo de reacción y condiciones cromatográficas en función de los resultados obtenidos por Bobinaitè *et al.* (2012) (**Figura 2.4**, cromatogramas C). En la **Figura 2.4** se observa que los mejores espectros cromatográficos son los correspondientes a la última metanólisis realizada, ya que tanto la degradación de las

muestras en los compuestos de interés a analizar, GM (procedente de la metilación del AG generado) y AE, como la resolución cromatográfica de sus picos son buenas. En base a estos resultados, se consideró la metanólisis basada en Hartzfeld *et al.* (2002), reduciendo el tiempo de reacción y estableciendo la separación cromatográfica según Bobinaitė *et al.* (2012), como el procedimiento óptimo para el análisis de TH.

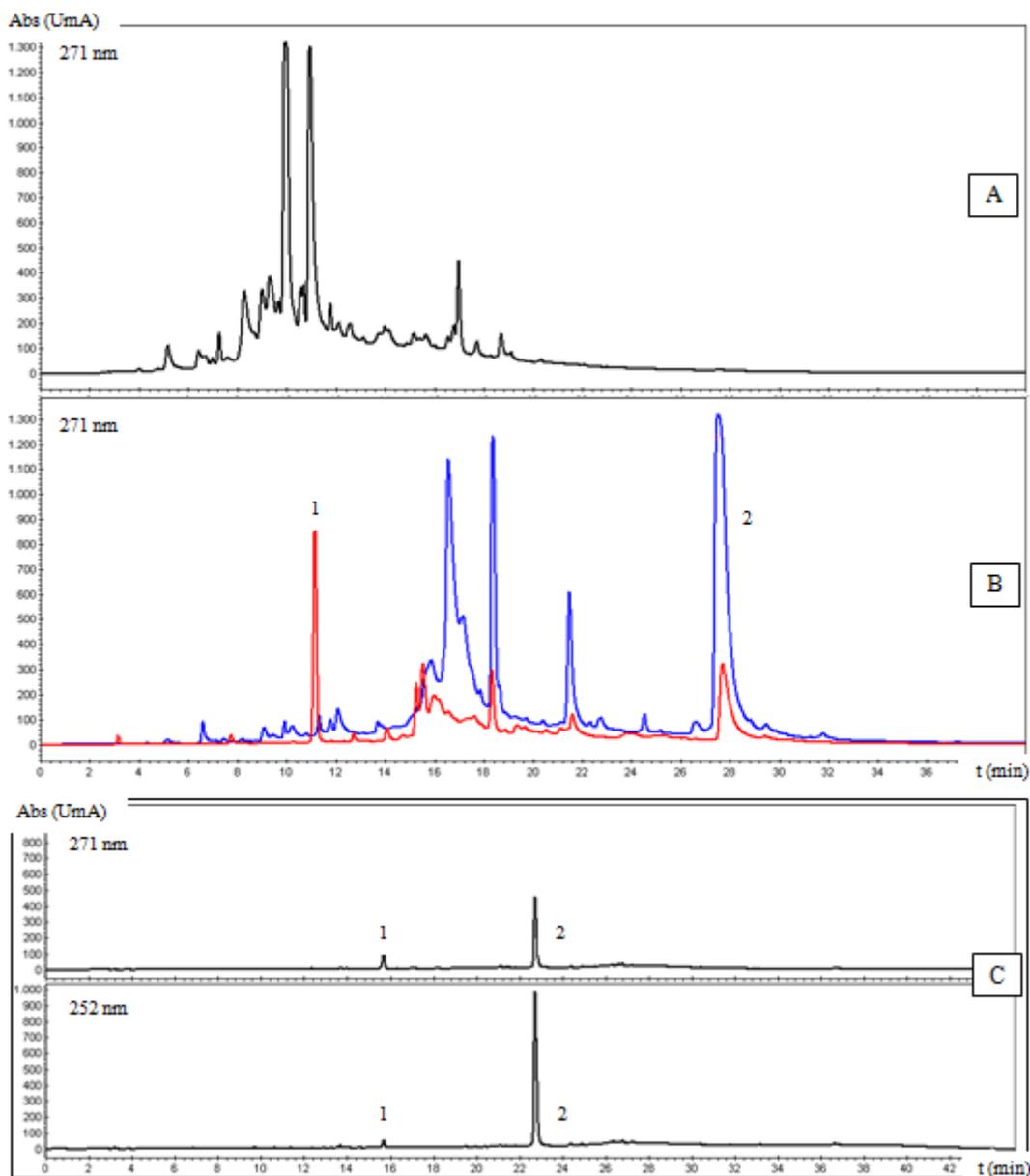


Figura 2.4. Cromatogramas obtenidos tras la liofilización del extracto acuoso final de la muestra de duramen de *Castanea sativa* extraída según el protocolo VI. A: Sin reacción de metanólisis, monitorizado a la longitud de onda de 271 nm. B: Con metanólisis según Sanz *et al.* (2010b) (rojo) o Lei *et al.* (2001) (azul), a 271 nm. C: Con metanólisis según Hartzfeld *et al.* (2002), a 271 y 252 nm. 1: galato de metilo. 2: ácido elágico.

2.3.1.2 Efecto de la temperatura de conservación en muestras foliares

Las muestras foliares se conservaron a distintas temperaturas (4, -20 y -80 °C) entre 18 y 21 días. La cuantificación de los FT y TC en las muestras conservadas a las temperaturas ensayadas se muestran en **Tabla 2.2**. De las temperaturas de conservación valoradas, -80 °C (protocolo III) fue con la que se obtuvieron los valores más altos para ambos tipos de compuestos fenólicos, indicando una mayor degradación fenólica a las otras dos T_{con}^{as} estudiadas (-20 y 4 °C). En los TC se observó una progresión en función de la T_{con}^a , siendo esta degradación mayor a la temperatura más alta.

Tabla 2.2. Contenido de Fenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/g de peso fresco) y Taninos Condensados (mg equivalentes de (+)-catequina/g de peso fresco) de las muestras foliares del híbrido *Castanea crenata* x *C. sativa* conservadas a distintas temperaturas (media \pm EE). Diferentes letras indican diferencias significativas entre protocolos (ANOVA, *post hoc* DMS, $p \leq 0.05$, $n=16$).

Protocolo (T_{con}^a)	Fenoles Totales (mg EAG g_{pf}^{-1})	Taninos Condensados (mg EC g_{pf}^{-1})
III (-80 °C)	12.13 ^a \pm 0.68	0.1482 ^a \pm 0.0031
IV (-20 °C)	9.92 ^b \pm 0.47	0.1228 ^b \pm 0.0048
V (4 °C)	9.77 ^b \pm 0.55	0.0984 ^c \pm 0.0049

En cuanto a los TH, en la **Figura 2.5** se muestran los cromatogramas obtenidos tras la metanólisis descrita por Sanz *et al.* (2010b) y con las condiciones cromatográficas de Lei *et al.* (2001) representativos de las muestras procesadas a partir de los protocolos III (-80 °C), IV (-20 °C) y V (4 °C). En las obtenidas siguiendo el protocolo III se observó un mayor pico de GM, lo que correspondería a más Gts, y menor pico de AE, lo que implicaría menos Ets. Que el pico de AE sea mayor en las muestras cuya T_{con}^a fue de -20 y 4 °C puede deberse a la formación de este tipo de compuestos (TH) a partir de la degradación producida durante el tiempo de almacenamiento, ya que, teniendo en cuenta los resultados comentados para los FT y TC, la disminución del contenido fenólico de las muestras almacenadas a esas dos T_{con}^a era evidente. Esto podría indicar un metabolismo fenólico más activo durante el almacenamiento de las muestras a -20 y 4 °C, aspecto no deseable.

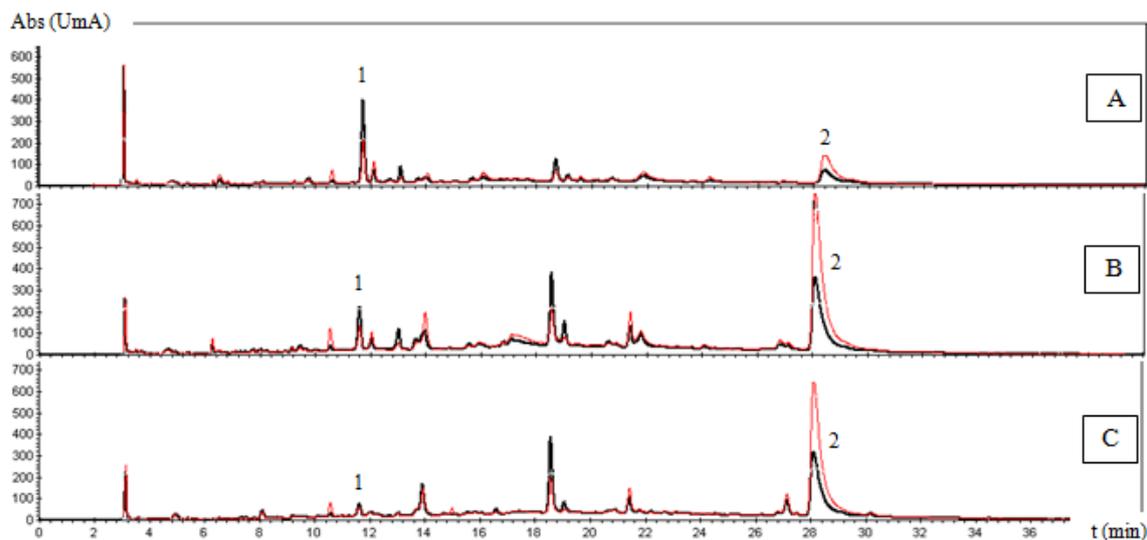


Figura 2.5. Cromatogramas monitorizados a las longitudes de onda de 271 (negro) y 252 (rojo) nm de la degradación de los taninos hidrolizables, tras la metanólisis según Sanz *et al.* (2010b) y las condiciones cromatográficas descritas por Lei *et al.* (2001), en las muestras foliares del híbrido *Castanea crenata* x *C. sativa* conservadas a distintas temperaturas. A: Protocolo III (-80 °C). B: Protocolo IV (-20 °C). C: Protocolo V (4 °C). 1: galato de metilo. 2: ácido elágico.

La T^a_{con} de las muestras foliares presenta un efecto claro sobre el contenido fenólico (**Tabla 2.2**). A medida que ésta aumenta, los FT disminuyen, probablemente debido a una degradación química de estos compuestos. Algunos autores (Hakkinen, 2000; Robards, 2003) han observado que procesos tales como la forma de descongelar las muestras influyen considerablemente en los resultados obtenidos, sugiriendo una degradación química como proceso por el cual se produce esta pérdida fenólica. No obstante, también se observa que los TC, muy resistentes a cualquier tipo de hidrólisis (White *et al.*, 2010), también sufren la misma influencia de la T^a_{con} de las muestras, aunque, en este caso, parece más probable que tuviese lugar una degradación enzimática. Por todo esto, la conservación de las muestras tiene sentido fundamentalmente cuando se trata de una estructura viva y bioquímicamente activa, y, en especial, cuando es necesario muestrear en un momento concreto y en lugares alejados del laboratorio donde se va a procesar la muestra. No obstante, incluso en muestras menos activas, como el duramen de la madera, también puede ser importante la T^a a la que se conserven las muestras, puesto que los microorganismos asociados pueden llegar a afectar su composición original (Koch, 2008), aspecto que puede tener relevancia si lo que se busca es conocer la composición original de los tejidos. Sin embargo, si se quiere comprobar la composición de la madera en estudios de durabilidad, relacionados con el sector de la construcción, y en aplicaciones enológicas, donde se buscan tratamientos concretos que conlleven alteraciones en la composición fenólica y que promueven o reducen la presencia de microorganismos (Doussot *et al.*, 2002; Canas *et al.*, 2007), estas muestras deben ser tratadas de forma semejante al proceso industrial.

2.3.1.3 Efecto de la temperatura de molienda en muestras foliares

Como se ha comentado anteriormente, la T^a_{con} tiene un claro efecto sobre la composición fenólica, por lo que la T^a_{mol} de la muestra ha de ser considerada de igual manera. En la molienda se producen impactos y fricción entre partículas que producen un calentamiento, que, aunque sea de corta duración, hay que tener en cuenta, ya que los compuestos de interés están más expuestos, por estar cada vez más fraccionada la muestra. Por este motivo, realizar este proceso en baño de N_2 líquido ($T^a \leq -195.8$ °C, T^a de ebullición del N_2 líquido a una atmósfera de presión) reduce en gran medida el incremento de T^a , lo que implica una menor degradación fenólica. Así, llevar a cabo la molienda de la muestra en un molino criogénico, en baño de N_2 líquido (protocolo I), comparándolo con el protocolo II (a T^a_{amb}), además de reducir el calentamiento producido durante la molienda, hace que las muestras sean más quebradizas y queden mucho más fraccionadas, favoreciendo su homogeneización, sobre todo cuando la muestra está constituida por partes con diferente grado de dureza, y aumenta la superficie de contacto con el solvente, lo que mejora la eficiencia en la extracción de los compuestos. Tanto la menor degradación, como la mayor eficiencia extractiva, se aprecian en el mayor contenido en FT (**Tabla 2.3**) y mayores picos cromatográficos de GM (Gts) y AE (Ets) para los TH (**Figura 2.6**) en las muestras molidas en molino criogénico con baño de N_2 líquido.

Tabla 2.3. Contenido de Fenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco) y Taninos Condensados (mg equivalentes de (+)-catequina/g de peso seco) de las muestras foliares del híbrido *Castanea crenata* x *C. sativa* molidas a diferentes temperaturas (T^a_{mol}) (media \pm EE). * Diferencia significativa entre protocolos (ANOVA, comparación de medias, $p \leq 0.05$, $n=16$).

Protocolo (T^a_{mol})	Fenoles Totales (mg EAG g_{ps}^{-1})	Taninos Condensados (mg EC g_{ps}^{-1})
I (N_2 líq.)	65.5* \pm 0.40	0.639 \pm 0.042
II (T^a_{amb})	48.2* \pm 2.2	0.678 \pm 0.014

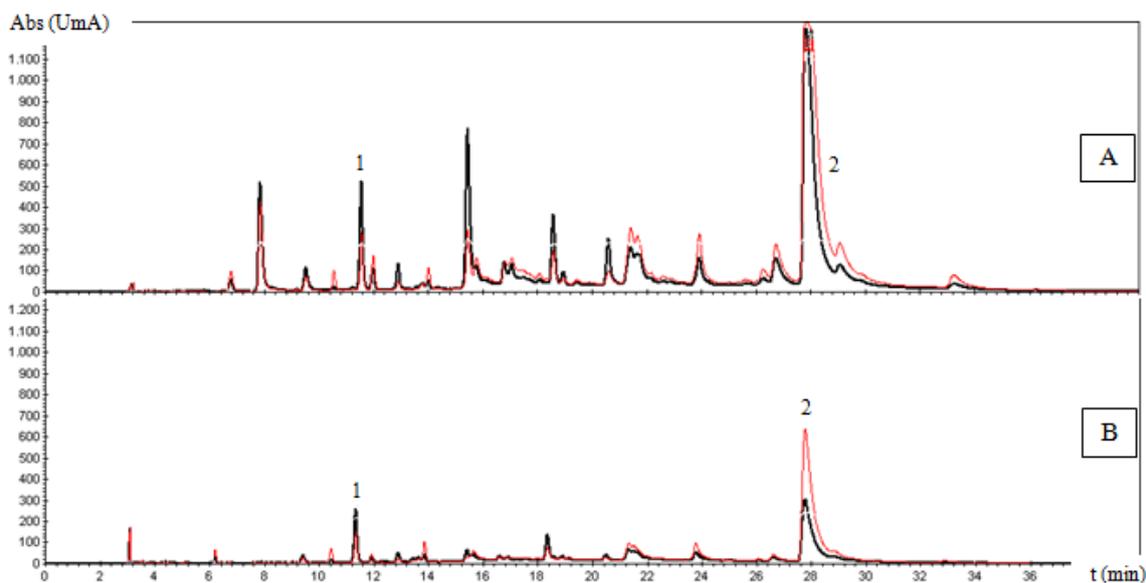


Figura 2.6. Cromatogramas monitorizados a las longitudes de onda de 271 (negro) y 252 (rojo) nm de la degradación de los taninos hidrolizables, tras la metanólisis según Sanz *et al.* (2010b) y las condiciones cromatográficas descritas por Lei *et al.* (2001), en las muestras foliares del híbrido *Castanea crenata* x *C. sativa* molidas a distintas temperaturas. A: Protocolo I (N₂ líq). B: Protocolo II (T^a_{amb}). 1: galato de metilo. 2: ácido elágico.

2.3.1.4 Modificación del procedimiento de extracción y secado de las fracciones orgánicas respecto al protocolo de referencia

Una vez establecida la mejor T^a_{con} de las muestras (-80 °C, protocolo III) y la forma de molienda más adecuada (molino criogénico, protocolo I), se puede determinar, comparando los resultados obtenidos por ambos protocolos (**Tabla 2.4**), la importancia de las otras modificaciones introducidas. Se valoró la posibilidad de reducir la cantidad de muestra y solventes, manteniendo las proporciones de ambos, de forma que todo el procedimiento fuese más sostenible desde el punto de vista ambiental y económico. Se trató de optimizar la eficiencia de extracción a través de una re-extracción de las muestras (20 h de extracción inicial + 4 h de re-extracción), una separación sólido-líquido mediante centrifugación (SORVALL RC 6 PLUS, Thermo Fisher Scientific, Osterode, Alemania) a 15000 g y -10 °C y un secado de las fracciones orgánicas en termobloque (EC 1, VLM, Bielefeld, Alemania) a 35 °C con corriente de N₂ gas. Los resultados obtenidos tras la aplicación conjunta de las modificaciones parecen indicar que el protocolo I no mejora la caracterización fenólica. Aunque la posibilidad de reducir la cantidad de tejido a extraer, presenta ventajas tales como llegar a determinar la composición fenólica en tejidos diana, cuando la finalidad sea valorar la actividad fisiológica de estos compuestos, como puede ser su participación en la formación de la barrera de defensa de las plantas contra organismos patógenos, en la que los taninos tienen una función determinante (Scalbert, 1991; Norris *et al.*, 2011), no siempre es posible llevarla a cabo, pues, como ya hemos mencionado, el contenido fenólico difiere considerablemente de unos órganos/tejidos a otros. En órganos con un metabolismo

primario muy activo, como son los amentos y las hojas, el contenido fenólico es considerablemente superior respecto al que presentan otras partes vegetales poco activas, como el grano de la castaña o la madera de las ramas como se puede observar en la **Tabla 2.6**.

Tabla 2.4. Contenido de Fenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/g de peso fresco) y Taninos Condensados (mg equivalentes de (+)-catequina/g de peso fresco) de las muestras foliares del híbrido *Castanea crenata* x *C. sativa* procesadas según los protocolos I y III (media \pm EE). * Diferencia significativa entre protocolos (ANOVA, comparación de medias, $p \leq 0.05$, $n=16$).

Protocolo	Fenoles Totales (mg EAG g _{pf} ⁻¹)	Taninos Condensados (mg EC g _{pf} ⁻¹)
I	11.42 \pm 0.069	0.1115* \pm 0.0073
III	12.13 \pm 0.68	0.1482* \pm 0.0031

Se incorpora la liofilización de muestras vegetales por ser un método de secado usado a menudo en investigación, dando por hecho que es el más adecuado para la conservación. Los resultados obtenidos en la valoración de FT no muestran diferencias estadísticamente significativas, indicando que la liofilización y reducción de las cantidades de material vegetal y solventes utilizados en la extracción fueron igual de efectivos para estos compuestos en los protocolos I y III (Tabla 2.4.) Algunos autores (Abascal *et al.*, 2005) sugieren que la liofilización conlleva la alteración de algunas sustancias, como volátiles, fenoles o carotenoides y, sin embargo, que este proceso es adecuado para preservar los TC de gran peso molecular. El menor contenido en TC obtenido para las muestras liofilizadas en este trabajo (**Tabla 2.4**) podría hacer dudar de la conveniencia de utilizar la liofilización, ya que, en principio, parece implicar una mayor degradación de estos compuestos; no obstante, aunque el procedimiento de extracción que se empleó con estos protocolos, como hemos comentado, conllevaba una menor cantidad de muestra inicial y un mayor número de pasos intermedios, quizás es más probable que esta disminución en la cantidad de TC se deba a una menor eficiencia de los fraccionamientos posteriores al análisis de los FT, al no encontrar diferencias en estos compuestos. En cuanto a los TH, Salminen (2003) obtuvo los mejores resultados con el secado mediante liofilización en hojas de abedul frente al secado al aire o en horno. Puesto que en nuestro trabajo solo se llevó a cabo una valoración cualitativa de este tipo de sustancias, no podemos comparar ambos procedimientos para este tipo de taninos.

En base a estos resultados, se decide mantener el protocolo III como el mejor, incorporando la liofilización de la muestra para su conservación a -80 °C y la molienda en N₂ líquido, ya que mostró ser más idónea (**Figura 2.1**).

2.3.1.5 Comparación del protocolo de referencia frente a otro de carácter exclusivamente enológico para muestras de duramen

La finalidad o destino de las muestras a analizar es también un aspecto a tener en cuenta, ya que en función de la aplicación que se les dé, la metodología extractiva a llevar a cabo puede ofrecer unos resultados más acordes a la realidad del futuro de las muestras en cuestión. No sólo hay que considerar el procedimiento por el cual más compuestos de interés son extraídos, como tampoco hay que olvidar lo necesario que puede llegar a ser el tener disponibles los resultados en un periodo de tiempo más o menos largo, sobre todo en procesos productivos que requieren pequeños tiempos de análisis, como pueden ser los controles de calidad realizados en distintos puntos de una cadena de producción. Un claro ejemplo de esto es la comparativa realizada en este trabajo para muestras de duramen. Por un lado, se planteó una metodología más general y rápida, como es la considerada referencia (Sanz *et al.*, 2010b) (protocolo VI), frente a una más adaptada a muestras cuyo destino es el sector enológico (Madrera *et al.*, 2010) (protocolo VII), siendo ambas metodologías protocolos de extracción fenólica para muestras de duramen con orientación enológica. La principal diferencia entre ambas es que los primeros autores proponen un protocolo más general y abierto a otro tipo de materiales vegetales, mientras que la descrita por Madrera *et al.* (2010) tiene una orientación puramente enológica, que busca la mayor aproximación posible a la extracción fenólica que realmente se da en el almacenamiento y envejecimiento de los distintos tipos de bebidas alcohólicas que usan recipientes de madera en sus procesos de elaboración. Los resultados que hemos obtenido muestran un contenido más elevado de FT (**Tabla 2.5**) y áreas mayores en los cromatogramas de los TH (**Figura 2.7**) para las muestra procesadas según el protocolo VII, debido al uso del doble de volumen de solvente de extracción inicial, a la diferente mezcla hidroalcohólica, etanol en vez de metanol, que *a priori* parece ser menos efectivo que el metanol (Bedgood *et al.*, 2005; Padda & Picha, 2007) y al elevado tiempo de extracción empleado, a pesar del mayor fraccionamiento de la muestra y la continua agitación en el protocolo de referencia. Sin embargo, sorprendentemente, el contenido en TC fue mayor en las muestras extraídas según el protocolo VI, resultado que puede ser debido a que durante periodos largos de extracción etanólica este tipo de compuestos pueden degradarse o transformarse en otros compuestos, al igual que ocurre con algunos elagitaninos (Puech *et al.*, 1999).

Tabla 2.5. Contenido de Fenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/g de peso fresco) y Taninos Condensados (mg equivalentes de (+)-catequina/g de peso fresco) de las muestras de duramen de *Castanea sativa* procesadas según los protocolos VI y VII (media \pm EE). * Diferencia significativa entre protocolos (ANOVA, comparación de medias, $p \leq 0.05$, $n=16$).

Protocolo	Fenoles Totales (mg EAG $\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$)	Taninos Condensados (mg EC $\text{g}_{\text{pf}}^{-1}$)
VI (referencia)	61.92* \pm 0.41	0.2632* \pm 0.0092
VII (enológico)	80.76* \pm 0.45	0.1532* \pm 0.0033

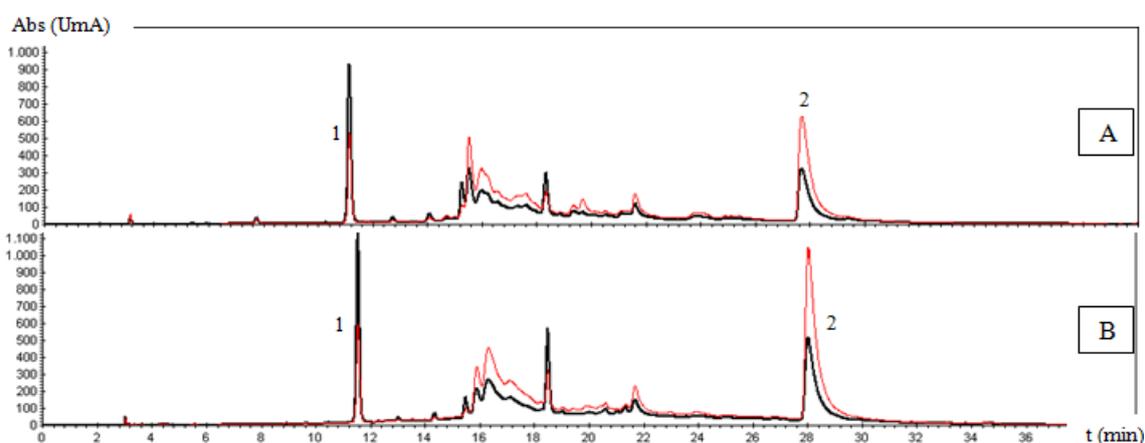


Figura 2.7. Cromatogramas monitorizados a las longitudes de onda de 271 (negro) y 252 (rojo) nm de la degradación de los taninos hidrolizables, tras la metanólisis según Sanz *et al.* (2010b) y las condiciones cromatográficas descritas por Lei *et al.* (2001), en las muestras de duramen de *Castanea sativa*. A: Protocolo VI (referencia). B: Protocolo VII (enológico). 1: galato de metilo. 2: ácido elágico.

2.3.2 Validación del método

Una vez optimizada la metodología de extracción y cuantificación de compuestos fenólicos (**Figura 2.1**), se procedió a aplicarla con éxito en los distintos órganos y/o tejidos de *C. sativa* descritos en Material y Métodos (apartado 2.2.2). En esta validación metodológica se realizó, además, la cuantificación de TH (Gts y Ets), ya que sólo se había llevado a cabo un análisis cualitativo en la optimización metodológica con hojas y duramen. Una vez establecido el rango de trabajo de las concentraciones de las muestras y estándares (GM, para la cuantificación de los Gts, y AE, para la de los Ets) usados para las rectas de calibración, se obtuvo una buena linealidad, en base a los correspondientes coeficientes de determinación (R^2). En el rango de concentración de GM, de 0.2 a 50 $\mu\text{g GM mL}^{-1}$, R^2 varió entre 0.9998 y 0.99990, y para el AE, de 0.2 a 100 $\mu\text{g AE mL}^{-1}$, R^2 varió entre 0.91 y 0.9991.

La caracterización fenólica del castaño, en base a los FT, TC y TH (Gts y Ets) se muestra en la **Tabla 2.6**.

Tabla 2.6. Fenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco), Taninos Condensados (mg equivalentes de (+)-catequina/g de peso seco) y Taninos Hidrolizables: Galotaninos (mg de galato de metilo/g de peso seco) y Elagitaninos (mg de ácido elágico/g de peso seco) en distintos órganos/tejidos de *Castanea sativa*. Los valores mostrados representan la media \pm EE (n). nd: no detectados.

Órgano/Tejido	Fenoles Totales (mg EAG g _{ps} ⁻¹)	Taninos Condensados (mg EC g _{ps} ⁻¹)	Taninos Hidrolizables	
			Galotaninos (mg GM g _{ps} ⁻¹)	Elagitaninos (mg AE g _{ps} ⁻¹)
Tronco				
Corteza exterior	101.2 \pm 3.6 (54)	0.59 \pm 0.036 (54)	9.0 \pm 0.66 (18)	6.0 \pm 0.38 (18)
Corteza interior	73.8 \pm 2.7 (54)	1.23 \pm 0.20 (54)	8.1 \pm 0.73 (18)	5.2 \pm 0.51 (18)
Albura	25.0 \pm 1.9 (54)	0.40 \pm 0.032 (54)	2.6 \pm 0.46 (18)	2.5 \pm 0.50 (18)
Duramen	76.4 \pm 3.0 (54)	0.40 \pm 0.032 (54)	10.4 \pm 1.2 (18)	9.1 \pm 1.1 (18)
Ramas				
Corteza	98.0 \pm 2.1 (36)	1.27 \pm 0.18 (36)	7.2 \pm 0.38 (12)	13.1 \pm 0.60 (12)
Madera	6.7 \pm 0.62 (36)	0.02 \pm 0.0030 (36)	0.2 \pm 0.056 (12)	1.3 \pm 0.28 (12)
Hojas	115.4 \pm 1.8 (36)	0.33 \pm 0.050 (36)	3.8 \pm 0.26 (12)	26.1 \pm 2.2 (12)
Amentos	126.5 \pm 3.8 (36)	0.51 \pm 0.073 (36)	5.5 \pm 0.45 (12)	15.0 \pm 1.7 (12)
Fruto				
Erizo	93.3 \pm 2.4 (18)	0.10 \pm 0.0046 (18)	3.3 \pm 0.25 (12)	11.9 \pm 1.2 (12)
Cáscara	56.0 \pm 0.94 (18)	2.54 \pm 0.22 (18)	3.0 \pm 0.14 (12)	3.1 \pm 0.26 (12)
Tegumento	63.6 \pm 8.7 (18)	0.16 \pm 0.025 (18)	1.8 \pm 0.25 (12)	nd (12)
Grano	1.8 \pm 0.046 (18)	0.13 \pm 0.0054 (18)	0.02 \pm 0.0049 (12)	nd (12)

El contenido en FT es el parámetro más estudiado, bien por representar el contenido total de este tipo de compuestos o por la simplicidad del ensayo para su cuantificación (Folin-Ciocalteu). Por esto, es el mejor parámetro a tomar como referencia en la comparación de los resultados obtenidos con distintas metodologías extractivas. Los valores obtenidos para el contenido de FT en los distintos órganos/tejidos de *C. sativa* analizados según la metodología optimizada en este capítulo (**Tabla 2.6**) son, en general, superiores a los resultados mostrados por otros autores (Mujić *et al.*, 2009; Sanz *et al.*, 2010b; Vázquez *et al.*, 2010; Živković *et al.*, 2010; Nazzaro *et al.*, 2012; Eichhorn *et al.*, 2017) lo que llevaría a pensar en una mayor eficiencia extractiva. No obstante, esta comparación solo puede plantearse en términos muy generales ya que no se parte de los mismos materiales exactamente y la variabilidad de la composición de los metabolitos secundarios suele ser muy amplia. En este sentido, en amentos, cáscara, tegumento y grano detectamos menores cantidades de FT en comparación con los obtenidos por Barreira *et al.* (2008), que adicionaron 50 mL de agua a 5 g de muestra manteniendo temperatura de ebullición durante 30 min. Estas diferencias podrían deberse a la diferente metodología extractiva empleada,

aparentemente más eficiente con aplicación de calor, pero también es posible que estos valores de FT sean sobreestimados, ya que a esa temperatura es posible que fenoles de gran peso molecular se degraden en unidades inferiores dando lugar a la sobrevaloración de esta caracterización. Además, otro aspecto a tener en cuenta, a la hora de comparar resultados, es el tipo de muestras. Las muestras analizadas por Barreira *et al.* (2008) son de cultivar, variedad Longal, y los resultados mostrados en este capítulo corresponden a castañas de monte bajo. En un trabajo paralelo que hemos realizado para castañas de los cultivares Chamberga y Parede, empleando la metodología aquí descrita, los resultados obtenidos para la cáscara y el tegumento del fruto fueron muy superiores, entorno a los 70 y 200 mg EAG $\text{g}_{\text{ps}}^{-1}$, respectivamente, lo que destaca la importancia y variabilidad del tejido de partida.

Los TC y TH son compuestos estructuralmente complejos, lo que dificulta tanto su análisis como la comparación de resultados obtenidos. Si además de esto, acotamos los análisis a una especie en concreto, *C. sativa* a efectos de que sean comparables las muestras de partida, las posibilidades de encontrar trabajos comparables se reducen considerablemente. Los valores obtenidos para los TC y Ets en las muestras de duramen analizadas según la metodología optimizada en este capítulo (**Tabla 2.6**) son inferiores, al contrario que para los Gts, a los obtenidos por Sanz *et al.* (2010b) para muestras de duramen de *C. sativa* secadas de forma natural durante 2 años. Živković *et al.* (2009) analizaron TC en hojas, amentos, fruto (cáscara, tegumento y grano), corteza y erizos, usando etanol/agua (1:1, v/v) como solvente de extracción, en proporción con la muestra 1:5 (m/v), y aplicando ultrasonidos (30 min a 50 Hz y 125 W), obteniendo, en general, valores inferiores a los mostrados en este capítulo, con la excepción de la corteza interior (3.1 frente a 1.23 mg EC $\text{g}_{\text{ps}}^{-1}$) y el tegumento (10.38 frente a 0.16 mg EC $\text{g}_{\text{ps}}^{-1}$). Esta considerable diferencia en TC del tegumento se reduce notablemente si consideramos los 5.25 mg EC $\text{g}_{\text{ps}}^{-1}$ que hemos obtenido para castañas de cultivar Parede en otro trabajo realizado paralelamente.

Los resultados obtenidos, con la optimización metodológica de la extracción y cuantificación de los compuestos fenólicos realizada, permiten considerar alcanzado el objetivo principal planteado para este capítulo, desarrollar una metodología apropiada para la valoración fenólica en diferentes órganos/tejidos de *C. sativa*, siendo susceptible de aplicar con otras especies vegetales. La metodología desarrollada permitió la caracterización fenólica del castaño, obteniendo un perfil general, en base a los FT, TC y TH (Gts y Ets), y relacionarlo con las respuestas fisiológicas de la planta frente a determinadas situaciones bióticas o abióticas, además de obtener una importante información de cara a la posible extracción de compuestos fenólicos de esta especie y su aplicación en multitud de sectores. Una primera valoración sobre los resultados obtenidos pone de manifiesto la gran variación en el contenido de las distintas familias de los compuestos fenólicos analizados, así como, en general, la mayor presencia de éstos en los órganos/tejidos de *C. sativa* más expuestos al entorno, al contrario que en aquellos más especializados, como los estructurales o de reserva.

Actuales y futuros trabajos de nuestro grupo se centran en afinar más la caracterización fenólica de diferentes muestras vegetales, poniendo a punto metodologías analíticas que permitan la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos específicos de interés, en función de diferentes finalidades (fisiológicas, revalorización de productos de desecho o aplicaciones industriales). Por esto, nuestras líneas de trabajo se centran en la cromatografía líquida y la espectrometría de masas (LC/MS), asociación imprescindible para este fin (Cavaliere *et al.* 2010; Sandhu & Gu, 2010; Fischer *et al.* 2011; Santos *et al.* 2011; García-Estévez *et al.* 2012; Romani *et al.* 2012; Santos *et al.* 2013; Wu *et al.*, 2013; Brito *et al.* 2014; Linga & Savithramma, 2014; Lin *et al.*, 2015; Zunjar *et al.*, 2015; Podolak *et al.*, 2016; Sobeh *et al.*, 2016; Allai *et al.*, 2017; Ben *et al.*, 2017).

2.4 BIBLIOGRAFÍA

Abascal, K.; Ganora, L. & Yarnell, E. (2005). The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytotherapy Research*, 19 (8): 655-660.

Akula, R. & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6 (11): 1720-1731.

Al Harun, M. A. Y.; Johnson, J.; Uddin, M. N. & Robinson, R. W. (2015). Identification and phytotoxicity assessment of phenolic compounds in *Chrysanthemoides monilifera* subsp. *monilifera* (boneseed). *PLoS ONE*, 10 (10), e0139992: 1-19.

Allai, L.; Karym, E. L.; Amiri, B. E.; Nasser, B.; Essamad, A., Terzioğlu, P.; Ertas, A. & Öztürk, M. (2017). Evaluation of antioxidant activity and phenolic composition of *Opuntia ficus-indica* Cladodes collected from moroccan mettat region. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 12 (1): 105-117.

Arruda, R. L.; Paz, A. T. S.; Bara, M. T. F.; Côrtes, M. V. D. C. B.; Filippi, M. C. C. D. & Conceição, E. C. D. (2016). An approach on phytoalexins: function, characterization and biosynthesis in plants of the family *Poaceae*. *Ciência Rural*, Santa Maria, 46 (7): 1206-1216.

Barreira, J. C.; Ferreira, I. C.; Oliveira, M. B. P. & Pereira, J. A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food chemistry*, 107 (3): 1106-1113.

Barbosa-Pereira, L.; Angulo, I.; Paseiro-Losada, P. & Cruz, J. M. (2013). Phenolic profile and antioxidant properties of a crude extract obtained from a brewery waste stream. *Food Research International*, 51 (2): 663-669.

Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57 (3): 101-110.

Bedgood, D. R.; Bishop, A. G.; Prenzler, P. D. & Robards, K. (2005). Analytical approaches to the determination of simple biophenols in forest trees such as *Acer* (maple), *Betula* (birch), *Coniferus*, *Eucalyptus*, *Juniperus* (cedar), *Picea* (spruce) and *Quercus* (oak). *Analyst*, 130: 809–823.

Ben, R.; Hamed, A. I.; Mahalel, U. A.; Al-Ayed, A. S.; Kowalczyk, M.; Moldoch, J.; Oleszek, W. & Stochmal, A. (2017). Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and DFT. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (3): 512-529.

- Bobinaitė, R.; Viškelis, P. & Venskutonis, P. R. (2012). Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132 (3): 1495-1501.
- Brito, A.; Ramirez, J. E.; Areche, C.; Sepúlveda, B. & Simirgiotis, M. J. (2014). HPLC-UV-MS Profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. *Molecules*, 19 (11): 17400-17421.
- Cadahía, E.; Muñoz, L.; Fernández de Simón, B. & García-Vallejo, M. C. (2001). Changes in low molecular weight phenolic compounds in Spanish, French, and American oak woods during natural seasoning and toasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1790-1798.
- Cadahía, E.; Conde, E.; García-Vallejo, M. C. & Fernández de Simón, B. (1996). Gel permeation chromatographic study of the molecular weight distribution of tannins in the wood, bark and leaves of *Eucalyptus* spp. *Chromatographia*, 42 (1/2): 95-100.
- Canas, S.; Belchior, A. P.; Falcão, A.; Gonçalves, J. A.; Spranger, M. I. & Bruno-de-Sousa, R. (2007). Effect of heat treatment on the thermal and chemical modifications of oak and chestnut wood used in brandy ageing. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 22 (1): 5-14.
- Cavaliere, C.; Foglia, P.; Marini, F.; Samperi, R.; Antonacci, D. & Laganà, A. (2010). The interactive effects of irrigation, nitrogen fertilisation rate, delayed harvest and storage on the polyphenol content in red grape (*Vitis vinifera*) berries: A factorial experimental design. *Food Chemistry*, 122 (4): 1176-1184.
- Cheng, F. & Cheng, Z. (2015). Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1020: 1-16.
- Cooper, W. R. & Rieske, L. K. (2008). Differential responses in American (*Castanea dentata* Marshall) and Chinese (*C. mollissima* Blume) chestnut (*Fagales: Fagaceae*) to foliar application of jasmonic acid. *Chemoecology*, 18: 121–127.
- De Vasconcelos, M. C. B. M.; Bennet, R. N.; Quideaub, S.; Jacquet, R.; Rosa, E. & Ferreira-Cardoso, J. (2010). Evaluating the potential of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruit pericarp and integument as a source of tocopherols, pigments and polyphenols. *Industrial Crops and Products*, 31: 301–311.
- De Vasconcelos, M. C. B. M.; Bennet, R. N.; Rosa, E. & Ferreira-Cardoso, J. (2007). Primary and secondary metabolite composition of kernels from three cultivars of portuguese chestnut (*Castanea sativa* Mill.) at different stages of industrial transformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3508-3516.
- Demirkesen, I.; Mert, B.; Sumnu, G. & Sahin, S. (2010). Utilization of chestnut flour in gluten-free bread formulations. *Journal of Food Engineering*, 101 (3): 329-336.

- Doussot, F.; Jéso, B.; Quideau, S. & Pardon, P. (2002). Extractives content in cooperage oak wood during natural seasoning and toasting; influence of tree species, geographic location and single-tree effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (21): 5955-5961.
- Eichhorn, S.; Erfurt, S.; Hofmann, T.; Seegmueller, S.; Németh, R. & Hapla, F. (2017). Determination of the phenolic extractive content in sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood. *Wood Research*, 62 (2): 181-196.
- Fernández de Simón, B.; Sanz, M.; Cadahía, E.; Poveda, P. & Broto, M. (2006). Chemical characterization of oak heartwood from Spanish forests of *Quercus pyrenaica* (Wild.). Ellagitannins, low molecular weight phenolic, and volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (21): 8314-8321.
- Fischer, U. A.; Carle, R. & Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. *Food Chemistry*, 127: 807-821.
- Folin, O. & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptopham determinations on proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 73 (2): 627-650.
- Freitas, J. B. & Naves, M. M. V. (2010). Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. *Revista de Nutrição*, 23 (2): 269-279.
- Fürstenberg-Hägg, J.; Zagrobelny, M. & Bak, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (5): 10242-10297.
- García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M. T.; Rivas-Gonzalo, J. C. & Alcalde-Eon, C. (2012). Validation of a mass spectrometry method to quantify oak ellagitannins in wine samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (6): 1373-1379.
- García-Mateos, R. & Pérez-Leal, R. (2003). Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 9 (1): 5-10.
- Gelsomino, A.; Araniti, F.; Lupini, A.; Princi, G.; Petrovičová, B. & Abenavoli, M.A. (2015). Phenolic acids in plant-soil interactions: a microcosm experiment. *Journal of Allelochemical Interactions*, 1 (1): 25-38.
- Häkkinen, S. (2000). Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. Doctoral dissertation, University of Kuopio (Finland).
- Hartzfeld, P. W.; Forkner, R.; Hunter, M. D. & Hagerman, A. E. (2002). Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (7): 1785-1790.
- He, H.; Wang, H.; Fang, C.; Wu, H.; Guo, X.; Liu, C.; Lin, Z. & Lin, W. (2012). Barnyard grass stress up regulates the biosynthesis of phenolic compounds in allelopathic rice. *Journal of Plant Physiology*, 169 (17): 1747-1753.

Helmja, K.; Vaher, M.; Gorbatšova, J. & Kaljurand, M. (2007). Characterization of bioactive compounds contained in vegetables of the *Solanaceae* family by capillary electrophoresis. Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Chemistry, 56 (4): 172–186.

Inoue, K. H. & Hagerman, A. E. (1988). Determination of gallotannin with rhodanine. Analytical Biochemistry, 169 (2): 363-369.

Koch, G. (2008). Discolouration of wood in the living tree and during processing. En: Conference COST E53, Delft (Países Bajos): 11-18.

Kula, E. & Lazorič, M. (2015). Comparison of Myriapoda in beech and spruce forests. Journal of Forest Science, 61 (7): 306–314.

Kumar, L.; Mahatma, M. K.; Kalariya, K. A.; Bishi, S. K. & Mann, A. (2014). Plant phenolics: important bio-weapon against pathogens and insect herbivores. Popular Kheti, 2 (3): 149-152.

Lampire, O.; Mila, I.; Raminosoa, M.; Michon, V.; Du Penhoat, C. H.; Faucheur, N.; Laprevote, O. & Scalbert, A. (1998). Polyphenols isolated from the bark of *Castanea sativa* Mill. Chemical structures and auto-association. Phytochemistry, 49 (2): 623-631.

Lei, Z.; Jervis, J. & Helm, R. F. (2001). Use of methanolysis for the determination of total ellagic and gallic acid contents of wood and food products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49 (3): 1165-1168.

Leitao, C.; Marchioni, E.; Bergaentzlé, M.; Zhao, M.; Didierjean, L.; Taidi, B. & Ennahar, S. (2011). Effects of processing steps on the phenolic content and antioxidant activity of beer. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (4): 1249-1255.

Li, Z. H.; Wang, Q.; Ruan, X.; Pan, C. D. & Jiang, D. A. (2010). Phenolics and plant allelopathy. Molecules, 15 (12): 8933-8952.

Lin, Y.; Xu, W.; Huang, M.; Xu, W.; Li, H.; Ye, M.; Xun, Z. & Chu, K. (2015). Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids, flavonoids and iridoid glycosides in Yinhua Kanggan tablet by UPLC-QqQ-MS/MS. Molecules, 20 (7): 12209-12228.

Linga, M. & Savithamma, N. (2014). Isolation and identification of phenolic compounds by HPLC and Electrospray Ionization Mass Spectrometry of *Svensonia Hyderbadensis* - A rare medicinal plant taxon. International Journal of Drug Development and Research, 6 (1): 199-207.

Madrera, R. R.; Valles, B. S.; Garcia, Y. D.; Argüelles, P. d. V. & Lobo, A. P. (2010). Alternative woods for aging distillates -an insight into their phenolic profiles and antioxidant activities. Food Science Biotechnology, 19 (4): 1129-1134.

- Mujić, I.; Dudaš, S.; Živković, J.; Tomin, J.; Zeković, Z.; Alibabić, V.; Jukić, H. & Šahinović, R. (2009). Determination of Total Phenolic Compounds in Cultivars of *Castanea sativa* Mill. In International Workshop on Chestnut Management in Mediterranean Countries-Problems and Prospects 815: 63-68.
- Munekata, P. E. S.; Franco, D.; Trindade, M. A.; & Lorenzo, J. M. (2016). Characterization of phenolic composition in chestnut leaves and beer residue by LC-DAD-ESI-MS. *LWT-Food Science and Technology*, 68: 52-58.
- Nazzaro, M.; Mottola, M. V.; La Cara, F.; Del Monaco, G.; Aquino, R. P. & Volpe, M. G. (2012). Extraction and characterization of biomolecules from agricultural wastes. *Chemical Engineering*, 27: 331-336.
- Norris, C. E.; Preston, C. M.; Hogg, K. E. & Titus, B. D. (2011). The influence of condensed tannin structure on rate of microbial mineralization and reactivity to chemical assays. *Journal of Chemical Ecology*, 37 (3): 311–319.
- Ockels, F. S.; Eyles, A. & McPherson, B. A. (2007). Phenolic chemistry of coast live oak response to *Phytophthora ramorum* infection. *Journal of Chemical Ecology*, 33 (9): 1721-1732.
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (2011). Compendium of International Methods of Analysis, Method OIV-MA-AS2-10 R2009 1 (extract of ISO 78-2:1999 Standards).
- Padda, M. S. & Picha, D. H. (2007). Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) roots. *Journal of Food Science*, 72 (7): C412-C416.
- Podolak, I.; Olech, M.; Galanty, A.; Załuski, D.; Grabowska, K.; Sobolewska, D., Michalik, M. & Nowak, R. (2016). Flavonoid and phenolic acid profile by LC-MS/MS and biological activity of crude extracts from *Chenopodium hybridum* aerial parts. *Natural Product Research*, 30 (15): 1766-1770.
- Puech, J. L.; Mertz, C.; Michon, V.; Le Guernevé, C.; Doco, T. & Hervé du Penhoat, C. (1999). Evolution of castalagin and vescalagin in ethanol solutions. Identification of new derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (5): 2060-2066.
- Rehman, F.; Khan, F. A. & Badruddin, S. M. A. (2012). Role of phenolics in plant defense against insect herbivory. En *Chemistry of Phytopotentials: Health, Energy and Environmental Perspectives*. Khemani, L. D.; Srivastava, M. M. & Srivastava, S. (Eds.), Springer (Ed.): 309-313.
- Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000: 657-691.

Romani, A.; Campo, M. & Pinelli, P. (2012). HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. *Food Chemistry*, 130 (1): 214-221.

Salminen, J. P. (2003). Effects of sample drying and storage, and choice of extraction solvent and analysis method on the yield of birch leaf hydrolyzable tannins. *Journal of Chemical Ecology*, 29 (6): 1289-1305.

Sánchez-Sánchez, H. & Morquecho-Contreras, A. (2017). Chemical plant defense against herbivores. En: *Herbivores*, InTech (Ed.): 3-28.

Sandhu, A. K. & Gu, L. (2010). Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (muscadine grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (8): 4681-4692.

Santos, S. A.; Freire, C. S.; Domingues, M. R. M.; Silvestre, A. J. & Neto, C. P. (2011). Characterization of phenolic components in polar extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. bark by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (17): 9386-9393.

Santos, S. A.; Villaverde, J. J.; Sousa, A. F.; Coelho, J. F.; Neto, C. P. & Silvestre, A. J. (2013). Phenolic composition and antioxidant activity of industrial cork by-products. *Industrial Crops and Products*, 47, 262-269.

Sanz, M.; Cadahía, E.; Esteruelas, E.; Muñoz, A. M.; Fernández de Simón, B.; Hernández, T. & Estrella, I. (2010a). Phenolic compounds in cherry (*Prunus avium*) heartwood with a view to their use in cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (8): 4907-4914.

Sanz, M.; Cadahía, E.; Esteruelas, E.; Muñoz, A. M.; Fernández de Simón, B.; Hernández, T. & Estrella, I. (2010b). Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (17): 9631–9640.

Sanz, M.; Simón, B. F.; Cadahía, E.; Esteruelas, E.; Muñoz, A. M.; Hernández, T.; Estrella, C. & Pinto, E. (2012). LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. *Journal of Mass Spectrometry*, 47 (7): 905-918.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30 (12): 3875-3883.

Schofield, P.; Mbugua, D. M. & Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91 (1-2): 21-40.

- Serrano, J.; Puupponen-Pimiä, R.; Dauer, A.; Aura, A-M. & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53 (Supl. 2): S310–S329.
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16 (3): 144-158.
- Sobeh, M.; ElHawary, E.; Peixoto, H.; Labib, R. M.; Handoussa, H.; Swilam, N.; El-Khatib, A. H.; Sharapov, F.; Mohamed, T.; Krstin, S.; Linscheid, M. W.; Singab, A. N.; Wink, M. & Linscheid, M. W. (2016). Identification of phenolic secondary metabolites from *Schotia brachypetala* Sond. (Fabaceae) and demonstration of their antioxidant activities in *Caenorhabditis elegans*. *PeerJ*, 4, e2404.
- Sochor, J.; Zitka, O.; Skutkova, H.; Pavlik, D.; Babula, P.; Krska, B.; Horna, A.; Adam, V.; Provaznik, I. & Kizek, R. (2010). Content of phenolic compounds and antioxidant capacity in fruits of apricot genotypes. *Molecules*, 15: 6285-6305.
- Sun, B. S.; Ricardo-da-Silva, J. M. & Spranger, M. I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (10): 4267-4274.
- Vázquez, G.; Fernández-Agulló, A.; Freire, M. S.; Antorrena, G. & González-Álvarez, J. (2010). Chestnut bur extracts as antioxidants: optimization of the extraction stage. *WIT Transactions on Ecology and the Environment, Waste Management and the Environment V*, 140: 155-165.
- Vázquez, G.; González-Alvarez, J.; Santos, J.; Freire, M. S. & Antorrena, G. (2009). Evaluation of potential applications for chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 29: 364–370.
- White, B. L.; Howard, L. R. & Prior, R. L. (2010). Release of bound procyanidins from cranberry pomace by alkaline hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (13): 7572–7579.
- Wu, X.; Ding, W.; Zhong, J.; Wan, J. & Xie, Z. (2013). Simultaneous qualitative and quantitative determination of phenolic compounds in *Aloe barbadensis* Mill by liquid chromatography–mass spectrometry-ion trap-time-of-flight and high performance liquid chromatography-diode array detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 80: 94-106.
- Yang, X. Q. & Guido, J. E. (2016). An overview of plant phenolics measurement. *Advances In Food Technology and Nutritional Sciences*, SE (2): S34-S44.
- Živković, J.; Mujić, I.; Nikolić, G.; Vidović, S. & Mujić, A. (2009). Extraction and analysis of condensed tannins in *Castanea sativa* Mill. *Journal of Central European Agriculture*, 10 (3): 283-287.

Živković, J.; Zeković, Z.; Mujić, I.; Vidović, S.; Cvetković, D.; Lepojević, Ž.; Nikolić, G. & Trutić, N. (2010). Scavenging capacity of superoxide radical and screening of antimicrobial activity of *Castanea sativa* Mill. extracts. *Czech Journal of Food Sciences*, 28 (1): 61-68.

Zunjar, V.; Mammen, D. & Trivedi, B. M. (2015). Antioxidant activities and phenolics profiling of different parts of *Carica papaya* by LCMS-MS. *Natural Product Research*, 29 (22): 2097-2099.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3

Influencia del ecosistema en el desarrollo de *Castanea sativa* Miller

3.1 INTRODUCCIÓN

Uno de los factores que determina la producción vegetal es el entorno en que se desarrolla la especie o especies. El crecimiento y desarrollo de una planta depende, entre otras características, de las orográficas del lugar (ubicación espacial, principalmente latitud y altitud, orientación y pendiente del terreno), las cuales conllevan ciertas modificaciones climáticas, que a su vez influyen en algunas propiedades edáficas.

Para poder discernir qué condiciones edafoclimáticas son las más apropiadas para el desarrollo vegetal, lo primero a tener en cuenta es establecer algún tipo de parámetro que cuantifique y clasifique la productividad vegetal. “La calidad de estación (CE) se refiere a la capacidad de un lugar determinado para el crecimiento de los árboles y/o cualquier otra vegetación, denominándose también productividad forestal” (Álvarez *et al.*, 2004). Según estos autores, para evitar tener que llegar al final del ciclo productivo para cuantificar directamente esta productividad, en cuanto a volumen de madera se refiere, se utilizan indicadores de productividad potencial, considerando tanto factores intrínsecos (evolución con la edad de alguna variable de masa) como factores extrínsecos a la masa (clima, suelo, vegetación, etc.). Álvarez *et al.* (2004) consideran que los primeros factores proporcionan, generalmente, mejores resultados y, dentro de ellos, la altura dominante se ha mostrado como el más adecuado por su baja dependencia de la densidad de la masa y de los tratamientos silvícolas habituales. Así, la CE se suele expresar mediante el índice de sitio (IS), que es el valor de la altura dominante de la masa forestal a una determinada edad de referencia. En especies forestales, este parámetro, el IS, es uno de los más usados para cuantificar la calidad de una masa forestal, para una especie en concreto y en una determinada zona y, a pesar de no estar estandarizado, ya que existen diferentes formas de calcularlo, es muy útil para poder tomar decisiones de gestión silvícola (Curt *et al.*, 2001; Packalén *et al.*, 2011; Bošel’*a et al.*, 2013; Codilan *et al.*, 2015) y ha sido ampliamente utilizado en la caracterización de masas forestales de castaño (Cabrera & Ochoa, 1997; Manetti *et al.*, 2001; Zlatanov *et al.*, 2012; Menéndez-Miguélez *et al.*, 2016). También resulta interesante para adscribir un valor global que caracterice a una ubicación concreta en cuanto a idoneidad para desarrollarse una especie y en ese sentido fue utilizado para este trabajo.

En los proyectos entorno al castaño desarrollados en el Programa de Investigación Forestal (PIF) SERIDA-CETEMAS del Principado de Asturias (noroeste de España) se realizó una selección de masas de monte bajo de *C. sativa* para la instalación de parcelas permanentes representativas de esta especie en las masas forestales en esta región. Son parcelas circulares de 15 m de radio, que se seleccionaron

teniendo en cuenta la edad de los castaños, la altura dominante y la densidad de la masa forestal, con la finalidad de obtener tablas de producción de densidad variable (Menéndez-Miguélez *et al.*, 2016).

Pero además de la producción, en la actual situación global de cambio climático, se hace necesario el estudio y valoración del efecto que tendrá sobre las especies vegetales estas alteraciones ambientales que se están produciendo. Gomes-Laranjo *et al.* (2012) recogen el hecho de que el impacto del cambio climático puede ser más significativo en los países mediterráneos, debido a que las principales consecuencias serán un aumento en la temperatura y una disminución en la disponibilidad de agua. A pesar de esto, *C. sativa* parece tener potencial para adaptarse a estas diferentes condiciones climáticas y eventualmente al futuro contexto climático (Pereira-Lorenzo *et al.*, 2010). Gallardo-Lancho (2001) sugiere aumentar la superficie de los bosques de castaños en el oeste de España, pero destaca que, en el norte, la temperatura media anual y la permeabilidad del suelo serán los factores limitantes más importantes, mientras que en el sur serán la evapotranspiración en verano y el almacenamiento de humedad del suelo. Los análisis de los datos climáticos registrados para el Principado de Asturias (Anadón & Roqueñi, 2009; González & Anadón, 2011) muestran una ligera disminución de la precipitación anual, siendo esta mínima en invierno y primavera, y aumentando en otoño, y un claro proceso de calentamiento, con un mayor aumento de la temperatura durante primavera y verano y una ligera disminución en otoño. Estos análisis también muestran la continuidad de estas tendencias para el periodo 2010–2100, previendo una reducción en las precipitaciones y un aumento en la temperatura media, con cambios más importantes en verano, de mayor intensidad en los extremos occidental y oriental del Principado de Asturias.

La flora de un entorno, además de la imagen estática que resulta de caracterizar florísticamente la zona, puede aportar un histórico de información medioambiental relacionada directamente con las especies presentes, en especial con aquellas con largos periodos de vida, como son los árboles. El que ciertas especies vegetales estén presentes en unas zonas u otras depende en gran medida de sus requerimientos climáticos y edáficos. El carácter bioindicador de estas especies complementa de una forma temporal más amplia la información climática registrada en cortos periodos de tiempo, o la edáfica obtenida puntualmente. El análisis e interpretación de un inventario florístico permite clasificar las comunidades vegetales presentes en las masas objeto de estudio y determinar, en base a estas, con qué tipo de bosques se corresponden según los hábitats forestales de interés comunitario existentes. En el Principado de Asturias, estos hábitats fueron caracterizados por Díaz (2010), según el “Manual de interpretación de los hábitats de la Unión Europea” (SEN, 2006) y el orden establecido por el código Natura 2000 (Directiva 92/43/CEE), teniendo en cuenta aspectos ecológicos, fitosociológicos, biogeográficos y bioclimáticos. Las masas de castaño repartidas por toda Asturias se podrían incluir en la clasificación de Bosques de *Castanea sativa* (Código Natura 2000: 9260), que, si bien no cumplen totalmente la definición establecida en la Directiva 92/43/CEE, si se pueden considerar como el desarrollo de antiguas plantaciones que

tienden a un estado natural si se tiene en cuenta el sotobosque, siendo bosques dominados por castaños *Castanea sativa*, supra-mediterráneos y submediterráneos. Estos castaños también se encuentran dominando carbayedas con abedules, arces y fresnos, y frecuentemente son implantados y favorecidos en Robledales galaico-portugueses con *Quercus robur* y *Quercus pyrenaica* (Cód. Nat. 2000: 9260). Aunque lo habitual de los castaños asturianos es incluirlos dentro del hábitat Bosques mediterráneos caducifolios (Cód. Nat. 2000: 92), también se pueden encontrar en Bosques de la Europa templada (Cód. Nat. 2000: 91), formando parte de *Hayedos acidófilos atlánticos con sotobosque de Ilex y a veces de Taxus* (Quercinión robori-petraeae o Ilici-Fagenion) (Cód. Nat. 2000: 9120), y también en Bosques de laderas, desprendimientos o barrancos del *Tilio-Acerion* (Cód. Nat. 2000: 9180).

Uno de los aspectos importantes que condicionan el hábitat son las propiedades físico-químicas de los suelos, ya que influyen en aspectos tan fundamentales como la nutrición de las plantas. Así, los cambios producidos a nivel edáfico influirán en el crecimiento y desarrollo vegetal. Cualquier variación que se produzca en el suelo implicará una adaptación de la planta a estas nuevas condiciones. Las condiciones climáticas, fundamentalmente precipitaciones y temperaturas, son unas de las principales causantes de los cambios edáficos. De forma más o menos directa, el evidente cambio climático global que estamos teniendo, con largos periodos de sequía o lluvias torrenciales, afecta a los suelos erosionándolos y empobreciéndolos. Otros cambios de menor intensidad también causan alteraciones notorias a nivel edáfico. A este nivel, los microorganismos son una de las comunidades más afectadas por las variaciones climáticas producidas (Castro *et al.*, 2010; Evans & Wallenstein, 2014; Docherty *et al.*, 2015), con la repercusión correspondiente dada su actividad en la degradación y transformación de la materia orgánica que enriquece los suelos. El crecimiento y desarrollo de las plantas depende de que sus necesidades sean cubiertas por los nutrientes presentes en el suelo, ya que no tienen capacidad de desplazamiento. Estos nutrientes, en las condiciones adecuadas de asimilación, pasan a formar parte de la planta distribuyéndose y acumulándose en aquellos órganos o tejidos que los requieran. Por ser de los órganos más activos, las hojas son un buen indicador del estado nutricional (Portela & Louzada, 2005). Un análisis elemental foliar da idea de las deficiencias o excesos respecto a la nutrición mineral. No obstante, algún órgano, como el tronco, puede actuar como reservorio, por lo que también tiene un papel importante en su gestión (DeWalle *et al.*, 1991; Hietz *et al.*, 2015), siendo la translocación de estos elementos un aspecto complejo difícil de determinar y explicar. De entre estos procesos, el más conocido es la migración de ciertos elementos de los órganos o tejidos caducos, como pueden ser las hojas de las especies caducifolias, a los permanentes y activos, como puede ser el cámbium (Andrews *et al.*, 1999), pero también está bastante estudiado el movimiento elemental que se produce en los troncos de los árboles, y en el que destaca la gran movilidad de ciertos elementos hacia la albura, tejido más activo donde se observa una diferente acumulación de estos con respecto al duramen (Meerts, 2002; Hevia *et al.*, 2018).

El entorno del árbol modifica el estatus nutricional, por condicionar la disponibilidad de los nutrientes minerales y por la gran influencia que tiene sobre la actividad fotosintética, y por tanto el potencial de crecimiento, directamente relacionado con estos factores, pero, además, juega un papel importante sobre el metabolismo secundario. Relacionar directamente parámetros edafoclimáticos con el contenido fenólico no es sencillo, a pesar de que en algunos trabajos se mencione (Bezerra *et al.*, 2013), dada la gran complejidad de su metabolismo, y por estar influenciado por multitud de factores externos. Sin embargo, indirectamente si se encuentra relación entre el contenido fenólico en los tejidos y factores tales como el clima o la composición edáfica, que influyen directamente en el desarrollo vegetal, desencadenando complejos procesos bioquímicos en la planta capaces de generar compuestos en respuesta a estas alteraciones externas. El perfil fenólico varía dependiendo de la capacidad y necesidad de cada planta para responder a los factores ambientales, tanto abióticos como bióticos (Samanta *et al.*, 2011). Estas variaciones son más en cantidad dentro de un mismo tejido y en tipo de compuestos entre tejidos y especies (Kraus *et al.*, 2003). Estos compuestos deben su importancia a que pueden actuar como sustancias alelopáticas (Li *et al.*, 2010; He *et al.*, 2012; Al Harun *et al.*, 2015; Cheng & Cheng, 2015; Gelsomino *et al.*, 2015), fitoalexinas (García-Mateos & Pérez-Leal, 2003; Arruda *et al.*, 2016), filtros de radiación ultravioleta (Mahdavian *et al.*, 2008; Ramya & Balakrishnan, 2013; Inostroza-Blancheteau *et al.*, 2014), repelentes, disuasorios o tóxicos para herbívoros (Rehman *et al.*, 2012; Fürstenberg-Hägg *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014; Kula & Lazorík, 2015; Sánchez-Sánchez & Morquecho-Contreras, 2017) o contribuir a la pigmentación de ciertas partes de la planta (Iwashina, 2003; Tanaka *et al.*, 2008), haciéndola más atractiva para los insectos, favoreciendo de esta forma la polinización y la distribución de sus semillas. Dada la versatilidad funcional de estos compuestos, no es posible asignar un mayor o menor contenido total a una situación determinada por lo que se hace necesario entender qué factores externos pueden influir en su equilibrio. Aspectos a tener en cuenta a la hora de comparar distintos trabajos, ya que debido a estas influencias los resultados que se obtienen pueden ser, no sólo distintos, sino parecer incluso contradictorios. En general, las modificaciones producidas en el entorno de la planta la pueden llevar a diferentes situaciones de estrés, afectando a su desarrollo o producción, y, ante estas situaciones, responden activando el metabolismo fenólico, sintetizando estos compuestos para intentar reducir los efectos negativos de las nuevas condiciones (Dixon & Paiva, 1995; Abreu & Mazzafera, 2005; Selmar, 2008; Akula & Ravishankar, 2011; Selmar, 2013). Pero, sin embargo, en otros casos las plantas muestran menores contenidos fenólicos bajo condiciones de estrés (Larsson *et al.*, 1986; Amarowicz *et al.*, 2010; Król *et al.*, 2014; Moharramnejad *et al.*, 2015).

La importancia de estos compuestos en relación a la resistencia a ciertos organismos patógenos se recoge en varios trabajos (Beckman, 2000; Panjehkeh *et al.*, 2010; Dinis *et al.*, 2011; Oßwald *et al.*, 2014) y en concreto formarían parte de la defensa frente a uno de los patógenos más importantes del castaño en nuestra región, el hongo *Cryphonectria parasitica*, causante de la enfermedad conocida como chancro,

ante el que el árbol reacciona con la formación de una barrera en la peridermis de la que forman parte células acumuladoras de fenoles, como ocurre en la respuesta a muchos patógenos ante los que la planta forma una barrera de defensa (Beckman, 2000). Pero los fenoles no sólo actúan frente este tipo de organismos huéspedes de la planta *in vivo*, sino que también tienen un papel importante frente a organismos degradadores de la madera (Peraza, 2001; Capuz, 2005). La durabilidad natural de la madera se define como la resistencia intrínseca de esta frente a las degradaciones producidas por agentes destructores de la misma (hongos cromógenos y de pudrición o insectos xilófagos de ciclo larvario) (Peraza, 2001), por lo que la mayor durabilidad que los fenoles confieren a la madera es de especial interés para la industria transformadora, siendo uno de los aspectos fundamentales y que le confiere valor añadido para diferentes usos. La durabilidad de la madera es debida a la presencia de compuestos químicos que dificultan la acción de los agentes degradadores (Peraza, 2001; Capuz, 2005). Así, por ejemplo, ciertos fenoles determinan la resistencia a determinados patógenos (Luck *et al.*, 1994; Mila *et al.*, 1996) y, por tanto, una concentración alta de estos compuestos en la materia prima resulta favorable. No obstante, estos compuestos son los que se eliminan en mayor proporción durante el proceso de secado de la madera (Fernández de Simón & Cadahía, 2007) y, por ello, se hace necesario evaluar en los diferentes tratamientos que esta pueda recibir el grado de mantenimiento de la durabilidad y determinar su relación con la concentración de estos compuestos en el producto procesado.

Por tanto, tanto *in vivo*, para una mejor calidad de desarrollo, como a nivel industrial, obteniendo productos madereros más durables, el contenido fenólico es de suma importancia en la productividad vegetal, en base a lo cual el objetivo planteado en este capítulo es valorar el efecto de las condiciones edafoclimáticas en la composición fenólica de los tejidos de interés y, por ende, en la calidad de los productos maderables y no maderables obtenidos del castaño. Para ello se seleccionaron, dentro de la red de parcelas permanentes de monte bajo de *C. sativa* del Principado de Asturias ya mencionadas, dos zonas contrastantes en cuanto a la calidad de sus castaños y separadas geográficamente.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 Zonas de estudio: características y productividad

Las dos zonas seleccionadas para estos estudios fueron los montes de El Engertal, en el municipio de Allande (occidente asturiano), y Allende, en el municipio de Caso (oriente asturiano). Estas dos ubicaciones se seleccionaron por su separación geográfica, occidente (Allande) y oriente (Caso) asturiano (**Figura 3.1**), y diferente CE en base a Cabrera & Ochoa (1997), que establecieron cinco clases de calidad en función de la altura dominante (I: < 16 m; II: 16 m; III: 19 m; IV: 22 m; V: > 22 m) a la edad de referencia de 30 años, asignando una CE para las parcelas seleccionadas

suficientemente diferentes como para considerar la productividad de sus castaños también distinta, CE II para Allande y CE IV para Caso. En cada monte se seleccionaron 3 parcelas con las características mencionadas en la Introducción, tratando de representar la máxima variabilidad de cada zona de estudio.

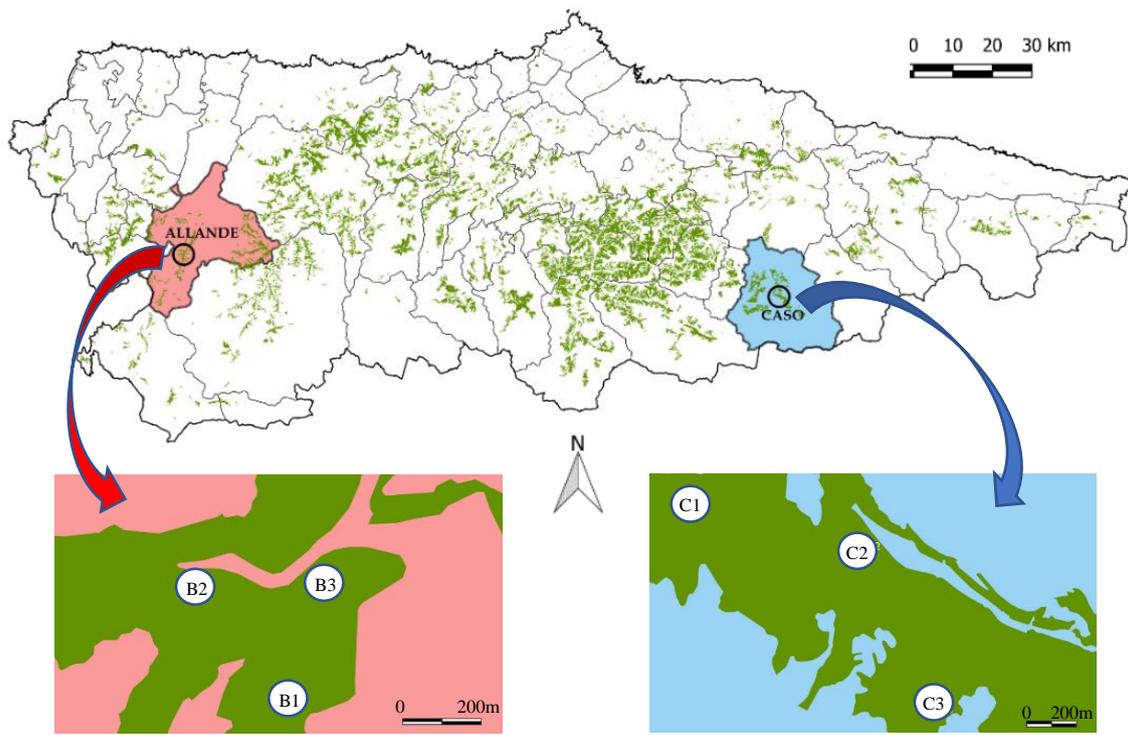


Figura 3.1. Distribución de masas puras de castaño (en verde) en el Principado de Asturias, destacando las 2 zonas objeto de estudio seleccionadas, Allande (rojo) y Caso (azul), y las 3 parcelas de cada zona (B1, B2 y B3 en Allande, y C1, C2 y C3 en Caso). Figura realizada con la colaboración del tecnólogo Manuel Alonso-Graña (CETEMAS) a partir de los datos del 4º Inventario Forestal Nacional del Principado de Asturias (AIEF, 2012).

La caracterización de los castaños fue realizada por el personal técnico de campo del PIF SERIDA-CETEMAS, bajo la dirección de la Dra. Canga y la investigadora Menéndez-Miguélez. Las parcelas objeto de estudio se geolocalizaron mediante un sistema de posicionamiento global (GPS) de precisión submétrica (Explorer XH, Trimble, California, EUA), mediante el cual se obtuvieron las coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator) y la altitud (m sobre el nivel del mar). La orientación se tomó con una brújula. La medición de la pendiente (% de desnivel), así como la altura de los árboles, se llevó a cabo con un hipsómetro digital (Vertex IV, Haglöf Sweden AB, Suecia). Los diámetros de los troncos de los castaños se midieron a la altura del pecho (a 1.3 m por encima de la parte superior de la cepa) en dos direcciones perpendiculares con forcípula. También se calcularon el diámetro y la altura dominante como el diámetro y la altura media de los 100 pies más gruesos por

hectárea (Assmann, 1970) (7 por parcela), y la densidad del castañar. Se seleccionaron dos árboles dominantes próximos a cada parcela, dentro de la misma masa forestal, que se aparearon para contar los anillos de crecimiento y realizar estudios de biomasa de las distintas partes del árbol.

Para las parcelas de estudio se calculó el IS (altura dominante a una edad determinada) a partir de la ecuación [3.1] desarrollada por Menéndez-Miguélez *et al.* (2016) para los castañares del noroeste de España.

$$IS = \frac{17.34 + X_0}{1 + \left(\frac{802.6}{X_0}\right) \cdot t_{ref}^{-1.077}} \quad [3.1]$$

$$\text{con } X_0 = 0.5 \cdot \left[H_0 - 17.34 + \sqrt{(H_0 - 17.34)^2 + 3210.4 H_0 \cdot t^{-1.077}} \right]$$

donde H_0 es la altura dominante (m) a la edad t (años) de la masa forestal con una edad de referencia, t_{ref} , de 20 años.

A partir de la ecuación [3.1], Menéndez-Miguélez *et al.*, (2016) estableció cuatro clases de CE a una edad de referencia de 20 años: CE=1, Muy buena (IS > 18 m); CE=2, Buena (IS < 18-14 m); CE=3, Mala (IS < 14-10 m); CE=4, Muy mala (IS < 10 m).

3.2.2 Clima

Los datos climatológicos se tomaron de los registros llevados a cabo por la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET) de España. Para las zonas objeto de estudio, Allande y Caso, se realizaron tres tratamientos de datos climáticos. En primer lugar, se estimaron parámetros temperatura y precipitación obtenidos de los modelos climáticos creados por Sánchez *et al.* (1999), calculados en función de la altitud, posición geográfica (coordenadas UTM) y la cuenca hidrográfica o subcuenca a la que pertenece cada zona. En segundo lugar, en base a las temperaturas y precipitaciones obtenidas, se calcularon los parámetros de evapotranspiración y balances hídricos según Thornthwaite *et al.*, (1957). Así, los parámetros considerados fueron: temperatura media anual, temperaturas media y mínima en el mes más frío y media y máxima en el mes más cálido, temperatura media invernal y estival, precipitación total anual y estacional, evapotranspiración, superávit y déficit de humedad anual, índice hídrico anual e índice de Vernet (Torre, 2014). Posteriormente, se trataron los resúmenes climatológicos mensuales publicados por la AEMET para el Principado de Asturias desde septiembre de 2012 hasta enero de 2018, tomando los valores de las estaciones meteorológicas más cercanas a las zonas de estudio, San Antolín de Ibias (X: 672316, Y: 4766039, Huso:

29, Altitud: 780 m) para Allande, y Aller (X: 298416, Y: 4774373, Huso: 30, Altitud: 750 m) para Caso. Los valores climáticos anuales y estacionales obtenidos para cada zona fueron: temperaturas media, normal, mínima y máxima; termometría (carácter térmico en función de la diferencia de temperaturas medias registradas para cada periodo con respecto a la temperatura normal, N: normal, F: frío y C: cálido); precipitaciones media y normal y pluviometría (carácter pluviométrico en función de la diferencia de precipitaciones medias registradas para cada periodo con respecto a la precipitación normal, MH: muy húmedo, N: normal y S: seco). Debido a un cambio en el periodo de referencia considerado por la AEMET, la temperatura y precipitación normal están referidas a las medias de los periodos de referencia desde 1971 hasta 2000, para los valores hasta diciembre de 2014, y desde 1981 hasta 2010, para los valores a partir de enero de 2015. Y, por último, en tercer lugar, se trataron los datos climatológicos diarios publicados por la AEMET para el Principado de Asturias desde el 20 de noviembre de 2015 hasta el 31 enero de 2018, tomando los valores de las estaciones meteorológicas más cercanas a las zonas de estudio. Los valores climáticos anuales y estacionales obtenidos para cada zona fueron: temperaturas media, mínima y máxima; precipitación y velocidad y racha de viento.

3.2.3 Inventario florístico

Los datos florísticos para las dos zonas de estudio son parte de un trabajo desarrollado por el PIF SERIDA-CETEMAS, coordinado por la Dra. Ciordia, para la identificación de la flora vascular presente en masas de monte bajo de castaño en el Principado de Asturias (García *et al.*, 2014). La toma de datos y muestreo de las 3 parcelas de cada una de las 2 zonas de estudio se realizó en marzo (2 parcelas de Caso) y junio (parcela restante de Caso y las 3 parcelas de Allande) de 2011. Para la confirmación de los taxones identificados *in situ* en las parcelas y la identificación de los no identificados se utilizaron guías y claves de determinación botánica (Castroviejo *et al.*, 1990; Fernández, 2004; Aizpuru *et al.*, 2007, Castaño *et al.*, 2007) y en algunos casos se recurrió al Área de Botánica del Departamento de Biología de Organismos y Sistemas de la Universidad de Oviedo. Para cada taxón se anotó el estrato al que pertenece: herbáceo (plantas no leñosas), diferenciando dentro de este estrato a los helechos, arbustivo (plantas leñosas desde 0.3 hasta 3 m de altura), distinguiendo entre subarbustivo (desde 0.3 hasta 1 m) y propiamente arbustivo (desde 1 hasta 3 m), y arbóreo (plantas leñosas de más de 3 m de altura). En base al porcentaje de recubrimiento observado para cada taxón, se asignó un número del 0 al 6 como Índice de Abundancia-Dominancia (I A-D), tal y como se detalla en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Índices de Abundancia-Dominancia (I A-D) de los taxones identificados en función de su porcentaje de recubrimiento de la superficie.

I A-D	Presencia de individuos / Cobertura	% de recubrimiento (valor medio)
0	Ausencia / Nula	0 (0)
1	Rara o aislada / Muy escasa	$0 < \% < 1$ (0.5)
2	Poco abundante / Escasa	$1 \leq \% < 10$ (5)
3	Notable / Considerable	$10 \leq \% < 25$ (17.5)
4	Abundante / Importante	$25 \leq \% < 50$ (37.5)
5	Muy abundante / Destacada	$50 \leq \% < 75$ (62.5)
6	Dominante / Grande	$75 \leq \% < 100$ (87.5)

Las guías y claves botánicas empleadas para la identificación y clasificación de los taxones inventariados permitieron también establecer el carácter bioindicador (nitrófilo, acidófilo y forestal) de aquellos taxones identificados que poseen algún carácter de este tipo.

3.2.4 Suelo

Inicialmente se recogió la información agroecológica de las dos localidades en estudio, Allande y Caso, en los Mapas de Clases Agrológicas y Usos Agrarios Generales (escala 1:50000) del Principado de Asturias (SITPA-IDEAS, 2012).

Posteriormente se realizaron los análisis fisicoquímicos de los suelos en el Laboratorio Kudam S. L. (Alicante, España). El muestreo se realizó en mayo de 2015. En cada una de las 3 parcelas en las 2 zonas de estudio se tomaron 8 muestras (en cruz, con 4 muestras por dirección), que se extrajeron con una barrena Edelman de 20 cm longitud y 5 cm de diámetro de perforación, para posteriormente mezclarlas y tener una muestra homogénea y representativa de cada parcela. En el extracto acuoso 1:2 (m/v) se analizó el pH, los iones Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , NO_3^- , SO_4^{2-} y la relación de adsorción de sodio ($\text{SAR}, \text{Na}^+ / ((\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}) / 2)^{1/2}$). Los cationes intercambiables analizados fueron Na^+ , Mg^{2+} , K^+ y Ca^{2+} . Se estudió la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y se calculó el porcentaje de saturación de sodio ($\text{Sat Na}, (\text{Na}^+ \text{ intercambiable} / \text{CIC}) \times 100$). Los elementos asimilables que se cuantificaron fueron B, Na, Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Cu y Zn. También se determinó la textura, densidad aparente (ρ_{ap}), capacidad de retención de agua disponible (CRAD, considerando una profundidad

media del suelo de 60 cm), materia orgánica (MO), carbono orgánico (C Org), nitrógeno total (N tot) y se calculó la relación C Org/N tot (C/N).

3.2.5 Análisis químico elemental foliar

El análisis químico elemental foliar de los castaños de las parcelas objeto de estudio también se realizó en el Laboratorio Kudam S. L. (Alicante, España). El muestreo se llevó a cabo en julio de 2017. En cada una de las 3 parcelas en las 2 zonas de estudio se tomaron 10 hojas de la primera rama viva de cada uno de los 4 árboles muestreados por parcela. Una vez mezcladas las hojas recogidas en cada parcela, para tener una muestra homogénea y representativa, se enviaron 50 g de hojas a temperatura ambiente al laboratorio de análisis, donde una vez secada la muestra se analizaron los siguientes elementos químicos: N, P, K, Ca, Mg, Na, B, Mn, Fe, Zn, Cu y Mo.

3.2.6 Análisis químico elemental del tronco

El análisis químico de la madera (duramen y albura) fue realizado en el CETEMAS (Principado de Asturias, España), bajo la dirección de la Dra. Hevia, mediante el equipo ItraxMultiscanner (Cox Analytical Systems, Sweden). Las muestras, seleccionadas y analizadas en otoño de 2017, fueron preparadas a partir de discos de madera de castaños dominantes apeados en agosto (Caso) y septiembre (Allande) de 2011, para el cálculo de la edad de la masa forestal. El tamaño muestral para este estudio dendroquímico (análisis de elementos químicos que se acumulan en los anillos de crecimiento de los árboles) fue de 5 árboles por zona, cortando un disco de unos 2 cm de espesor a 1.3 m de la base. Estos discos se dejaron secar en el laboratorio a temperatura ambiente y de cada disco fue cortada, con una sierra de precisión de doble disco, una muestra de aproximadamente 1.2 mm de espesor desde el centro del disco hasta el exterior. Posteriormente, se realizó el acondicionamiento de las muestras en el laboratorio para su escaneado mediante rayos-X y análisis por fluorescencia de rayos X. Los elementos químicos analizados en el duramen y albura fueron el Ca, K, Mg, Fe y Mn.

Las medidas de fluorescencia de rayos X, debido al amplio rango en el que varían, se representan normalizadas como Z-scores, restando a cada valor la media y dividiendo por la desviación estándar (Hevia *et al.*, 2018). Estos Z-scores se calcularon para cada elemento en cada árbol analizado, obteniendo una cronología elemental en los anillos de crecimiento de los árboles de cada zona.

3.2.7 Composición fenólica de la corteza, albura y duramen del tronco

3.2.7.1 Material vegetal

De los discos cortados de los castaños dominantes apeados, se tomó uno de cada parcela, tres por ubicación. Estos discos se dejaron secar en el laboratorio a temperatura ambiente durante 5 meses. Transcurrido este tiempo, se realizó la extracción de los compuestos fenólicos. Las distintas partes analizadas (corteza exterior e interior, albura y duramen) se trocearon para facilitar la molienda posterior y calcular el contenido en humedad. El peso seco se obtuvo tras secar una parte de las muestras troceadas en estufa de circulación de aire forzado (Digitronic, JP SELECTA, Barcelona, España) a 102 °C durante 24 h. La molienda de las muestras acondicionadas y troceadas se llevó a cabo en molino criogénico (Freezer/Mill 6770, SPEX SamplePrep Inc., New Jersey, EEUU) con programa de trabajo de 2 ciclos con 1 min de preenfriamiento, 2 min de molienda, 1 min entre ciclos y 10 ips de velocidad de impacto. Las muestras molidas se guardaron a -80 °C hasta realizar la extracción fenólica.

3.2.7.2 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos

Los productos químicos empleados y las metodologías llevadas a cabo para la extracción de los compuestos fenólicos están descritos en el apartado 2.2 (Capítulo 2).

De cada parte a analizar de los discos cortados se realizaron 3 extracciones. La extracción de los compuestos fenólicos se basó en la metodología optimizada a partir de la descrita por Sanz *et al.* (2010) (**Figura 2.1**). Las muestras molidas (1 g por muestra) se extrajeron con 100 mL de MeOH/H₂O (1:1, v/v) en agitación durante 24 h. Los extractos se filtraron, se eliminó el MeOH y se llevó a un volumen de 50 mL con agua, separando posteriormente una alícuota de 3 mL, que se conservó a -20 °C para realizar la cuantificación de los fenoles totales (FT). El resto del extracto se sometió a 2 extracciones líquido-líquido consecutivas, con 20 mL de éter dietílico y 20 mL de acetato de etilo. El extracto acuoso final se liofilizó y guardó a -80 °C hasta la cuantificación de los taninos hidrolizables (TH). Los extractos orgánicos se llevaron a sequedad, guardando los residuos secos a -20 °C hasta la cuantificación correspondiente, fenoles de bajo peso molecular (FBPM) en el primero (análisis no realizados) y taninos condensados (TC) en el segundo.

Los FT se valoraron mediante el ensayo Folin-Ciocalteu (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2011). Como estándar de referencia se usó ácido gálico (AG), expresando el contenido en FT como mg equivalentes de AG por g de peso seco. El análisis se realizó en microplaca de 96 pocillos, adicionando los siguientes volúmenes en cada pocillo: 10 µL H₂O (blanco), AG (estándar) o muestra + 215 µL H₂O + 15 µL reactivo de Folin-Ciocalteu + 60 µL Na₂CO₃ 20% (m/v) acuoso. La placa se incubó 30 min a 25°C y se realizó la lectura espectrofotométrica a 750 nm. Cada muestra analítica se midió por triplicado.

Los TC se determinaron en la fracción del acetato de etilo, reconstituida en MeOH y filtrada, mediante el método de la vainillina (Sun *et al.*, 1998). Como estándar de referencia se usó (+)-catequina hidratada ((+)C), expresando el contenido en TC como mg equivalentes de (+)C por g de peso seco. El análisis se realizó en microplaca de 96 pocillos, adicionando en cada uno de ellos los siguientes volúmenes: 60 μ L metanol (blanco), (+)C o muestra + 120 μ L vainillina 1% (m/v_{MeOH}) + 120 μ L H₂SO₄ 10% (v/v_{MeOH}). En el espectrofotómetro, a 30 °C, se incubó la placa 15 min y se realizó la lectura espectrofotométrica a 500 nm. Cada muestra analítica se midió por triplicado.

Los TH, como galotaninos (Gts) y elagitaninos (Ets) se analizaron en el residuo acuoso final, una vez seco. 20 mg de este residuo se sometieron a una reacción de metanólisis ácida mediante la adición de 2 mL de MeOH y 0.2 mL de H₂SO₄ (Hartzfeld *et al.*, 2002), en atmósfera de N₂ (Inoue & Hagerman, 1988) a 85 °C durante 3 h. Las muestras metanolizadas se filtran y analizan por HPLC, cuantificando los picos de galato de metilo (GM) y ácido elágico (AE), expresando los resultados como mg de GM por g de peso seco para los Gts, y mg de AE por g de peso seco para los Ets. La separación cromatográfica se realizó según Bobinaitè *et al.* (2012), usando una columna C18 (5 μ m, 25 x 0.46 cm) a temperatura ambiente y una fase móvil formada por ácido fórmico 0.1% (v/v) acuoso (eluyente A) y ACN/MeOH/ácido fórmico (84.9:15:0.1, v/v/v) (eluyente B). La velocidad de flujo se fijó en 1 mL min⁻¹ y el volumen de inyección en 100 μ L. Los cromatogramas fueron monitorizados a 271 y 252 nm para el GM y AE, respectivamente, analizando cada muestra una vez.

3.2.8 Valoración del Índice de Chancro en Campo (IChC)

Para valorar la incidencia del chancro (enfermedad de los castaños causada por el hongo *Cryphonectria parasitica*) se definió un índice de valoración, IChC, que permita, de forma fácil y rápida, la toma de datos en, al menos, un 75 % de los árboles de la zona a valorar. Para cada árbol, se anota el número de zonas dañadas por el chancro que se observan en cada tercio del árbol y si la zona apical muestra síntomas de sequedad. El IChC es la media de los resultados obtenidos individualmente tras aplicar la ecuación [3.2].

$$\text{IChC} = \text{Ch}_{1/3} + 2 \cdot \text{Ch}_{2/3} + 3 \cdot \text{Ch}_{3/3} + 0 \text{ (ápice sano) } \text{ ó } 10 \text{ (puntiseco)} \quad [3.2]$$

donde Ch es el número de zonas dañadas por el chancro en cada tercio del árbol

La constante que multiplica a Ch en la fórmula [3.2] se incrementa en una unidad a medida que se asciende en los tercios del árbol para dar más importancia al chancro en altura, ya que es el que más facilidad de dispersión tiene, y, por lo tanto, de contagio a otros árboles próximos (Soutrenon, 2007). El sumar 0 ó 10 en función del

estado de la zona apical del árbol, es debido a que los castaños que estén puntisecos (+10) son aquellos en los que el chancro ya ha afectado a su sistema vascular, por lo que la enfermedad empieza a debilitar considerablemente al árbol.

3.2.9 Crecimiento *in vivo* de *Cryphonectria parasitica* en ramas *ex situ*

El muestreo para este bioensayo se realizó en julio de 2014. Se tomaron ramas de aproximadamente 30 cm por árbol, de 5 árboles aleatoriamente muestreados en cada una de las 3 parcelas de las 2 zonas de estudio. Este muestreo se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones que describe Rodríguez & Colinas (1999), recogiendo ramas de la parte baja de la copa del árbol, que no fuesen rebrotes, con diámetros entre 2 y 3.5 cm, libres de heridas, nudos y otras alteraciones, transportándolas desde el monte hasta el laboratorio en nevera refrigerada con hielo y manteniéndolas a 4 °C hasta el inicio del ensayo al día siguiente.

Las ramas a inocular con el hongo *C. parasitica* se cortaron a unos 12 cm de longitud y se descortezaron, depositando 5 muestras (una de cada árbol muestreado en cada parcela) de madera, corteza o madera+corteza (rama descortezada con ambas partes en contacto intentando simular el estado sin descortezar) para cada parcela en una bandeja de polipropileno de 7.5 x 37.5 x 30.0 cm con el fondo cubierto por perlita (Premium 2-6 mm, Gramoflor GmbH & Co. KG, Vechta, Alemania), esterilizada en autoclave (Raypa, AES-75 RFG, Barcelona, España), y humedecida con agua estéril. En el centro de cada bandeja se colocó 1 cm² de papel milimetrado, como referencia escalar en la cuantificación final de la superficie del crecimiento del hongo.

Se utilizó la cepa virulenta de *C. parasitica* LPPA-F-187, perteneciente al grupo de compatibilidad vegetativa EU-1 con idiomorfo MAT-I, cedida por la Dra. González del Programa de Investigación en Patología Vegetal del SERIDA.

El inóculo de *C. parasitica* (superficie circular de 0.5 cm de diámetro) se colocó en contacto directo con el tejido correspondiente en el centro de las muestras de madera y corteza, y a unos 3 cm de ambos extremos en las muestras de madera+corteza, entre ambos tejidos, en un extremo en contacto directo con la madera y en el otro con la corteza. Para cada zona y tipo de muestra se utilizó un bandeja blanco, en la que se colocaron 6 muestras (de 2 árboles por parcela) inoculándolas sólo con el medio de cultivo del hongo (agar más extracto de malta). Una vez inoculadas las muestras, las bandejas se cubren con un plástico opaco y se dejan a temperatura ambiente durante 3 días (**Figura 3.2**). Transcurrido este tiempo, se fotografiaron los trozos de ramas inoculados y se analizaron las imágenes mediante el software ImageJ (v1.43u, Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA) para el cálculo de la superficie de crecimiento de *C. parasitica*.

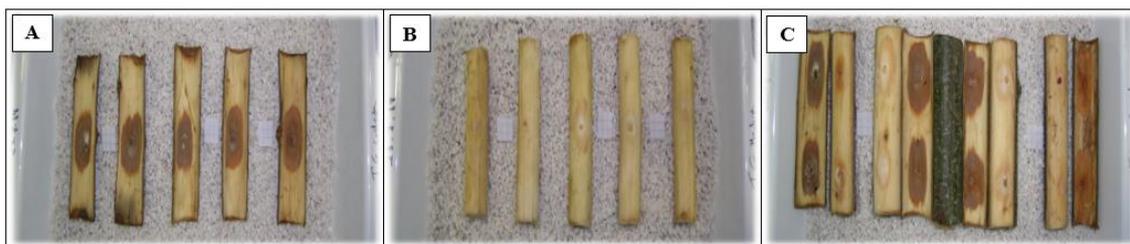


Figura 3.2. Crecimiento de *Cryphonectria parasitica* a los 3 días de su inoculación sobre corteza (A), madera (B) y entre corteza y madera (C) de ramas frescas de *Castanea sativa*.

Para la valoración de la durabilidad se aprovechó la optimización del protocolo que se estaba llevando a cabo en el Área de Tecnología, Madera Estructural y Construcción del CETEMAS, coordinado por la tecnóloga Laura González, dentro del marco de colaboración SERIDA-CETEMAS. Las probetas en las que se analizaron los FT y sobre las que se realizó el ensayo de durabilidad, se cortaron de una tabla de castaño (*C. sativa*) de 13.0 x 3.8 x 75.5 cm suministrada por SIERO LAM S. A., secada de forma mixta (natural más cámara de secado). De esta tabla se obtuvieron 27 probetas de 5.0 x 2.5 x 1.5 cm, de las cuales 9 fueron usadas como muestras control, 9 se sometieron a deslavado (según la norma UNE-EN 84:1997) y 9 a vaporización. Todas las probetas, tratadas y no tratadas, se acondicionaron a 20 ± 2 °C y 65 ± 5 % de humedad relativa (UNE-EN 350-1:1995) hasta masa constante (m_f), se esterilizaron en húmedo en autoclave (Raypa, AES-75 RFG, Barcelona, España), a 121 °C durante 20 min, y 3 de cada tratamiento se secaron en estufa de aire forzado (Digitronic, JP SELECTA, Barcelona, España), a 103 °C durante 24 h), para determinar el contenido en humedad (CH_i , ecuación [3.3]) y posterior análisis de FT.

$$CH_i = \frac{m_f - m_s}{m_s} \cdot 100 \quad [3.3]$$

m_f : masa fresca (g) después de autoclavar

m_s : masa seca (g) tras secar en estufa

3.2.10.1 Tratamientos extractivos

3.2.10.1.1 *Prueba de deslavado (UNE-EN 84:1997)*

La extracción por “deslavado” consiste en someter a la madera a ciclos de lavado (deslavado) mediante “impregnación” e inmersión. Se colocaron 9 probetas en 3 vasos de precipitados de 100 mL. En cada vaso se colocaron 3 probetas y se rellenaron con 50 mL de agua destilada, colocando piezas de vidrio sobre las maderas a modo de lastre para mantenerlas sumergidas durante el proceso (**Figura 3.3**).

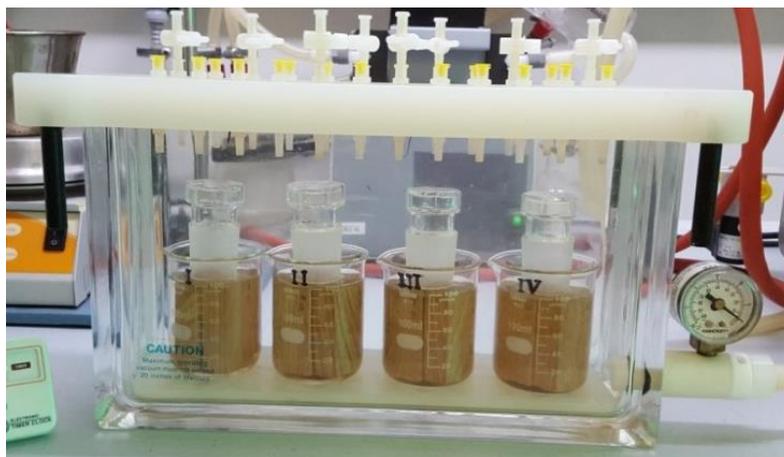


Figura 3.3. Fase de impregnación de las probetas de madera de *Castanea sativa* para la extracción por deslavado según la norma UNE-EN 84:1997.

En la primera fase, “impregnación”, se aplica vacío (4 kPa) con bomba de vacío (Vacuubrand, RZ 2.5, Wertheim, Alemania) durante 20 min, y después (sin vacío) se dejan reposar durante 2 h. Transcurrido este tiempo se retira la fase líquida. En la siguiente fase, inmersión, las muestras se sumergen nuevamente en agua destilada durante 14 días, periodo en el que se cambió el agua 9 veces con la siguiente cadencia: al finalizar el primer día de inmersión, al segundo día, y siete veces más en los 12 días restantes, con intervalos de un día como mínimo y tres como máximo.

3.2.10.1.2 Vaporización

Para este tratamiento, las 9 probetas de madera de castaño se colocaron sobre una rejilla dentro de un autoclavable, evitando que la madera estuviese en contacto con el agua a evaporar, y fueron sometidas a vapor de agua en autoclave (Raypa, AES-75 RFG, Barcelona, España), durante 8 ciclos (6 h por ciclo y 4 ciclos por semana) de humedad (20 L de agua destilada al inicio de cada ciclo en el autoclave) y temperatura (90 °C), sin presión.

3.2.10.2 Fenoles Totales

El contenido fenólico (FT) se analizó en 9 de las probetas (3 sin tratar, 3 deslavadas y 3 vaporizadas) y 3 probetas de madera de haya sin tratar de iguales características que las de castaño. Las muestras de haya se incluyeron por requerimientos normativos (UNE-EN 350-1:1995) para el ensayo de durabilidad. Tanto la extracción como la cuantificación de los FT se realizaron como se describe en el apartado 3.2.7.2, partiendo de 0.5 g de muestra y manteniendo la proporción del solvente de extracción, 50 mL.

3.2.10.3 Ensayo de durabilidad

El diseño y desarrollo experimental de este ensayo se llevó a cabo según la norma UNE-EN 350-1:1995, coetáneo con la revisión y modificación de esta norma, por lo que los resultados finales mostrados se corresponden con lo establecido en la nueva norma (UNE-EN 350:2016).

Este ensayo se realizó en 18 de las probetas (6 sin tratar, 6 deslavadas y 6 vaporizadas) y 6 probetas de madera de haya sin tratar de iguales características que las de castaño. Como ya se comentó, las muestras de haya se incluyeron por requerimientos normativos (UNE-EN 350-1:1995) para este ensayo. El método empleado para la exposición de las probetas contra los basidiomicetos destructores de la madera se llevó a cabo según las especificaciones de la norma EN 113:1996/A1:2004. A botellas de vidrio de 0.5 L de base cuadrada se les adicionaron 30 mL de medio de cultivo (agar más extracto de malta), se autoclavan a 121° durante 21 min y se tumban para que el medio solidificado quede a lo largo de la botella. En 12 botellas se inocula el hongo *Coniophora puteana*, y en otras 12 *Trametes versicolor*, ambos cedidos por el Laboratorio de Protección de Maderas del CIFOR-INIA (Madrid, España). Cuando el micelio cubrió por completo la superficie del medio (unas 3 semanas tras la inoculación), se introducen las probetas, depositándolas sobre 2 soportes de acero inoxidable, previamente esterilizados, que evitan el contacto directo de las muestras con el hongo, dejando un espacio entre ambos de unos 3 mm. Así, las muestras permanecieron en cámara de cultivo a 22 °C, 70 % de humedad relativa y en oscuridad durante 16 semanas. En la **Figura 3.4** se muestran algunas probetas al inicio de la exposición fúngica y al final.

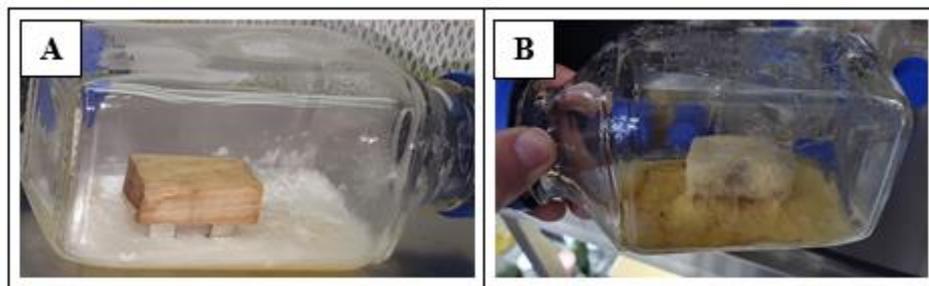


Figura 3.4. Ensayo de durabilidad de las probetas de madera de *Castanea sativa* al inicio de la exposición fúngica (A) y tras 16 semanas (B).

Transcurridas las 16 semanas, las probetas se retiraron de las botellas y se les eliminó cualquier micelio adherido por raspado con bisturí, para posteriormente secarlas en estufa (103 °C, 24 h) y determinar su masa seca (m_{s16}).

Para la clasificación de la durabilidad de la madera frente al ataque por hongos basidiomicetos, la norma UNE-EN 350:2016 establece 5 clases de durabilidad en

función del porcentaje de pérdida de masa (PM) medio (**Tabla 3.4**), calculado como se describe en la ecuación [3.4].

Tabla 3.4. Clases de durabilidad de la madera frente al ataque por hongos basidiomicetos según la norma UNE-EN 350:2016.

Clase de durabilidad	Descripción	Pérdida de masa (PM) en %
1	Muy durable	$PM \leq 5$
2	Durable	$5 < PM \leq 10$
3	Medianamente durable	$10 < PM \leq 15$
4	Poco durable	$15 < PM \leq 30$
5	No durable	$30 < PM$

$$PM (\%) = \frac{m_{st0} - m_{s16}}{m_{s16}} \cdot 100 \quad [3.4]$$

donde m_{st0} es la masa seca teórica inicial después del acondicionamiento, ya que, según la norma UNE-EN 350-1:1995, las probetas a utilizar en los ensayos biológicos no deberán secarse en estufa antes del ensayo, y se obtiene como se indica en la ecuación [3.5]

$$m_{st0} = \frac{100 \cdot m_{f0}}{100 + CH_i} \quad [3.5]$$

donde m_{f0} es la masa fresca inicial tras acondicionamiento (sin autoclavar), y CH_i el contenido en humedad inicial tras el acondicionamiento y autoclavado (ecuación [3.3])

3.2.11 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos cuantitativos obtenidos se llevó a cabo con el programa informático IBM SPSS Statistics 23.0. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron en base a un análisis de varianza (ANOVA), por comparación de medias y considerando un modelo lineal general con pruebas *post hoc* para un nivel de significación de 0.05.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Zonas de estudio: características y productividad

Los datos correspondientes a la ubicación y características principales de las zonas de estudio se muestran en la **Tabla 3.1**. Además de la localización (coordenadas UTM), altitud, orientación y pendiente de las parcelas objeto de estudio, también se muestra el IS obtenido para los castañares de las zonas seleccionadas, con la CE que les correspondería (Menéndez-Miguélez *et al.*, 2016). La variabilidad observada es fruto de la forma en que se eligieron las parcelas, tratando de representar cada una de las zonas objeto de estudio.

Tabla 3.1. Orografía de las parcelas e índice de sitio (IS) de los castañares en las zonas de estudio (media \pm EE). ^a CE: calidad de estación.

Zona	Parcela	Coordenadas UTM			Altitud (m)	Orientación	Pendiente (%)	IS (m)		
		X	Y	Huso				Parcela	Medio	CE ^a
Allande	1	682421.408	4786489.65	29	514	E	70	16.49		
	2	682164.657	4786778.21	29	556	NE	53	17.87	14.6	2
	3	682488.155	4786818.80	29	503	NO	72	9.57	(± 2.6)	
Caso	1	309455.169	4783284.23	30	640	NO	40	12.75		
	2	310151.441	4783099.15	30	609	NE	65	12.06	13.1	3
	3	310442.276	4782453.18	30	727	NO	64	14.55	(± 0.74)	

De estos datos cabe destacar que la altitud es superior en la zona de Caso, pero ambas zonas están en el orden de altura recomendado para la especie. En Asturias, a pesar de la gran influencia que tuvo el manejo como cultivo, la presencia de castaño suele estar en un rango de altitud moderado y adecuado para la especie, que va desde los 264 a los 774 m en las 30 parcelas evaluadas en el trabajo de Afif-Khouri *et al.* (2011), o desde los 176 a 881 m en las 70 seleccionadas como representativas de toda la casuística del castaño, para los estudios realizados en nuestro grupo de trabajo y que sirvieron como base para la selección de las parcelas de este estudio (Menéndez-Miguélez *et al.*, 2013). Díaz-Varela *et al.* (2011) consideraron la altitud como el principal indicador de la calidad de los bosques de castaños, diferenciando dos dominios espaciales, tierras bajas y tierras altas. En base a este índice de calidad, los castaños de buena calidad tienden a estar presentes en altitudes superiores a 600 m.

En Asturias, la altitud media de los castañares está entorno a los 600 m (Afif-Khouri *et al.*, 2011; Menéndez-Miguélez *et al.*, 2015), y por ello consideramos adecuado seleccionar las parcelas de estudio entorno a esa altitud, 659 m como valor medio en Caso y 524 m en Allande. La ausencia de altitudes más extremas en la selección impidió evaluar una posible relación entre la altitud y la calidad de los castañares estudiados. Sin embargo, las diferencias encontradas entre las dos

ubicaciones seleccionadas para este estudio indican que debe de haber otros factores tanto o más determinantes para el desarrollo del castaño.

Respecto a la orientación, dadas las exigencias climatológicas de la especie, sobre todo en lo que respecta a temperatura, luz y duración del periodo seco (Conedera *et al.*, 2016), es de esperar que sea un factor determinante y asociado a la altitud y pendiente, por ser condicionantes e interaccionar con las variables ambientales. Desde el punto de vista de la exigencia en luz, y ya que la altitud es intermedia, consideramos que la orientación del monte de Allande es más favorable para esta especie ya que es mayor la proporción de monte con exposición Este.

En cuanto a la pendiente, no es un factor limitante, pero si importante, dado que es fundamental para la disponibilidad hídrica, de nutrientes y el drenaje en suelos poco permeables. El castaño es una especie con baja tolerancia al encharcamiento y que por tanto prefiere suelos que tengan un buen drenaje (Conedera *et al.*, 2016). En ausencia de esta capacidad, la pendiente favorecería este factor, aunque siempre asociado a una pluviosidad regular, ya que tampoco se adapta a periodos largos de sequía (Rubio *et al.*, 2002a y b). Las parcelas seleccionadas para este estudio tienen pendientes que podríamos considerar elevadas, ya que con respecto tanto a las 30 parcelas del trabajo de Afif-Khoury *et al.* (2011), donde el rango va del 8.00 al 78.20%, como en las 70 parcelas base para este estudio, en las que dicho rango es 19.40-75.20 % (Menéndez-Miguélez *et al.*, 2015), las seleccionadas se encontrarían más próximas al límite superior, con la única excepción de la primera parcela de Caso, con un 40% (**Tabla 3.1**). En general, el valor de la pendiente de las parcelas de Caso está más próximo a la media en Asturias, que es de 33.95 y 50.06 % según Afif-Khoury *et al.* (2011) y Menéndez-Miguélez *et al.* (2015), respectivamente.

A pesar de la forma similar del relieve (orografía), las estimaciones previas de la CE de las parcelas según las tablas de producción de castaño de monte bajo en Asturias elaboradas por Cabrera & Ochoa (1997) eran de 22 m para Allande y 16 m para Caso a la edad típica de referencia de 30 años. La aplicación de los modelos matemáticos obtenidos por Menéndez-Miguélez *et al.* (2016), más recientes y precisos, calculados para una edad de referencia de 20 años y reduciendo los niveles de IS a cuatro (8, 12, 16 y 20 m), mostró que estos índices medios eran menos contrastantes de lo esperado, 14.6 m, para Allande y 13.1 m, para Caso, no obstante, la CE se mantiene diferente para las dos ubicaciones, buena para Allande (2) y mala para Caso (3). Los valores máximos muestran una diferencia considerable a favor de las parcelas del monte de Allande, 17.87 m, frente a 14.55 m de Caso (**Tabla 3.1**).

En el IS, utilizado ampliamente como indicador de productividad (Skovsgaard & Vanclay, 2008), las variables climáticas y edáficas parecen ser decisivas según los estudios realizados en el Principado de Asturias (Afif-Khoury *et al.*, 2011). Además, el castaño es una especie muy dependiente de la cantidad y, sobre todo, de la distribución de la precipitación (Conedera *et al.*, 2016).

3.3.2 Clima

El castaño es una especie muy sensible a la sequía estival, al asociarse en esta estación con temperaturas altas, y sobre todo a la extensión del periodo seco. Esta limitación es especialmente importante en las poblaciones del norte de la península ibérica, en las que la precipitación media mensual no suele ser inferior a 17 L m⁻², frente a las poblaciones del sur, en las que la precipitación puede llegar hasta los 2 L m⁻² (Ciordia *et al.*, 2012).

En las dos zonas objeto de estudio (Allande y Caso), las estimaciones proporcionadas por los modelos climáticos propuestos por Sánchez *et al.* (1999), cuyo periodo de datos climáticos abarca desde 1940 hasta 1989, se muestran en la **Tabla 3.2**. Las diferencias más marcadas entre las dos zonas se dan en las temperaturas frías, donde Allande nunca alcanza temperaturas tan bajas como Caso; en la temperatura máxima media del mes más cálido, superior en Caso; en la precipitación total anual y las parciales de primavera, verano y otoño, superiores para Caso, lo que lleva a que las condiciones de esta última localidad sean más contrastantes, en cuanto a temperatura, pero tenga menor oscilación en disponibilidad hídrica, con un índice hídrico superior. Por último, el índice de Vernet diferencia Allande y Caso como climas submediterráneo y oceánico mediterráneo, respectivamente.

Los diagramas ombrotérmicos de Gaussen nos permiten poner de manifiesto la presencia de periodos secos, donde las precipitaciones son inferiores a dos veces el valor de la temperatura media (**Figura 3.2**). A partir de los datos de los últimos años (2012-2018), periodo en que se realizó el seguimiento climático de las parcelas, se obtienen unos climogramas con presencia de una estación seca, algo más marcada en Allande. Los datos climatológicos tomados de los resúmenes mensuales de la AEMET, para las estaciones meteorológicas más cercanas a Allande y Caso (**Tabla 3.3**), muestran mayores temperaturas máximas en Caso con menores temperaturas mínimas en casi todo el año, lo que confirma una oscilación térmica más marcada, siendo la termometría parecida en las dos zonas, normal en invierno y cálida en primavera y verano, diferenciándose en otoño, que es cálida en Allande y normal en Caso. La clasificación pluviométrica también es similar en ambas localidades, siendo húmeda en invierno, normal en primavera y manteniéndose seca en verano y otoño. No obstante, la precipitación es siempre ligeramente superior en Caso, a excepción del otoño.

Tabla 3.2. Parámetros climáticos estimados para las zonas de Allande y Caso a partir de los modelos climáticos propuestos por Sánchez *et al.* (1999) (media \pm EE). * Diferencia significativa entre zonas (ANOVA, comparación de medias, $p \leq 0.05$, $n=3$).

	Allande	Caso
Temperatura media anual (°C)	11.33 (± 0.067)	10.83 (± 0.18)
Temperatura media invernala (°C)	6.20* (± 0.10)	5.33* (± 0.18)
Temperatura media mes más frío (°C)	5.77* (± 0.088)	4.90* (± 0.21)
Temperatura mínima media mes más frío (°C)	1.73* (± 0.067)	0.67* (± 0.19)
Temperatura media estival (°C)	16.77 (± 0.088)	16.70 (± 0.15)
Temperatura media mes más cálido (°C)	17.63 (± 0.067)	17.53 (± 0.12)
Temperatura máxima media mes más cálido (°C)	24.13* (± 0.067)	24.60* (± 0.15)
Precipitación total anual (L m ⁻²)	1093* (± 6.1)	1186* (± 17)
Precipitación invierno (L m ⁻²)	386.3 (± 2.4)	391.3 (± 5.5)
Precipitación primavera (L m ⁻²)	271.0* (± 1.5)	286.7* (± 4.8)
Precipitación verano (L m ⁻²)	136.0* (± 0.58)	165.3* (± 1.9)
Precipitación otoño (L m ⁻²)	299.3* (± 1.9)	342.0* (± 4.6)
Evapotranspiración (L m ⁻²)	662.0 (± 2.1)	650.7 (± 4.5)
Superávit humedad anual (L m ⁻²)	595* (± 6.4)	669* (± 18)
Déficit humedad anual (L m ⁻²)	165.0* (± 1.5)	134.0* (± 3.1)
Índice hídrico anual	75.0* (± 1.4)	90.4* (± 3.7)
Índice Vernet	-3.860* (± 0.025)	-2.687* (± 0.039)

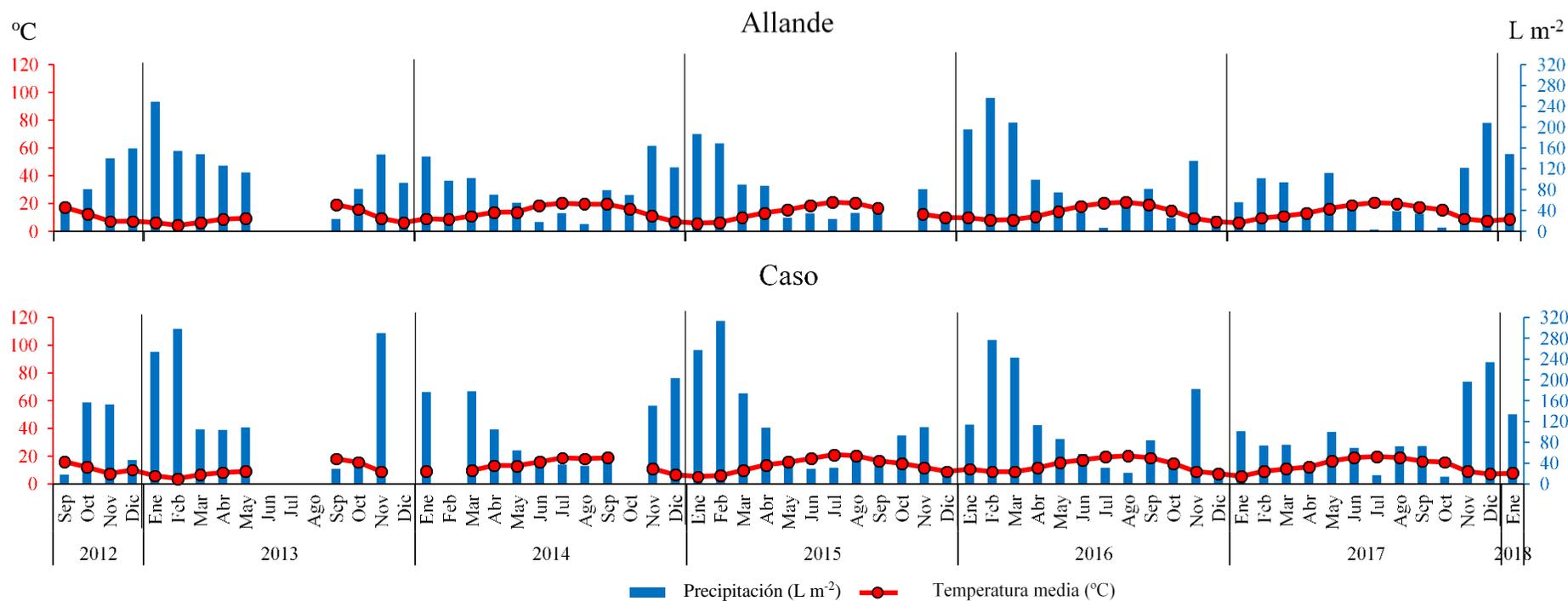


Figura 3.2. Climogramas de las zonas de estudio (Allande y Caso) para el periodo temporal Septiembre2012-Enero2018. En rojo se representan las temperaturas medias (°C) y en azul las precipitaciones (L m⁻²).

De la información diaria publicada en la AEMET, en los dos últimos años se comprobó que Allande, además de ser una zona con menor oscilación térmica y menos húmeda, es también más ventosa. La velocidad máxima media del viento en Allande es de 24 km h^{-1} , frente a 12 km h^{-1} en Caso, y las rachas alcanzan los 39 km h^{-1} en la primera localidad, frente a los 26 km h^{-1} de la segunda.

En base a los resultados obtenidos, la mejor CE asociada a las parcelas de Allande, además de por su mejor orientación, también podría ser debida a la menor oscilación térmica, considerando la humedad como un factor, en principio, desfavorable, pues la mejor calidad se asocia a menor pluviometría y mayor ventosidad. La relativa y escasa homogeneidad de criterios para definir cómo y cuánto de bueno (calidad y cantidad) es un monte de castaño, hace difícil poder definir unas condiciones climáticas que diferencien el desarrollo de la especie. Gallardo-Lancho (2001) seleccionó el área basal y el índice de Hart para definir la calidad óptima de los castaños españoles (Galicia, Asturias, Navarra, Cataluña y Extremadura) y poder relacionarla con las características ambientales, asumiendo las condiciones climáticas de cada zona como responsable parcial de la calidad de sus castañares. Estableció unos valores óptimos para algunos parámetros en ciertas zonas, pero no generalizó la relación clima-calidad, concluyendo que, en los castañares del norte, la temperatura media anual es el factor limitante más importante y, en los del sur, lo es la evapotranspiración en verano. Álvarez-Álvarez *et al.* (2010) clasifican el crecimiento temprano en altura del castaño europeo y sus híbridos en Galicia mediante curvas de altura dominante para una edad de referencia de 10 años, relacionando el mejor crecimiento de los castaños con una mayor precipitación en verano y ausencia de periodos largos de heladas. Otros estudios, exclusivos de castañares del Principado de Asturias, asocian mejor calidad (mayor IS) con menor temperatura del mes más cálido (Afif-Khoury *et al.*, 2011), o menor temperatura media anual y menor precipitación en verano y mayor en primavera (Menéndez-Miguélez *et al.*, 2015). En nuestras parcelas, no alcanzar temperaturas máximas muy altas convertiría a Allande en una ubicación más favorable, aunque el clima en Asturias no implique un déficit hídrico real.

Tabla 3.3. Valores climáticos de temperatura (T^a) y precipitación (Precip) obtenidos a partir de los datos mensuales registrados por la AEMET desde septiembre de 2012 hasta enero de 2018 (media \pm EE). ^a Valores de T^a y Precip medios, considerados normales (referentes), calculados a partir de los datos registrados en las series climáticas de la AEMET en los periodos de referencia correspondientes. ^b Clasificación del carácter térmico en función de la diferencia de T^a media registrada para cada periodo con respecto a la T^a normal. N: Normal y C: Cálido. ^c Clasificación del carácter pluviométrico en función de la diferencia de Precip media registrada para cada periodo con respecto a la Precip normal. H: Húmedo, N: Normal y S: Seco. * Diferencia significativa entre zonas (ANOVA, comparación de medias, $p \leq 0.05$, $n=46-61$ para los valores anuales, y $n=10-17$ para los estacionales).

	Anual		Invierno (Ene-Feb-Mar)		Primavera (Abr-May-Jun)		Verano (Jul-Ago-Sep)		Otoño (Oct-Nov-Dic)	
	Allande	Caso	Allande	Caso	Allande	Caso	Allande	Caso	Allande	Caso
T^a media ($^{\circ}\text{C}$)	12.8 (± 0.65)	12.8 (± 0.62)	8.1 (± 0.49)	7.9 (± 0.56)	14.5 (± 0.91)	14.3 (± 0.86)	19.4 (± 0.38)	18.8 (± 0.33)	10.5 (± 0.85)	10.7 (± 0.78)
T^a normal ($^{\circ}\text{C}$) ^a	13.1	13.1	8.5	8.5	14.6	14.3	19.1	18.4	10.2	10.6
T^a mínima ($^{\circ}\text{C}$)	8.1 (± 0.57)	7.2 (± 0.54)	3.9 (± 0.35)	3.0 (± 0.48)	9.4 (± 0.89)	8.5 (± 0.83)	14.1* (± 0.36)	12.2* (± 0.44)	6.2 (± 0.70)	5.7 (± 0.68)
T^a máxima ($^{\circ}\text{C}$)	17.5 (± 0.74)	18.1 (± 5.7)	12.2 (± 0.66)	12.8 (± 0.71)	19.7 (± 0.96)	20.1 (± 0.96)	24.8 (± 0.43)	25.2 (± 0.44)	14.7 (± 1.0)	16.0 (± 0.96)
Termometría ^b	C	N	N	N	C	C	C	C	C	N
Precip (L m^{-2})	1025.1 (± 168)	1196.9 (± 69)	450 (± 72)	572 (± 110)	173 (± 16)	214 (± 17)	110 (± 13)	135 (± 10)	317 (± 33)	315 (± 53)
Precip normal (L m^{-2}) ^a	954.0	1233.7	252.6	345.4	233.8	303.6	137.8	188.8	328.7	395.1
Pluviometría ^c	N	N	H	H	N	N	S	S	S	S

3.3.3 Inventario florístico

La diversidad vegetal, valorada como el porcentaje de especies de cada agrupación, estrato/subestrato o carácter bioindicador, respecto al total inventariado en cada zona, no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) que permitieran diferenciar las zonas de estudio (**Tabla 3.4**). Por esto, en la **Figura 3.3** se muestran las 107 especies vegetales inventariadas, en las tres parcelas de cada una de las dos zonas de estudio (Allande y Caso), clasificadas en base al tipo de estrato/subestrato al que pertenecen. Y en la **Figura 3.4** se representa la distribución porcentual del 75 % de las especies inventariadas que son consideradas bioindicadoras, perteneciendo algunas de ellas a más de un carácter bioindicador.

Tabla 3.4. Porcentaje de especies vegetales (% sp veg) inventariadas para cada estrato/subestrato y carácter bioindicador de las 107 especies inventariadas en Allande y Caso (media \pm EE). ^a Valor de p obtenido por ANOVA, comparación de medias, $n=3$. ^bSólo en una parcela de cada zona se observaron especies con carácter bioindicador nitrófilo.

Clasificación	% sp veg Allande	% sp veg Caso	p ^a
ESTRATO			
Herbáceo	28.7 \pm 1.2	19.3 \pm 5.0	0.145
Helechal	5.6 \pm 1.4	2.8 \pm 0.93	0.180
Herbal	23.1 \pm 1.6	16.5 \pm 4.1	0.212
Arbustivo	6.5 \pm 0.55	6.5 \pm 1.4	1.000
Subarbustivo	3.4 \pm 0.63	2.8 \pm 0.52	0.483
Arbustivo	3.1 \pm 0.30	3.7 \pm 0.93	0.553
Arbóreo	6.8 \pm 0.82	6.6 \pm 1.9	0.902
CARÁCTER BIOINDICADOR			
Nitrófilo ^b	0.6	0.3	-
Acidófilo	13.7 \pm 0.30	9.7 \pm 2.2	0.139
Forestal	29.3 \pm 2.2	25.2 \pm 5.2	0.513

La estimación del porcentaje de recubrimiento de las especies inventariadas en las parcelas permitió la asignación de un índice de abundancia-dominancia (I A-D) que mostró diferencias significativas entre las dos localidades en estudio, Allande y Caso, para el estrato arbóreo y en el grupo con carácter bioindicador forestal, presentando Caso I A-D superiores a los de Allande, en ambos casos (**Tabla 3.5**). Todas las especies arbóreas identificadas en las parcelas de estudio están también clasificadas como forestales. La diferencia más notable observada para este grupo de especies es la mayor presencia de *Acer pseudoplatanus* L., con un I A-D de 2.67 en Caso y 1 en Allande y de *Fraxinus excelsior* L., que presenta en Caso un I A-D = 2, en las dos parcelas en las que se encontró, y en Allande un I A-D = 1, en una única parcela. Por el contrario, *C. sativa* Miller, especie objeto de estudio, sin llegar a presentar diferencias significativas, está más presente en Allande (I A-D = 2.67) que en Caso (I A-D = 2) lo que estaría en

consonancia con la situación más favorable para la especie reflejada por un mayor IS (**Tabla 3.1**). Conedera *et al.* (2016) destacan la temperatura, luz y duración del periodo seco como las principales exigencias climatológicas para *C. sativa*, siendo la temperatura y la luz parámetros favorables en Allande, como ya se comentó en apartados anteriores. Otra Fagaceae, *Quercus pyrenaica* Willd., se encontró en Allande (I A-D = 2 en dos de las parcelas) y no en Caso lo que nos lleva a pensar que la primera de las ubicaciones tiene un ambiente más favorable no sólo para el castaño, sino quizá también para otras fagáceas. Roces-Díaz *et al.* (2014) sitúan a *Q. pyrenaica* en zonas de clima submediterráneo, clima en el que, al menos, durante un mes del estío la precipitación media ($L m^{-2}$) es inferior 2.8 veces a la temperatura media ($^{\circ}C$) de ese mismo período (Rivas-Martínez, 2008). Este clima submediterráneo es el asignado a las parcelas de Allande según el índice de Vernet obtenido para estas (**Tabla 3.2**).

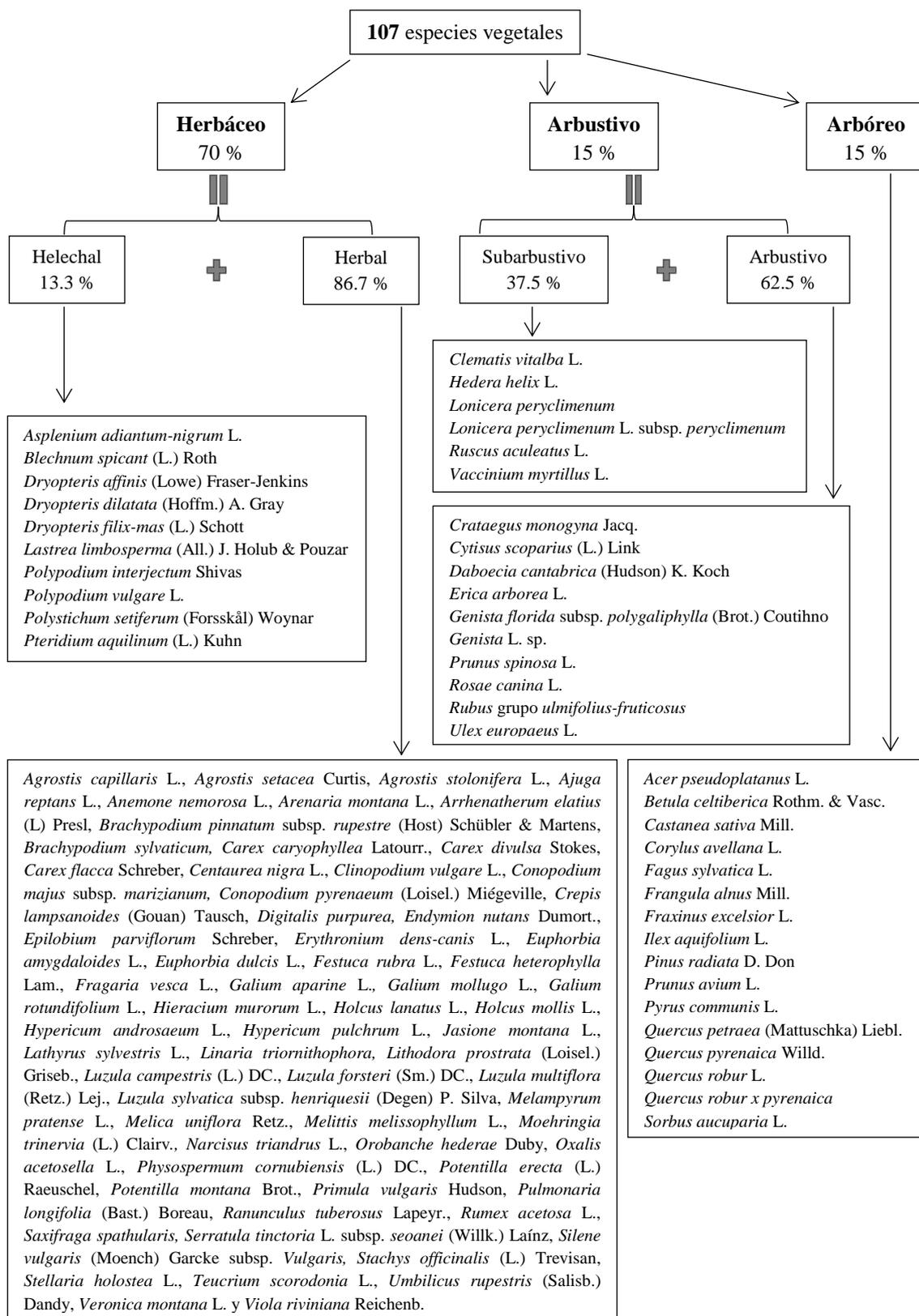


Figura 3.3. Especies vegetales identificadas en el inventario florístico realizado en las parcelas de las zonas de estudio, con sus correspondientes porcentajes en función del estrato vegetal al que pertenecen.

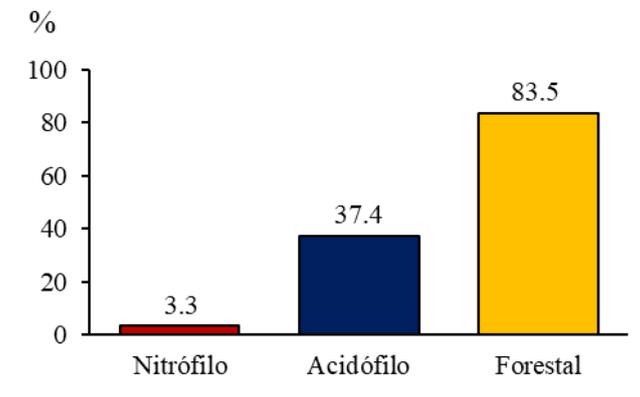


Figura 3.4. Porcentaje del carácter bioindicador de las especies inventariadas en las zonas de estudio.

Tabla 3.5. Índices de abundancia-dominancia de especies vegetales (I A-D sp veg) inventariadas en Allande y Caso para cada estrato/subestrato y carácter bioindicador (media \pm EE). * Diferencia significativa entre zonas (ANOVA, comparación de medias, $p \leq 0.05$, $n=3$). ^a Sólo en una parcela de cada zona se observaron especies con carácter bioindicador nitrófilo.

Clasificación	I A-D sp veg Allande	I A-D sp veg Caso
ESTRATO		
Herbáceo	1.500 \pm 0.052	1.633 \pm 0.073
Helechal	1.61 \pm 0.19	1.70 \pm 0.15
Herbal	1.500 \pm 0.056	1.607 \pm 0.079
Arbustivo	1.89 \pm 0.11	1.89 \pm 0.16
Subarbustivo	2.18 \pm 0.096	2.06 \pm 0.24
Arbustivo	1.58 \pm 0.13	1.78 \pm 0.11
Arbóreo	1.46* \pm 0.022	1.91* \pm 0.15
CARÁCTER BIOINDICADOR		
Nitrófilo ^a	1.16 \pm 0.67	0.33 \pm 0.33
Acidófilo	1.66 \pm 0.065	1.80 \pm 0.14
Forestal	1.620* \pm 0.021	1.800* \pm 0.061

El análisis florístico de una zona complementa los estudios edafoclimáticos, ya que suele ser un indicador más estable y permanente que estos, pues aunque algunas especies vegetales tienen un tiempo de vida corto (estacional o anual), y, por lo tanto, su inventario depende del momento puntual en el que se realice, otras especies, como las arbóreas, tienen tiempos de vida largos (años), lo que nos sirve para estimar la caracterización de la zona o su tendencia a más largo plazo. Así, el carácter bioindicador valorado en este apartado complementaría, con un respaldo temporal más amplio, las

anotaciones climatológicas realizadas en los últimos años (2012-2018) y los análisis edáficos realizados de forma puntual.

3.3.4 Suelo

La información agroecológica de las dos localidades en estudio, Allande y Caso, según los Mapas de Clases Agrológicas y Usos Agrarios Generales (escala 1:50000) del Principado de Asturias (SITPA-IDEAS, 2012) indica que las parcelas de Allande se encontrarían en las clases VII, subclase en transición a VIII, y VIII, caracterizadas por pendientes del 30 al 50 % con suelos someros y alta pedregosidad, en la primera clase, y mayores de 50 % con un muy escaso espesor del suelo y afloramientos frecuentes, en la segunda. Las parcelas de Caso se encontrarían también en una clase VII, subclase "e" (mayores riesgos de erosión) y "s" (limitaciones de suelo que afectan al desarrollo radical), y con presencia de VI, caracterizada por pendientes más moderadas, 20-30 % y suelos someros con pedregosidad abundante, con igual subclases "e" y "s".

SITPA-IDEAS (2012) clasifica los suelos de Allande y Caso como Dystrudept húmico, muy abundante en el conjunto del Principado de Asturias, pero especialmente en su mitad occidental, y Dystrudep típico, también muy presente en esta comunidad, pero en la mitad oriental. Por tanto, y según las Claves para la Taxonomía del Suelo (Soil Survey Staff, 2006), el suelo en las parcelas de Allande se espera “ácido a fuertemente ácido y bien drenado, caracterizado por la presencia de un horizonte oscurecido por abundante materia orgánica humificada y moderadamente espeso, con frecuencia estos suelos presentan un horizonte intermedio con propiedades marcadamente distintas de las del material original. Siendo “el contenido en materia orgánica mayor del 1 % en el horizonte superficial, cuyo espesor mínimo es de 18 cm y máximo de 50 cm, saturación en bases de este horizonte inferior al 50 %, y del conjunto del suelo inferior al 60 %”. El suelo en las parcelas de Caso sería también “ácido a fuertemente ácido y bien drenado. Caracterizado por la presencia de un horizonte superficial oscuro y somero, con escasa materia orgánica humificada, bajo la cual se desarrolla un horizonte con propiedades bien diferenciadas del material original. Con la presencia de horizonte de diagnóstico cámbico y una saturación en bases del conjunto del suelo inferior al 60 %”.

Según SITPA-IDEAS (2012), Allande presenta suelos con factores taxonómicos limitantes de segundo nivel, que son aquellos asociados a limitaciones menores y corregibles, mientras que en Caso son de primer nivel, es decir, fuertemente limitantes del uso agrario y no corregibles.

El castaño es una especie que se desarrolla mejor sobre suelos silíceos, aunque podría tolerar calcáreos si están bien drenados (Afif-Khoury *et al.*, 2011). Las condiciones en Asturias, en general, resultan favorables para esta especie, no obstante, las características mencionadas de las zonas estudiadas parecen relacionarse con la situación favorable de las parcelas de Allande.

En el análisis fisicoquímico realizado en los suelos de las tres parcelas en cada una de las dos zonas de estudio (**Tabla 3.6** y **Figura 3.5**) se observa que las diferencias entre ambas zonas en los parámetros evaluados son escasas. En otras comunidades autónomas como Extremadura (Rubio & Gandullo, 1994), Navarra (Rubio *et al.*, 1997) y Cataluña (Rubio *et al.*, 1999), y ya se obtuvieron resultados similares, no encontrándose grandes diferencias entre las distintas zonas donde se desarrolla el castaño. Las diferencias significativas entre ambas localidades se centran en el pH, mayor en Allande, y en la concentración de iones calcio, extraídos y cuantificados en el extracto acuoso 1:2 (m/v), junto con la CIC, que en ambos casos es superior en las parcelas de Caso (**Tabla 3.6**). Respecto a la textura de los suelos, las diferencias entre zonas se observan en el porcentaje (m/m) de arena, mayor en Allande, y el de arcilla, mayor en Caso (**Figura 3.5**). Estas diferencias en la composición de arcilla, limo y arena hacen que los suelos de Allande se clasifiquen como de textura franco-arcillo-arenosa y los de Caso como franco-arcillosa. La textura no parece ser un parámetro muy limitante para el castaño, siempre que no se produzca encharcamiento (Conedera *et al.*, 2016). En Cataluña se localizan montes de castaño en terreno franco, franco-arenoso y franco-limoso; en Extremadura preferiblemente en terreno franco y franco-arcilloso y franco-limoso en Navarra. No obstante, en Asturias, con un régimen de precipitación alto y continuado, quizá la mayor proporción de arcilla en las parcelas de Caso, junto con la mayor precipitación recibida en esta zona (**Tablas 3.2** y **3.3**) y una orientación en umbría (**Tabla 3.1**), esté resultando desfavorable para esta especie. Este mayor porcentaje de arcilla, en detrimento del de arena, en los suelos de Caso respecto a los de Allande, dificultaría el drenaje del agua de lluvia, formando suelos más húmedos. Humedad observada en los mayores valores obtenidos para la diversidad de especies vegetales con este carácter bioindicador (**Tabla 3.4**) y en su correspondientes I A-D (**Tabla 3.5**) en Caso. Pero además, el mayor contenido de arcilla en los suelos de Caso estará contribuyendo a su mayor CIC, considerada muy alta, frente a la de Allande, que sería media, ya que la componente en MO, que también influye en la CIC, es menor en las parcelas de Caso, aunque no de forma significativa, tal y como cabía esperar de la clasificación de los suelos de occidente y oriente mencionada con anterioridad.

Tabla 3.6. Análisis fisicoquímico del suelo de Allande y Caso (media ± EE). * Diferencia significativa entre zonas (ANOVA, comparación de medias, $p \leq 0.05$, $n=3$). ^a Concentración de protones expresada como pH del extracto acuoso en el que se han extraído y cuantificado el resto iones de este grupo. ^b SAR: Relación de adsorción de sodio. ^c CIC: Capacidad de intercambio catiónico. ^d Sat Na (%): Porcentaje de saturación de sodio. ^e MO: Materia orgánica. ^f C Org: Carbono orgánico. ^g N tot: Nitrógeno total. ^h C/N: Relación carbono/nitrógeno.

Zona	Iones extraídos con H ₂ O 1:2 m/v (meq Kg ⁻¹)										Cationes intercambiables (meq Kg ⁻¹)					
	H ⁺ (pH) ^a	Na ⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	SAR ^b	HCO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Ca ²⁺	CIC ^c	Sat Na (%) ^d
Allande	5.30* (±0.15)	0.51 (±0.14)	0.200 (±0.040)	1.44 (±0.053)	0.193 (±0.013)	0.21* (±0.11)	0.75 (±0.10)	0.33 (±0.13)	0.220 (±0.023)	0.927 (±0.067)	0.23 (±0.088)	4.0 (±1.8)	1.40 (±0.17)	3.7 (±1.5)	30.2* (±3.7)	0.86 (±0.40)
Caso	4.61* (±0.064)	0.54 (±0.26)	0.313 (±0.013)	2.17 (±0.37)	0.207 (±0.013)	0.60* (±0.040)	0.56 (±0.27)	0.60 (±0.12)	0.220 (±0.023)	0.987 (±0.044)	0.40 (±0.20)	2.2 (±0.79)	2.67 (±0.45)	4.6 (±2.3)	112.2* (±5.9)	0.35 (±0.17)
Zona	Elementos asimilables (mg Kg ⁻¹)										MO ^e	C Org ^f	N tot ^g	C/N ^h		
	B	Na	Mg	P	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	(%, m/m)	(%, m/m)	(%, m/m)			
Allande	0.587 (±0.066)	175 (±28)	507 (±214)	974 (±299)	626 (±79)	798 (±280)	14.4 (±6.8)	179 (±10)	2.67 (±0.92)	2.19 (±0.75)	6.6 (±1.7)	3.8 (±1.0)	0.283 (±0.044)	13.1 (±1.3)		
Caso	0.460 (±0.012)	216 (±16)	311 (±97)	380 (±11)	1123 (±165)	1040 (±474)	3.27 (±0.62)	157 (±18)	0.31 (±0.017)	2.04 (±0.54)	5.9 (±0.18)	3.4 (±0.10)	0.257 (±0.014)	13.3 (±0.52)		

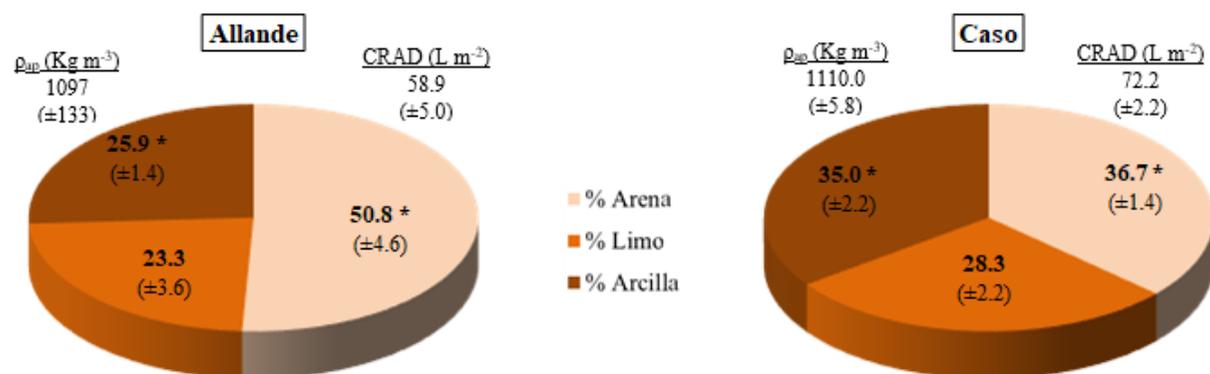


Figura 3.5. Densidad aparente (ρ_{ap}), capacidad de retención de agua disponible (CRAD) y porcentaje (% m/m) de las distintas texturas (granulometrías) del análisis fisicoquímico del suelo de las zonas de Allande y Caso (media ± EE). * Diferencia significativa entre zonas (ANOVA, comparación de medias, $p \leq 0.05$, $n=3$).

De los parámetros edáficos diferenciales entre ambas zonas de estudio, el pH puede llegar ser uno de los más influyentes, pues aunque el castaño es una especie que se desarrolla bien desde pH ácido a neutro, en función de este valor, la asimilación de nutrientes por parte de la planta es diferente, y por lo tanto los castaños se desarrollaran de forma distinta, almacenando diferentes cantidades de ciertos elementos o compuestos en sus órganos (Laroche *et al.*, 1997), no siempre con efectos favorables, como es el caso de la solubilidad de ciertos elementos tóxicos para las plantas en suelos ácidos (Iqbal, 2012). Kerr y Evans (1993) acotan el rango de pH óptimo para el castaño entre 4.0 y 4.5, mientras que Bourgeois *et al.* (2004) lo establecen entre 4.5 y 6.5. El rango de 3.44 a 4.74 encontrado en el trabajo de Afif-Khoury *et al.* (2011) se considera fuertemente ácido. En nuestro estudio, la menor acidez edáfica observada en los suelos de los castañares de Allande (5.30 frente al 4.61 en Caso), se asociaría con la mejor calidad de los castañares de esta zona, debido a la influencia de este parámetro en la asimilación de los nutrientes, si bien el pH no afecta por igual a todos, ya que, para algunos, como el Fe se puede ver favorecida su disponibilidad a pH bajo, mientras que Ca y Mg disminuyen en accesibilidad. El Ca, más abundante en las parcelas de pH más ácido, probablemente compense esta menor disponibilidad, pero el Mg si pudiera llegar a ser limitante, siendo este uno de los elementos destacados en el trabajo de Afif-Khoury *et al.* (2011) en relación con el IS en Asturias. El suelo más ácido de Caso concuerda con la mayor presencia (I A-D) de especies acidófilas en esta zona (**Tabla 3.5**), a pesar de tener un menor porcentaje de estas (**Tabla 3.4**), es decir, menor diversidad vegetal acidófila, pero mayor abundancia en estos suelos más ácidos.

La MO obtenida en los suelos de las zonas de estudio es más elevada de lo esperado (**Tabla 3.6**). Afif-Khoury *et al.* (2011), también para castañares asturianos, establecen los límites entre 2.09 a 5.28 % de MO. En otras comunidades, como Cataluña, el porcentaje medio de MO en la capa superior del suelo está por debajo del 3 % (Rubio *et al.*, 1999). En estos altos porcentajes de la MO obtenidos para ambas zonas, Allande presenta valores superiores, lo que coincide con la caracterización y descripción edáfica para los suelos del occidente asturiano y su menor acidez.

López (2005) destaca la gran importancia de la relación C/N en la valoración de la fertilidad del suelo, considerando que un suelo es fértil cuando esta relación se halla en torno a 10. Este valor marca el equilibrio entre estos dos elementos para que la microflora edáfica que actúa en la descomposición y mineralización de la MO requiera C como fuente de energía y N como intermediario en la síntesis de proteínas. Si la relación C/N en la MO es elevada, los microorganismos disponen de C en abundancia, pero carecen de N, con lo cual son pocos los que pueden actuar degradándola. Como consecuencia, el proceso de mineralización se ralentiza, y el N amoniacal o los nitratos asimilables por las plantas superiores se encontrarán en baja cantidad en el suelo. La relación C/N obtenida en los suelos de nuestras parcelas, 13.1 en Allande y 13.3 en Caso (**Tabla 3.6**), se correspondería según López (2005) con un humus mull forestal, propio de suelos de clima templado o cálido, donde la relación C/N varía entre 12 y 15, y donde la actividad microbiana se ve favorecida por estas condiciones. El valor medio

de la relación C/N obtenido por Afif-Khoury *et al.* (2011) para castañares asturianos (14.18) también está dentro de este rango, al igual que el obtenido por Rubio *et al.* (1999) en Cataluña (12.39).

A pesar de las pocas diferencias significativas en el análisis fisicoquímico de los suelos, que creemos debidas a la alta variabilidad de estos parámetros en las parcelas de cada ubicación, se aprecia que los elementos asimilables son en su mayoría más altos en las parcelas de Allande, con la excepción de Ca, K y Na, cuya proporción es superior en Caso, quizá debido a su mayor CIC, que hace que el equilibrio de estos elementos en solución sea más alto. La presencia de una cantidad superior de los cationes de estos tres elementos tiene, en ocasiones, efectos negativos sobre la asimilación de otros nutrientes como es el Mg, cuya importancia para el castaño ya ha sido mencionada por otros autores (Portela *et al.*, 2003, 2010). No obstante, estos autores fijan los valores normales de la relación K/Mg entre 1 y 9, para caducifolios, y un límite de 7 para el castaño, estando los valores en ambas parcelas en ese rango y por debajo del límite (1.23 para Allande y 3.61 para Caso). Para la relación Ca/Mg se fija como límite 1 para la deficiencia en Ca y 5 para la deficiencia en Mg, estando ambas parcelas dentro de estos límites y por tanto sin deficiencia de estos elementos.

En los castañares del Principado de Asturias, algunos parámetros edáficos se consideran tanto o más determinantes que el clima en la definición del IS (Afif-Khoury *et al.*, 2011). Tal es el caso ya mencionado del contenido en Mg intercambiable, que fue el factor más explicativo de la productividad de los montes de castaño. Por otro lado, Menéndez-Miguélez *et al.* (2015), aplicando algoritmos estadísticos por separado a las variables climáticas y edáficas en los castañares asturianos, obtuvieron que las más importantes para explicar el IS de estos castañares eran las climáticas (47 % frente al 24 % de las edáficas), destacando como variables edáficas más influyentes en el incremento de IS, el mayor porcentaje de arcilla, el menor pH y la menor pedregosidad. Sin embargo, cuando analizaron conjuntamente las variables climáticas con las edáficas, relacionaron positivamente el mayor porcentaje de arena en los suelos asturianos con mayor IS, dato que corroboraría Allande como un buen emplazamiento para el castaño (**Figura 3.5**).

Estas propiedades del suelo están directamente relacionadas con la disponibilidad de nutrientes, sin embargo, la asimilación, distribución y acumulación de estos nutrientes en la planta es un proceso complejo. Algo tan aparentemente esperado como puede ser la relación entre las propiedades del suelo y la disponibilidad de nutrientes con la concentración de estos en las hojas, no siempre se constata (Arrobas *et al.*, 2018).

3.3.5 Estatus nutricional foliar

En la **Tabla 3.7** se muestran los resultados obtenidos del análisis químico elemental foliar realizado en las hojas de los castaños de las zonas de estudio, Allande y

Caso. Las diferencias significativas se observan en el contenido en N y P, presentando valores superiores de N las hojas de los árboles desarrollados en Caso, y superiores en P las de los árboles de Allande.

Tabla 3.7. Análisis químico elemental foliar de *Castanea sativa* en las zonas de Allande y Caso (media \pm EE). * Diferencia significativa entre zonas (ANOVA, comparación de medias, $p \leq 0.05$, $n=3$).

Elemento Químico	Zona	
	Allande	Caso
N (% m/m)	2.22* (± 0.12)	2.64* (± 0.073)
P (% m/m)	0.270* (± 0.029)	0.143* (± 0.0088)
K (% m/m)	1.000 (± 0.026)	1.106 (± 0.030)
Ca (% m/m)	0.490 (± 0.093)	0.443 (± 0.078)
Mg (% m/m)	0.430 (± 0.074)	0.300 (± 0.026)
Na (% m/m)	0.0100 (± 0)	0.0033 (± 0.0033)
B (mg kg ⁻¹)	18.8 (± 2.8)	21.3 (± 0.65)
Mn (mg kg ⁻¹)	1150 (± 85)	1083 (± 142)
Fe (mg kg ⁻¹)	85.6 (± 3.4)	91.7 (± 4.9)
Zn (mg kg ⁻¹)	26.6 (± 1.2)	30.3 (± 1.5)
Cu (mg kg ⁻¹)	9.48 (± 0.89)	8.95 (± 0.65)
Mo (mg kg ⁻¹)	<0.100 (\pm -)	<0.100 (\pm -)

La realización del análisis elemental foliar se llevó a cabo para intentar ver si el estado nutricional de los castaños era diferente a pesar de las pocas diferencias encontradas en el contenido de nutrientes del suelo. En general, el estado nutricional de una planta se refleja mejor en el contenido mineral de sus hojas (Portela & Louzada, 2005). Sin embargo, la ausencia de correlación entre la disponibilidad de los elementos del suelo y su concentración en hoja es un aspecto también observado (Arrobas *et al.*, 2018). En este sentido, vemos como el contenido en N foliar es menor en las hojas de los castaños de Allande (**Tabla 3.7**), aun cuando el contenido en nitratos (NO₃⁻) es igual en las dos ubicaciones y el N total, ligeramente superior en Allande. En la rizosfera, la mayor parte del N se encuentra en forma orgánica por lo que los valores de N total no son muy indicativos ya que la planta es capaz de utilizar solamente el N en forma de NO₃⁻ o de amonio (NH₄⁺). A pHs ácidos la planta se nutre fundamentalmente de NO₃⁻ y con esta absorción suele producirse un incremento del pH que hace que esté más disponible el NH₄⁺. Con la absorción de NH₄⁺ ocurriría lo contrario, bajaría el pH y pasaría a estar más disponible el NO₃⁻. Esta conocida regulación del pH por la

asimilación alterna de estos dos iones es poco probable que se esté produciendo en ambas ubicaciones, dado el carácter ácido de su suelo y, por tanto, la fuente fundamental de N será el NO_3^- que, aunque igual de abundante en ambas ubicaciones, podría estar más disponible en Caso por su mayor acidez respecto a Allande. El N orgánico afecta de forma indirecta a la disponibilidad de N para la planta, influenciada por parámetros tales como la presencia de microorganismos capaces de transformarlo por mineralización, desnitrificación y pérdida en forma gaseosa, adsorción a coloides arcillo-húmicos y lixiviación.

Interpretar el mayor contenido de N observado en las hojas de los castaños de Caso (2.64 %) como excesivo para las concentraciones adecuadas en plantas, 1.5 % (Barceló *et al.*, 1987), y por lo tanto considerar este valor como parte de la fase tóxica donde un exceso del elemento influye negativamente en el desarrollo vegetal, aportaría un argumento más a la peor calidad de los castañares de Caso, pero sin datos documentados de curvas de acción (curvas de cosecha), para este elemento y especie vegetal, y no diferenciándose demasiado este valor de los publicados por otros autores [1.53-1.80 (Leonardi *et al.*, 1996), 2.01 (Santa Regina, 2000), 2.81 (Toprak & Seferoğlu, 2013) y 2.12 % (Portela *et al.*, 2015)], es difícil poder confirmar esta relación. Ahora bien, la mayor acumulación de N en forma de NO_3^- en la planta cuando la radiación solar es insuficiente es un fenómeno conocido y descrito para hortalizas de hoja, como puede ser *Brassica alboglabra* (He *et al.*, 2015), por su posible efecto tóxico en la alimentación humana.

Respecto a la diferencia encontrada en el contenido de P en las hojas de los castaños de Caso (0.143 %) (**Tabla 3.7**), y utilizando el mismo planteamiento explicativo usado para el N, pero ahora en el extremo contrario, se puede considerar el contenido de P, inferior a los publicados por otros autores [0.250-0.280 (Leonardi *et al.*, 1996), 0.24 (Santa Regina, 2000), 0.18 (Toprak & Seferoğlu, 2013) y 0.171 % (Portela *et al.*, 2015)], como deficiente para la concentración adecuada en plantas, 0.2 % (Barceló *et al.*, 1987), y por lo tanto que el elemento en cuestión influya negativamente en el desarrollo vegetal, lo que aportaría otro aspecto más a tener en cuenta en la peor calidad de los castañares de Caso. La diferencia en el P foliar entre ambas zonas (0.270 % frente a 0.143 % en Allande y Caso, respectivamente) (**Tabla 3.7**), puede relacionarse con el mayor contenido de este elemento en el suelo de Allande y con un pH más favorable, menos ácido, para la asimilación de este nutriente. El P es un elemento muy poco móvil y cuya absorción está limitada por parámetros ambientales, tales como la temperatura, además de por el ya mencionado pH. Las condiciones de las parcelas de Caso, a este respecto, también resultan desfavorables por tener unas temperaturas mínimas inferiores.

La relación N/P en hojas es un parámetro interesante a tener en cuenta. Aerts & Chapin (1999) proponen que una relación N/P en hojas en torno a 10 es óptima para el crecimiento de la planta, aunque este valor varíe considerablemente entre especies. Esta relación en las hojas de los castaños de las parcelas de Allande toma un valor de 8.2, muy cercano al óptimo y, sin embargo, en Caso estaría desplazado al N (18.5), lo que

conduce a confirmar que las características, desde el punto de vista nutricional, son más desfavorables para esta última zona.

No obstante, el P no ha sido considerado como uno de los elementos más importantes y limitantes para el desarrollo del castaño, tal y como ocurre con el Mg o el B (Arrobas *et al.*, 2017). Los niveles de B encontrados en las hojas de los castaños situados en las parcelas de estudio estarían en el límite inferior según el rango descrito en las publicaciones más recientes (Arrobas *et al.*, 2017, 2018), de 20 a 100 mg kg⁻¹, y el Mg en valores intermedios dentro del rango 0.2-0.6 %. Respecto a los otros dos macronutrientes importantes en el desarrollo vegetal, K y Ca, se encuentran en valores medios y en el límite inferior, respectivamente, según los rangos de los autores mencionados (**Tabla 3.7**).

Por tanto, entre las zonas de estudio, el porcentaje en N y P en las hojas, y sobre todo la relación entre ambos, establecen las diferencias significativas, siendo Allande la zona que muestra un valor óptimo para el crecimiento vegetal. Estas diferencias foliares no se correspondieron con los parámetros edáficos, que se centraron en un mayor pH, menor concentración de Ca²⁺, menor CIC, menor porcentaje de arcilla y mayor de arena en Allande. No obstante, como ya se ha dicho, esta relación no siempre se produce de forma directa, ya que todo el proceso de absorción, transporte y acumulación o transformación de los elementos minerales no es un proceso sencillo, formando parte del proceso tejidos que actúan como reserva, como es en ocasiones el tronco del árbol. En este sentido, Hevia *et al.* (2018) sugieren que, debido a la actividad celular de la albura, tanto la deposición elemental en esta, como el intercambio y los procesos de transporte entre este tejido y el duramen, actúan y son reflejo del estado nutricional del árbol (DeWalle *et al.*, 1991; Hietz *et al.*, 2015). La translocación elemental de la madera, a menudo, presenta diferencias en una misma especie ubicada en distintos sitios, dependiendo de la absorción que se produzca desde las raíces y el intercambio de nutrientes en las hojas (Andrews *et al.*, 1999).

3.3.6 Análisis químico elemental del tronco

Los resultados del análisis dendroquímico de la madera (duramen y albura) realizado en discos de castaños de las zonas de estudio, Allande y Caso, se muestran en la **Figura 3.6**. Entre albura y duramen se aprecian diferencias significativas en cuatro elementos (Ca, K, Fe y Mn), siendo la albura la que muestra valores superiores. Entre zonas, las diferencias son significativamente favorables a Allande para el K, en duramen y albura, y el Mn, sólo en albura, mientras que son favorables a Caso en el Mg, para ambos tejidos. De entre los elementos analizados destaca el Ca en cuanto a la correspondencia con los anillos de crecimiento del árbol (**Figura 3.7**), mostrando un claro incremento en los crecimientos de primavera (madera temprana), al igual que obtuvieron Scharnweber *et al.* (2016) para esta misma especie. Hietz *et al.* (2015) observaron esta correspondencia en *Chukrasia tabularis*, corroborándola con la observación de cristales de Ca fuertemente incorporados en el parénquima que marca

los límites del anillo de crecimiento. En coníferas también se comprobó esta relación (Silkin & Ekimova, 2012; Hevia *et al.*, 2018). Poussart *et al.* (2006), además de relacionar el Ca con el crecimiento anual de *Miliusa velutina*, correlacionan significativamente las intensidades máximas de este elemento en los anillos de crecimiento con las lluvias monzónicas de la zona durante la estación seca, sugiriendo un vínculo entre la cantidad de Ca y la variabilidad subanual en la precipitación. Un incremento de las precipitaciones durante cortos periodos de tiempo puede aumentar la biodisponibilidad de nutrientes, sin embargo, si estas precipitaciones se prolongan en el tiempo podrían favorecer la pérdida de nutrientes por lixiviación, en especial en suelos ácidos (St. Clair *et al.*, 2008). Algunos autores (Peterson & Anderson, 1990; Österås, 2004; Poussart *et al.*, 2006) vinculan ésta marcada presencia del Ca en los anillos de crecimiento a su posible unión a pectinas, principal componente de la lámina media de la pared celular, lo que estaría en concordancia con el papel estructural de este elemento en las células (Martin *et al.* 2001).

La notable diferencia entre la albura y el duramen en la mayoría de los elementos analizados es debido a la naturaleza de estos tejidos, claramente diferencial en estas dos partes. Esta diferencia es más marcada para el K, Mn y, en menor medida, Ca. El incremento de estos tres elementos en la albura se aproximaría a un modelo exponencial, incrementando de este modo la dispersión de datos globales (**Figura 3.6**), resultados similares a los obtenidos por Hevia *et al.* (2018) en *Pinus uncinata*. A medida que las células se van muriendo y la madera lignificándose (duramen), ciertos elementos migran, o son atraídos, hacia tejidos más activos (albura) donde son necesarios para el desarrollo fisiológico de la planta.

Algunos autores plantean que la diferente composición elemental del duramen y la albura podría estar relacionada con la disponibilidad de los elementos en el suelo, lo que implicaría un control ambiental directo sobre la resorción de nutrientes de la madera (Andrews *et al.*, 1999; Meerts, 2002; Hevia *et al.*, 2018). Otros, sin embargo, plantean si esto depende más del envejecimiento del árbol o de influencias ambientales (Smith & Shortle, 2003).

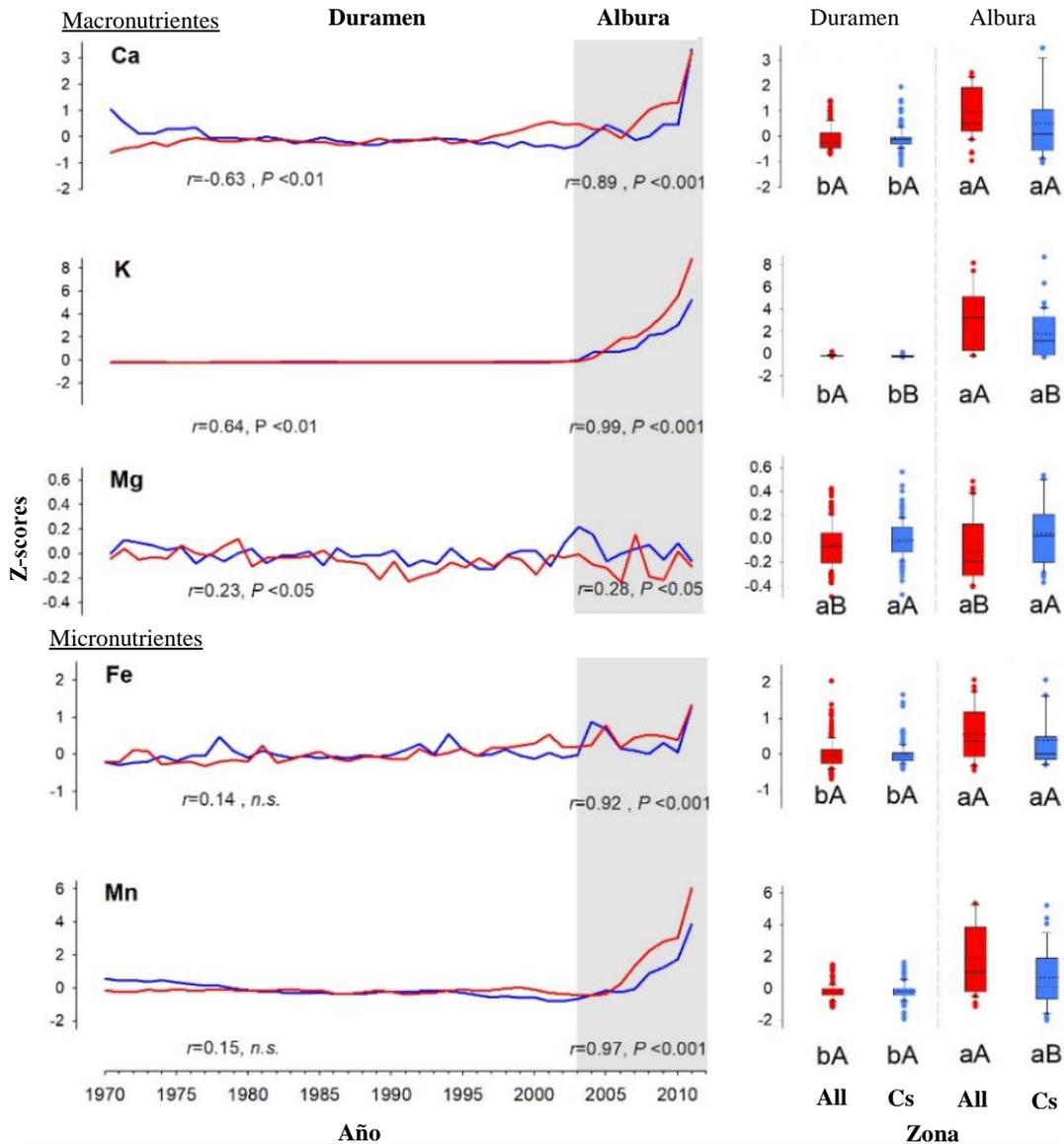


Figura 3.6. Series temporales medias de los valores normalizados (Z-scores) (izquierda) de los macronutrientes (Ca, K y Mg) y micronutrientes (Fe y Mn) para *Castanea sativa* en Allande (All y rojo) y Caso (Cs y azul). El área gris representa la albura para las muestras estudiadas. Se presenta la correlación (r , Pearson) entre series para cada elemento en el duramen (izquierda) y la albura (derecha) y su nivel de significación (P). n.s.: Diferencias no significativas ($P > 0.05$). Diagramas de cajas (derecha) y diferencias en los elementos (Z-scores) en una misma zona entre duramen y albura (letras minúsculas) y entre zonas para duramen o albura (letras mayúsculas) para el periodo común 1970-2011. Letras diferentes indican diferencias significativas (HSD Tukey).

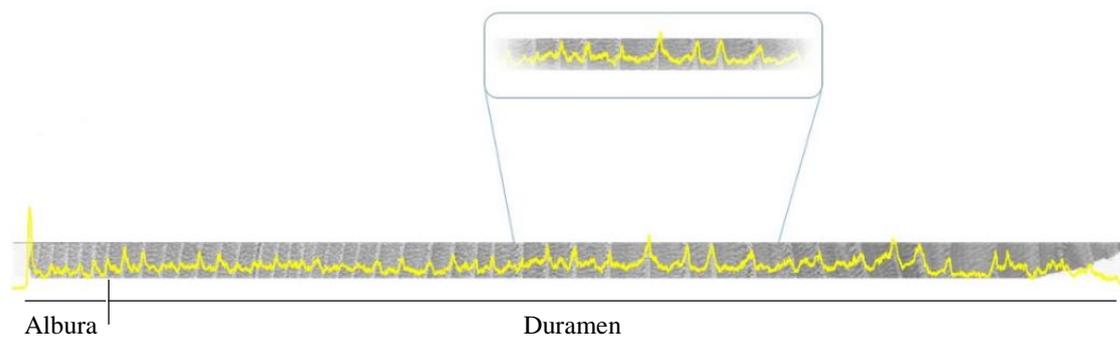


Figura 3.7. Perfil de Ca (amarillo) en una muestra de madera de castaño de Caso.

Además de los requerimientos nutricionales que pudieran existir en el tejido en crecimiento de la planta, la movilidad de los elementos en la madera es menor en aquellos con cargas más altas, que se unen más fuertemente a la pared celular en comparación con los alcalinos (Hietz *et al.*, 2015). La movilidad de los cationes en el xilema de un árbol se ve fuertemente afectada por el intercambio de estos, siendo menos móviles (mayor capacidad de fijación) cuanto mayor sea su valencia (carga) y diámetro atómico (Hoffmann *et al.*, 1994). Esta explicación fisicoquímica del movimiento elemental de los cationes tiene que complementarse con las necesidades y mecanismos biológicos. Una movilidad limitada de algunos elementos, por su capacidad para formar complejos estables y fuertemente retenidos en las paredes celulares, impediría su translocación, explicando así por qué algunos elementos pueden proporcionar más información histórica de las perturbaciones reales sufridas por el árbol que otros (Monticelli *et al.*, 2009). La movilidad (translocación) que se puede asignar a los elementos analizados en nuestro análisis dendroquímico es bastante variada. Esta variación, posiblemente debida al reparto desproporcionado de la afinidad química de los cationes y de los requerimientos biológicos de estos por la planta, es complicada de explicar, ya que es difícil conocer totalmente el entorno y el destino vegetal de estos elementos.

A pesar de la ausencia de diferencias significativas globales entre las dos localidades para el Ca y el Mn en el duramen, los resultados del análisis en los anillos correspondientes a los años 70 muestran un mayor contenido en Caso. Esto puede ser debido a la diferencia de edad de los castaños en las zonas de estudio (54.7 años de media para los castaños dominantes apeados en Allande, y 47.5 para los de Caso) que condiciona la asimilación de estos elementos, siendo superior en árboles más jóvenes. La permeabilidad del Ca en la raíz (endodermis) varía según maduración, siendo en estados inmaduros muy elevada y disminuyendo con la edad (Díaz *et al.*, 2007). Además de esta diferente capacidad de captación de nutrientes en función de la edad del árbol, recordar que el contenido de Ca^{2+} analizado en los suelos de Caso fue significativamente superior al obtenido en Allande (**Tabla 3.6**). En los años intermedios se observa que Ca y Mn se igualan en ambas zonas, y en los últimos, en la albura y final del duramen, se invierte el resultado, pasando a mostrar niveles superiores en Allande,

llegando a ser significativos para el Mn en la albura. El mayor contenido de Ca en los últimos 8 años de crecimiento del duramen de los castaños de Allande respecto a los de Caso se observa claramente en la representación gráfica temporal para este elemento (**Figura 3.6**). Este mayor contenido de Ca en Allande en estos años podría estar relacionado con el mayor IS encontrado para los castañares de esta zona (**Tabla 3.1**), ya que elevados niveles de este elemento pueden relacionarse con mayores crecimientos en diámetro del tronco (Österås, 2004). Ca y Mn muestran un comportamiento similar, como también lo encontraron Martin *et al.* (2001), sugiriendo una función estructural para ambos elementos y proponiendo la competencia entre ellos por los sitios de intercambio de cationes en las paredes celulares. La serie temporal obtenida para el Mn resulta bastante similar a la observada por Scharnweber *et al.* (2016) también para *C. sativa* en Asturias, ya que se observa una ligera disminución de este elemento a lo largo de los años en que se formó el duramen, y valores significativamente superiores en la albura de Allande respecto a la de Caso.

En la **Figura 3.6** se observa como el K es el elemento que muestra un comportamiento diferencial más claro y llamativo entre el duramen y la albura. Además de la evidente diferenciación entre duramen y albura, el contenido casi nulo de este elemento en el duramen (dato no mostrado, pero apreciable en los datos sin normalizar) y su considerable presencia en los tejidos más recientes, da una idea de la movilidad de este catión monovalente, siempre a favor de los últimos años de crecimiento del árbol, y muy probablemente relacionada con las propiedades fisicoquímicas iónicas comentadas con anterioridad. Resultado acorde con la tendencia decreciente desde la corteza a la médula que Scharnweber *et al.* (2016) observaron en *C. sativa* y *P. sylvestris* L. Colin-Belgrand *et al.* (1996) destacaron el K como el elemento más móvil en su estudio de translocación interna de nutrientes en el tronco de *C. sativa*, con una translocación que alcanzó aproximadamente el 60 %. Este considerable aumento de K en la transición de duramen a albura también se ha encontrado en especies como *Quercus robur* (Smith *et al.*, 2014) o *P. uncinata* (Hevia *et al.*, 2018). Peterson & Anderson (1990), mediante análisis químico de la madera de *P. contorta* variedad *murrayana* y *P. albicaulis*, también encontraron esta diferencia de K entre los tejidos más jóvenes y los de mayor edad, atribuyendo esta translocación al proceso de formación de la madera, destacando que el K no tiene un papel estructural en las plantas, pero si otras funciones de gran importancia para éstas (catalíticas, osmóticas, turgentes, estomáticas, de desarrollo celular y fotosintéticas) (Coskun *et al.*, 2014), de ahí su movimiento radial hacia tejidos más activos, como la albura. La presencia significativamente superior de este elemento en duramen y albura para los árboles de Allande pone de manifiesto que, a pesar de que el análisis fisicoquímico del suelo (**Tabla 3.6**) y el foliar (**Tabla 3.7**) no alcance a mostrar diferencias significativas entre localidades, las condiciones más favorables de las parcelas de Allande (mayor IS) parecen favorecer la presencia de este elemento en estos tejidos.

El Mg y Fe no muestran tendencias claras, debido a su mayor variabilidad en el tiempo. De hecho, el Mg es el único elemento de los analizados que no muestra

diferencia entre duramen y albura, y que su contenido medio, en ambos tejidos, es significativamente superior en Caso, lo que resulta llamativo, pues en esta localidad la disponibilidad del elemento en el suelo como catión intercambiable y elemento asimilable es menor (**Tabla 3.6**), aunque no significativamente, como también se observó en hoja (**Tabla 3.7**). Bondietti *et al.* (1990) proponen migraciones centrípetas para el Mg debidas a la mayor afinidad de este elemento por la madera envejecida, llegando incluso a valorar la sustitución de Ca por Mg o Mn. Si, además de esto, se tiene en cuenta la alta solubilidad del Mg y su facilidad para el transporte en la planta (Peterson & Anderson, 1990; Cakmak & Yazici, 2010), podría justificarse la gran variabilidad de este elemento encontrada en nuestras muestras. En cuanto al Fe, su transporte a través del xilema es predominantemente formando complejos (quelatos) en su forma Fe^{3+} , aunque, debido a su relativa facilidad para cambiar su estado de oxidación ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) en función del ligando al que acompañe, resulta de especial importancia en los sistemas redox biológicos (Juárez *et al.*, 2007). Por esta particular reactividad tan dependiente de ciertos compuestos quelantes puede ser debida la elevada variabilidad observada de este elemento en nuestras muestras. Su funcionalidad, más fisiológica que estructural justificaría su mayor presencia en albura.

En la inmovilización de ciertos cationes, por unión a determinados compuestos de la madera, hay que destacar que muy probablemente una parte importante de estos compuestos sean fenoles, más concretamente taninos, ya que este tipo de compuestos tienen una demostrada capacidad de quelación (captación) de iones elementales (Psoťová *et al.*, 2003; Michalak, 2006; Liang *et al.*, 2008; Karamać, 2009). Teniendo en cuenta que las condiciones ambientales donde crecen los árboles influyen, además de en su composición, crecimiento y desarrollo, en el metabolismo secundario y, por ende, en la concentración de los compuestos fenólicos de sus tejidos y órganos (Kraus *et al.*, 2004), el análisis de estos compuestos es necesario para una mejor comprensión de los procesos bioquímicos vegetales.

3.3.7 Composición fenólica de la corteza, albura y duramen del tronco

El perfil fenólico en corteza (exterior e interior), albura y duramen de *C. sativa* que se muestra en la **Tabla 3.8** esta desglosado en FT, que indican el contenido total de este tipo de compuestos, TC y TH, diferenciando en estos últimos Gts y Ets. TC y TH agrupan una parte de los compuestos fenólicos de alta masa molecular, entre 500 y 30000 Da (Serrano *et al.*, 2009). Estos resultados muestran diferencias significativas en los FT, TC y TH de la corteza exterior, en los TC de la corteza interior, en los FT y TC de la albura, y en los FT del duramen. Salvo en los TC de la corteza exterior, donde los valores son superiores en Caso, el resto de los compuestos fenólicos analizados lo son en Allande. Generalizando el mayor contenido fenólico en tronco para los árboles de Allande, y considerando el mayor contenido en Ca observado en los últimos años de crecimiento de los árboles de esta zona (**Figura 3.6**), se confirmaría el efecto inductivo

que produce este elemento en la producción de compuestos fenólicos a nivel fisiológico en las plantas (Finger *et al.*, 2006; Giel & Bojarczuk, 2011; Ngadze et al., 2014).

Tabla 3.8. Composición fenólica de la corteza, albura y duramen de los castaños en las zonas de Allande y Caso (\pm EE). * Diferencia significativa entre zonas (ANOVA, comparación de medias, $p \leq 0.05$, $n = 27$ para FT y TC, y $n = 9-17$ para TH). ^a Fenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico por g de peso seco). ^b Taninos Condensados (mg equivalentes de (+)-catequina por g de peso seco). ^c Taninos Hidrolizables. ^d Galotaninos (mg de galato de metilo por g de peso seco). ^e Elagitatinos (mg de ácido elágico por g de peso seco).

Tejido	Zona	FT ^a (mg EAG g ⁻¹ _{ps})	TC ^b (mg EC g ⁻¹ _{ps})	TH ^c	
				Gts ^d (mg GM g ⁻¹ _{ps})	Ets ^e (mg AE g ⁻¹ _{ps})
Corteza Exterior	Allande	121.6* (\pm 3.1)	0.497* (\pm 0.044)	11.62* (\pm 0.99)	7.39* (\pm 0.62)
	Caso	80.8* (\pm 3.5)	0.686* (\pm 0.052)	6.91* (\pm 0.48)	4.84* (\pm 0.27)
Corteza Interior	Allande	78.7 (\pm 4.6)	1.76* (\pm 0.38)	9.2 (\pm 1.4)	5.34 (\pm 0.64)
	Caso	68.8 (\pm 2.7)	0.71* (\pm 0.084)	7.3 (\pm 0.71)	5.03 (\pm 0.76)
Albura	Allande	36.2* (\pm 1.6)	0.506* (\pm 0.037)	3.44 (\pm 0.50)	3.19 (\pm 0.65)
	Caso	13.8* (\pm 1.6)	0.288* (\pm 0.045)	1.82 (\pm 0.69)	1.72 (\pm 0.70)
Duramen	Allande	82.4* (\pm 2.6)	0.457 (\pm 0.037)	12.0 (\pm 1.6)	10.3 (\pm 1.3)
	Caso	70.3* (\pm 5.1)	0.346 (\pm 0.050)	8.8 (\pm 1.7)	7.8 (\pm 1.7)

Como se comentó en el apartado anterior, la movilidad o fijación de algunos elementos depende de la unión de estos a ciertos compuestos, entre los que están los fenoles. La mayor afinidad del Mg por la madera envejecida (Bondietti *et al.*, 1990) puede ser debida al mayor contenido fenólico presente en el duramen respecto a la albura, como puede apreciarse en nuestros resultados (**Tabla 3.8**). Meerts (2002) señala que durante la conversión de la albura en duramen se produce una extensa translocación de compuestos químicos, los secundarios, entre los que están los compuestos fenólicos, tienden a acumularse en el duramen, y los de almacenamiento, como almidón, azúcares solubles, aminoácidos y elementos minerales, migran de los anillos de albura senescentes a los más recientes.

En otras fagáceas, como el roble, se sabe que el principal factor que influye en la composición de elagitatinos es la especie, pero que también tiene importancia el nicho ecológico en el que crecen y que la madera de verano tiene un contenido superior a la de primavera (Prida *et al.*, 2006). Vivas (2005) expone que la gestión del monte, así como el IS en el que crecen los árboles, determina el engrosamiento de los troncos al modificar el crecimiento de primavera y verano, y por tanto el ancho de los anillos. Así, los árboles gestionados, o aquellos que crecen en buena CE, presentan anillos mayores y con mayor proporción de madera de verano, lo que también modifica la composición de

la madera, tanto a nivel de macromoléculas implicadas en las propiedades mecánicas (polisacáridos o ligninas), como de sustancias extraíbles (elagitaninos, ácidos y aldehídos fenólicos, cumarinas, etc.).

La relación entre la disponibilidad de nutrientes, la asimilación de estos por la planta y la capacidad de crecimiento de cualquier especie es directa, sin embargo, la relación entre la disponibilidad de nutrientes y el acúmulo de fenoles y taninos suele ser inversa para los tejidos foliares y no siempre se correlaciona en raíz (Kraus *et al.*, 2004). La razón que justifica esta relación inversa se basa en el hecho de que un exceso de C, con deficiencia en otros nutrientes, deriva la actividad metabólica hacia el metabolismo secundario rico en C, como los fenoles. Esta hipótesis se fundamenta en el hecho de que se encuentra en general mayor concentración de estos compuestos en plantas deficientes nutricionalmente y cultivadas en atmosfera rica en CO₂ o con mayor aporte de luz (Kraus *et al.*, 2003). Dado que el análisis foliar no pone de manifiesto deficiencias en los nutrientes analizados, no podemos establecer una clara relación con el diferente perfil fenólico obtenido en las parcelas de las dos ubicaciones, sin embargo, si pudiera explicarse en base a una mayor proporción de C derivada de una mejor orientación y el mayor contenido fenólico de los tejidos analizados en los castaños de Allande estaría en concordancia con los efectos favorables que los compuestos fenólicos aportan a la planta.

No obstante, resulta llamativo el hecho de que en la corteza externa los TC sean más abundantes en los árboles de Caso. Funcionalmente, los fenoles se clasifican en dos grandes grupos, aquellos que se sintetizan de forma normal en el desarrollo de la planta y aquellos que se forman en respuesta a una agresión o paralelamente a la misma (Beckman, 2000). La presencia de células especializadas en la acumulación de fenoles, en forma reducida, se consideran un sistema de defensa que la planta pone en marcha ante la aparición de patógenos. Beckman (2000) explica como las células de almacenamiento fenólico actúan programando varios procesos de defensa frente a la rápida y extensa distribución de aquellos patógenos vasculares, como hongos, capaces de penetrar los vasos xilemáticos, germinando y esporulando rápidamente, con la amenaza que esto supone para la planta. En este sentido, se ha visto que los fenoles actúan como protectores vegetales frente a ciertos patógenos, como el hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands (Dinis *et al.*, 2011; Oßwald *et al.*, 2014), causante de la importante patología conocida como tinta del castaño. Actualmente, en el Principado de Asturias la incidencia de esta enfermedad es baja y no se ha visto la sintomatología producida por la misma en las parcelas de este estudio. Por el contrario, el chancro del castaño, enfermedad debida al hongo *C. parasitica*, está ampliamente extendido en esta Comunidad Autónoma, siendo su incidencia notable en las parcelas de Caso, y totalmente ausente en las de Allande (**Tabla 3.9**). En este sentido, la mayor concentración de taninos condensados de las cortezas exteriores de los árboles de las parcelas de Caso podría estar relacionada con la presencia de la enfermedad, pues se sabe que frente a infecciones fúngicas estos compuestos son liberados, oxidados y polimerizados, uniéndose a otras moléculas como proteínas o carbohidratos de la pared

celular, formando estructuras lignificadas de protección o componentes tóxicos para los patógenos (Beckman, 2000). La relación entre las proantocianidinas (TC) y la defensa frente a hongos ha sido establecida para otras especies (Panjehkeh *et al.*, 2010).

Tabla 3.9. Índice de chancro en campo (IChC) en las zonas de Allande y Caso (media \pm EE).

Parcela	Allande			Caso		
	1	2	3	1	2	3
IChC	0	0	0	7.28 (\pm 0.44)	5.89 (\pm 0.012)	5.25 (\pm 0.57)

Con la intención de constatar esta aparente relación de la presencia de chancro y la acumulación de TC en la corteza, se realizó un ensayo en condiciones controladas.

3.3.8 Crecimiento *in vivo* de *Cryphonectria parasitica* en ramas *ex situ*

Este ensayo pretende valorar el crecimiento en superficie de *C. parasitica* en la corteza y madera de ramas adultas de castaños de las parcelas de Allande y Caso. La corteza y la madera se inocularon con *C. parasitica* tanto por separado como conjuntamente (corteza+madera, con el inóculo entre ambos tejidos). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.8**.

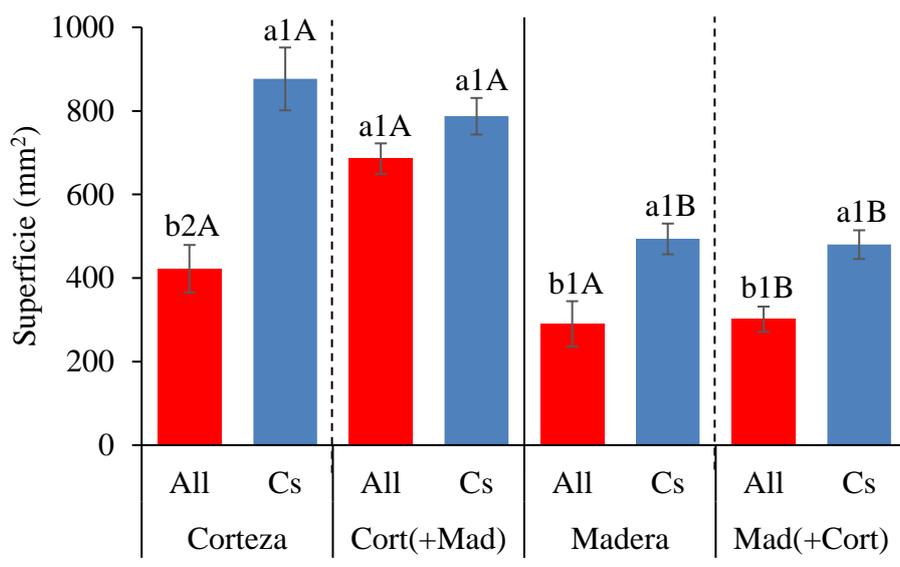


Figura 3.8. Crecimiento medio en superficie (mm^2) de *Cryphonectria parasitica* sobre la corteza (Cort) y madera (Mad) de las ramas de los castaños de Allande y Caso ensayadas separadamente y de forma conjunta. Las diferencias significativas se muestran con diferentes letras o números. Letras minúsculas entre zonas, números entre un mismo tejido de forma separada o conjunta y letras mayúsculas entre distintos tejidos separados o conjuntamente. ANOVA, *post hoc* DMS, $p \leq 0.05$, $n = 15$ para corteza y madera por separado, y $n = 30$ para corteza+madera. Las barras verticales sobre las columnas representan el EE.

Los resultados de este bioensayo corroboraron las diferencias observadas en campo, destacando el menor crecimiento de *C. parasitica* en las ramas de Allande respecto a las de Caso, tanto en corteza como madera por separado. Cuando el hongo crece entre la corteza y la madera (corteza+madera), con ambos tejidos en contacto, es curioso el considerable aumento del crecimiento en la corteza de las ramas de Allande respecto a este tejido ensayado de forma aislada, lo que hizo que la diferencia con el mismo tejido de la otra zona dejase de ser significativa, aunque manteniendo un crecimiento inferior en Allande. Los resultados obtenidos en madera son similares tanto de forma separada como conjunta, confirmando en ambos casos la mayor susceptibilidad de Caso. Destacar también, en general, el menor crecimiento producido en la madera.

La mayor susceptibilidad de las ramas procedentes de las parcelas de Caso en este ensayo *ex situ* indica que la mayor presencia de la enfermedad en los árboles de esta zona no se debe solo a un ambiente más favorable para el desarrollo del hongo o a la mayor presencia de la enfermedad en el entorno, como a priori se podría pensar, sino que, además, es también debida a la menor resistencia o mayor susceptibilidad de los árboles crecidos en estas condiciones aparentemente más desfavorables para estos. La deficiencia en P en las hojas de los árboles de estas parcelas (**Tabla 3.7**) puede relacionarse con su mayor susceptibilidad a *C. parasitica*, ya que está demostrado que frente a un déficit en este nutriente los vegetales reaccionan reduciendo sus defensas para fomentar la simbiosis con micorrizas que contribuyen a la asimilación de este elemento, priorizando de este modo la nutrición frente a la defensa (Castrillo et al., 2017). No obstante, las diferencias obtenidas entre zonas en el contenido fenólico de los distintos tejidos analizados del tronco (**Tabla 3.8**) podrían ser también una de las causas de la diferente tolerancia al chancro observada tanto en campo como en laboratorio. Hebard y Kaufman (1978) observaron una fuerte relación entre la resistencia a *C. parasitica* y el mayor contenido de TH en los tejidos callosos de cinco tipos de castaño con diferente grado de resistencia a este hongo. Estos mismos autores describen también la correlación negativa que encontraron de los TC con la resistencia al chancro. Todos los tejidos analizados de Allande tenían un mayor contenido en TH, aunque las diferencias solo fueron significativas en la corteza exterior. Para los TC se puede observar justo la dinámica contraria, que podría ser debida a la producción de estos compuestos en respuesta a la presencia de la enfermedad, muy extendida en Caso, por lo que sería más el efecto que la causa.

Que las diferentes condiciones edafoclimáticas condicionan tanto las propiedades físicas como las características químicas de la madera, entre las que se encuentra el perfil fenólico, es un aspecto definido y evaluado para las especies utilizadas en tonelería, fundamentalmente para el roble (Fernández de Simón &

Cadahía, 2007). Los anillos de crecimiento de la madera están constituidos por dos zonas bien diferenciadas tanto en propiedades físicas como en aporte de compuestos químicos, estas dos zonas constituyen los crecimientos de primavera y verano. Lógicamente el mayor potencial de desarrollo durante la estación de crecimiento estará mediado por la CE, que influirá en el ancho del anillo, determinado fundamentalmente por el crecimiento de verano, en sus propiedades físicas, como el grano y la textura, y en la composición química.

El mayor contenido fenólico en el tronco del castaño de las parcelas con mayor IS estaría relacionado con su mayor vigor, que a la vez se debe a unas condiciones ambientales más favorables que le permitirán mantener el crecimiento un periodo más largo de tiempo. De cualquier forma, relacionar el IS con el contenido fenólico no es sencillo, pero el hecho de que unas condiciones edafoclimáticas determinadas favorezcan el crecimiento y desarrollo de los castaños, como son las condiciones de Allande, además de un mayor contenido fenólico, es un aspecto interesante, tanto desde el punto de vista de las posibles defensas del árbol, como desde una perspectiva más productiva, dado que los fenoles y taninos juegan un papel importante en los productos derivados de la madera al actuar como protectores ultravioleta (Mahdavian *et al.*, 2008; Ramya & Balakrishnan, 2013; Inostroza-Blancheteau *et al.*, 2014; Galiñanes *et al.*, 2015) y antimicrobianos (García-Mateos & Pérez-Leal, 2003; Arruda *et al.*, 2016).

3.3.9 Durabilidad de la madera de castaño en función de su contenido fenólico

Con este ensayo tratamos de evaluar el efecto que tienen 2 tratamientos extractivos convencionales de la madera de castaño sobre la durabilidad de esta y determinar su relación con los FT en la madera tratada por estos procedimientos.

Las probetas de madera de castaño secada de forma mixta (natural más cámara de secado) se sometieron a dos tratamientos extractivos habituales de la madera, deslavado (según la norma UNE-EN 84:1997) y vaporización. El contenido fenólico (FT) y la durabilidad de estas muestras, antes y después de ser tratadas, junto con probetas de madera de haya sin tratar (muestra de referencia exigida por la norma UNE-EN 350-1:1995) se muestran en la **Tabla 3.10**.

Tabla 3.10. Fenoles totales (FT, mg equivalentes de ácido gálico por g de peso seco) (media \pm EE) y clases de durabilidad del duramen (según la norma UNE-EN 350:2016). * Madera de castaño tratada según la norma española UNE-EN 84:1997. ** Madera de castaño tratada por vaporización. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los distintos tipos de madera (ANOVA, *post hoc*, DMS, $p \leq 0.05$, $n=9$). 1: Muy durable, 2: Durable, 4: Poco durable y 5: No durable.

Madera	FT (mg EAG g _{ps} ⁻¹)	Clase de durabilidad	
		Teórica	Experimental
Haya	7.5 ^d (± 0.32)	5 (4)	5
Castaño	112.5 ^a (± 2.6)	2 (1)	1
CastEN84 *	91.2 ^b (± 6.9)		2
CastVap **	67.8 ^c (± 3.6)		2

En base a estos resultados se confirma la existencia de una relación entre los FT y la durabilidad de la madera, tanto entre diferentes especies, haya (*Fagus sylvatica* L.) frente a castaño (*C. sativa* Mill.), como entre maderas de una misma especie tratadas de distinta forma, según la norma española UNE-EN 84:1997 y por vaporización, en las que se eliminan sus compuestos extraíbles, tales como los fenoles. Por tanto, un mayor contenido fenólico implica una mayor resistencia de la madera frente al ataque por hongos basidiomicetos, como *C. puteana* y *T. versicolor*, utilizados en este ensayo.

La durabilidad natural de la madera de castaño, combinada con sus muy buenas propiedades mecánicas, hace que esta especie sea muy empleada en construcción (Militz *et al.*, 2003). En la bibliografía se recoge la relación entre esta durabilidad y el contenido en taninos (Eichhorn *et al.* 2017). Estos autores muestran una variación radial en la concentración de extractos fenólicos de madera de *C. sativa*, obteniendo un contenido en FT y Ets que aumenta desde la madera juvenil hasta el duramen. Ensayos similares al realizado por nosotros, pero para otras especies, también muestran la reducción de la durabilidad tras el lavado de sus maderas, y, por lo tanto, con la extracción de las sustancias solubles en agua, se corrobora su relación con la durabilidad de la madera (Aloui *et al.*, 2004; Bobadilla *et al.*, 2005; Niamké *et al.*, 2011).

En conclusión, los castañares de Allande, además de tener una mejor calidad productiva, también darían lugar a un producto maderero de mejor calidad, dada la positiva relación entre la composición fenólica y la durabilidad de la madera de castaño.

Entre las dos localidades en estudio, Allande y Caso, parece haber más similitudes de las esperadas en cuanto a características edafoclimáticas, sin embargo, algunos parámetros edáficos podrían relacionarse con la mayor calidad de Allande, como son un mayor pH, un menor porcentaje de arcilla y mayor contenido de arena. Desde el punto de vista climático, Allande estaría favorecida por la mejor orientación, que garantizaría mayor insolación, además de tener una menor oscilación térmica y menor humedad, por la menor pluviosidad y mayor incidencia del viento. Estas condiciones edafoclimáticas favorecerían el mejor estado nutricional de los árboles y reduciría la presencia de chancro, tanto por ser desfavorables para el crecimiento del hongo, como por favorecer una menor susceptibilidad, como demuestra el ensayo *ex situ*. El perfil fenólico diferencia de forma significativa ambas localidades pudiendo relacionarse el balance de estos compuestos con IS, calidad del producto final y susceptibilidad al chancro.

Directa o indirectamente, la presencia de árboles con distinta composición fenólica afectará a su entorno, modificando la pequeña fauna edáfica, y, por lo tanto, alterando la degradación de la materia orgánica y el ciclo de los nutrientes. Todos estos aspectos se abordarán en el siguiente capítulo.

3.4 BIBLIOGRAFÍA

Abreu, I. N. & Mazzafera, P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43 (3): 241-248.

AEMET (Agencia Estatal de Meteorología) (2010). Guía resumida del clima en España (1981-2010). Servicio de Banco Nacional de Datos Climatológicos, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (España).

Aerts, R. & Chapin III, F. S. (1999). The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research*, 30: 1-67.

Afif-Khouri, E.; Álvarez-Álvarez, P.; Fernández-López, M. J.; Oliveira-Prendes, J. A. & Cámara-Obregón, A. (2011). Influence of climate, edaphic factors and tree nutrition on site index of chestnut coppice stands in north-west Spain. *Forestry*, 84 (4): 385-396.

AIEF (Área de Inventario y Estadísticas Forestales) (2012). Cuarto Inventario Forestal Nacional: Principado de Asturias. Ed. Dirección General de Desarrollo Rural y Política Forestal del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (España). 58 pp.

Akula, R. & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6 (11): 1720-1731.

Al Harun, M. A. Y.; Johnson, J.; Uddin, M. N. & Robinson, R. W. (2015). Identification and phytotoxicity assessment of phenolic compounds in *Chrysanthemoides monilifera* subsp. *monilifera* (boneseed). *PLoS ONE*, 10 (10), e0139992: 1-19.

Álvarez, J. G., Barrio-Anta, M., Diéguez-Aranda, U. & Rojo, A. (2004). Metodología para la construcción de curvas de calidad de estación. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, 18: 303-309.

Álvarez-Álvarez, P.; Díaz-Varela, E.; Cámara-Obregón, A. & Afif-Khouri, E. (2010). Relating growth and nutrition to site factors in young chestnut plantations established on agricultural and forest land in northern Spain. *Agroforestry Systems*, 79 (3): 291-301.

Aloui, F.; Ayadi, N.; Charrier, F. & Charrier, B. (2004). Durability of European oak (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) against white rot fungi (*Coriolus versicolor*): relations with phenol extractives. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 62 (4): 286-290.

Amarowicz, R.; Weidner, S.; Wójtowicz, I.; Karamać, M.; Kosińska, A. & Rybarczyk, A. (2010). Influence of low-temperature stress on the changes in the composition of grapevine leaf phenolic compounds and their antioxidant properties. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 4 (1): 90-96.

Anadón, R. & Roqueñi, N. (2009). Evidencias y efectos potenciales del cambio climático en Asturias. Consejería de Medio Ambiente del Principado de Asturias (España). 366 pp.

Andrews, J. A.; Siccama, T. G. & Vogt, K. A. (1999). The effect of soil nutrient availability on retranslocation of Ca, Mg and K from senescing sapwood in Atlantic white cedar. *Plant and Soil*, 208 (1): 117-123.

Arrobas, M.; Afonso, S.; Ferreira, I. Q.; Moutinho-Pereira, J.; Correia, C. M. & Rodrigues, M. Â. (2017). Liming and application of nitrogen, phosphorus, potassium, and boron on a young plantation of chestnut. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41 (6): 441-451.

Arrobas, M.; Afonso, S. & Rodrigues, M. Â. (2018). Diagnosing the nutritional condition of chestnut groves by soil and leaf analyses. *Scientia Horticulturae*, 228: 113-121.

Arruda, R. L.; Paz, A. T. S.; Bara, M. T. F.; Côrtes, M. V. D. C. B.; Filippi, M. C. C. D. & Conceição, E. C. D. (2016). An approach on phytoalexins: function, characterization and biosynthesis in plants of the family *Poaceae*. *Ciência Rural*, Santa Maria, 46 (7): 1206-1216.

Assmann, E. (1970). The principles of forest yield study: studies in the organic production, structure, increment and yield of forest stands. Pergamon Press, Oxford, Reino Unido. 506 pp.

Barceló, J.; Nicolás, G.; Sabater, B. & Sánchez, R. (1987). Nutrición mineral. En *Fisiología vegetal*, Pirámide (edit.), Madrid, 4ª ed. actualizada: 193-214.

Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57 (3): 101-110.

Bezerra, A. S.; Nörnberg, J. L.; Lima, F. O.; da Rosa, M. B. & de Carvalho, L. M. (2013). Parâmetros climáticos e variação de compostos fenólicos em cevada. *Ciência Rural*, Santa Maria, 43 (9): 1546-1552.

Bobadilla, E. A.; Pereyra, O.; Silva, F. & Stehr, A. M. (2005). Durabilidad natural de la madera de dos especies aptas para la industria de la construcción. *Floresta*, 35 (3): 419-428.

Bobinaitė, R.; Viškelis, P. & Venskutonis, P. R. (2012). Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132 (3): 1495-1501.

Bondietti, E. A.; Momoshima, N.; Shortle, W. C. & Smith, K. T. (1990). A historical perspective on divalent cation trends in red spruce stemwood and the hypothetical

relationship to acidic deposition. *Canadian Journal of Forest Research*, 20 (12): 1850-1858.

Bošel'a, M.; Máliš, F.; Kulla, L.; Šebeň, V. & Deckmyn, G. (2013). Ecologically based height growth model and derived raster maps of Norway spruce site index in the Western Carpathians. *European journal of forest research*, 132 (5-6): 691-705.

Bourgeois, C; Sevrin, E. & Lemaire, J. (2004). *Le châtaignier: un arbre, un bois*. 2^a edición. Institut pour le Développement Forestier, Paris. 347 pp.

Cabrera, M. & Ochoa, F. (1997). Tablas de producción de castaño (*Castanea sativa* Mill.) tratado en monte bajo, en Asturias. *Actas Congreso Forestal IRATI 97 (II Congreso Forestal Español - I Congreso Forestal Hispano Luso)*, Pamplona (España). Puertas, F. & Rivas, M. eds., 97: 131-136.

Cakmak, I. & Yazici, A. M. (2010). Magnesium: a forgotten element in crop production. *Better Crops*, 94 (2): 23-25.

Capuz, R. (2005). *Materiales orgánicos. Maderas*. Ed. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia (España). 279 pp.

Castaño, J. A. (2007). *Plantas alóctonas invasoras en el Principado de Asturias*. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras y Obra Social "la Caixa", Asturias (España). 190 pp.

Castrillo, G.; Teixeira, P. J. P. L.; Paredes, S. H.; Law, T. F.; De Lorenzo, L.; Feltcher, M. E.; Finkel, O. M.; Breakfield, N. W.; Mieczkowski, P.; Jones, C. D.; Paz-Ares, J. & Dangl, J. L. (2017). Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. *Nature*, 543 (7646): 513-518.

Castro, H. F.; Classen, A. T.; Austin, E. E.; Norby, R. J. & Schadt, C. W. (2010). Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (4): 999-1007.

Castroviejo, S.; Laínz, M.; López Gonzalez, G.; Montserrat, P.; Muñoz Garmendia, F.; Paiva, J. & Villar, L. (eds.) (1990). *Flora Iberica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Volumen II: Platanaceae-Plumbaginaceae (partim)*. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid. 897 pp.

Cheng, F. & Cheng, Z. (2015). Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1020: 1-16.

Ciordia, M.; Feito, I.; Pereira-Lorenzo, S.; Fernández, A. & Majada, J. (2012). Adaptive diversity in *Castanea sativa* Mill. half-sib progenies in response to drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 78: 56-63.

- Codilan, A. L.; Nakajima, T.; Tatsuhara, S. & Shiraishi, N. (2015). Estimating site index from ecological factors for industrial tree plantation species in Mindanao, Philippines. *Bulletin of the Tokyo University Forests*, 133: 19-41.
- Colin-Belgrand, M.; Ranger, J. & Bouchon, J. (1996). Internal nutrient translocation in chestnut tree stemwood: III. Dynamics across an age series of *Castanea sativa* (Miller). *Annals of Botany*, 78 (6): 729-740.
- Conedera, M.; Tinner, W.; Krebs, P.; de Rigo, D. & Caudullo, G. (2016). *Castanea sativa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. En: San-Miguel-Ayanz, J.; de Rigo, D.; Caudullo, G.; Houston Durrant, T. & Mauri, A. (Eds.), *European Atlas of Forest Tree Species* (Publications Office of the European Union, Luxembourg): 78-79.
- Coskun, D.; Britto, D. T. & Kronzucker, H. J. (2014). The physiology of channel-mediated K⁺ acquisition in roots of higher plants. *Physiologia Plantarum*, 151 (3): 305-312.
- Curt, T.; Bouchaud, M. & Agrech, G. (2001). Predicting site index of Douglas-Fir plantations from ecological variables in the Massif Central area of France. *Forest Ecology and Management*, 149 (1): 61-74.
- DeWalle, D. R.; Swistock, B. R.; Sayre, R. G. & Sharpe, W. E. (1991). Spatial variations of sapwood chemistry with soil acidity in Appalachian forests. *Journal of Environmental Quality*, 20 (2): 486-491.
- Díaz, A.; Cayón, G. & Mira, J. J. (2007). Metabolismo del calcio y su relación con la "mancha de madurez" del fruto de banano. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 25 (2): 280-287.
- Díaz, T. E. (2010). Caracterización de los Hábitats de Interés Comunitario (Red Natura 2000) existentes en el Principado de Asturias. II. Bosques y arbustadas arborescentes. *Boletín de Ciencias de la Naturaleza RIDEA* N° 51: 213-276.
- Díaz-Varela, R. A.; Álvarez-Álvarez, P.; Diaz-Varela, E. & Calvo-Iglesias, S. (2011). Prediction of stand quality characteristics in sweet chestnut forests in NW Spain by combining terrain attributes, spectral textural features and landscape metrics. *Forest ecology and management*, 261 (11): 1962-1972.
- Dinis, L.-T.; Peixoto, F.; Zhang, C.; Martins, L., Costa, R. & Gomes-Laranjo, J. (2011). Physiological and biochemical changes in resistant and sensitive chestnut (*Castanea*) plantlets after inoculation with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75 (4): 146-156.
- Directiva 92/43/CEE, del Consejo, de 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 206 (22 de julio de 1992): 7-50.

Dixon, R. A. & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7 (7): 1085-1097.

Docherty, K. M.; Borton, H. M.; Espinosa, N.; Gebhardt, M.; Gil-Loaiza, J.; Gutknecht, J. L.; Maes, P. W.; Mott, B. M.; Parnell, J. J.; Purdy, G.; Rodrigues, A. P.; Stanish, L. F.; Walser, O. N. & Gallery, R. E. (2015). Key edaphic properties largely explain temporal and geographic variation in soil microbial communities across four biomes. *PLoS ONE*, 10 (11): e0135352.

Eichhorn, S.; Erfurt, S.; Hofmann, T.; Seegmueller, S.; Németh, R. & Hapla, F. (2017). Determination of the phenolic extractive content in sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood. *Wood Research*, 62 (2): 181-196.

EN 113:1996/A1:2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against Wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.

Evans, S. E. & Wallenstein, M. D. (2014). Climate change alters ecological strategies of soil bacteria. *Ecology letters*, 17 (2): 155-164.

Fernández, J. M. (2004). Árboles y arbustos naturales de Asturias. *Obra Social y Cultural Cajastur*, 296 pp.

Fernández de Simón, B. & Cadahía, E. (2007). Tratamiento de la madera de roble para tonelería. *Enología*, 4 (IV): 1-18.

Finger, A.; de Bastos, A.; Ferrarese-Filho, O. & Lucio, M. L. (2006). Role of calcium on phenolic compounds and enzymes related to lignification in soybean (*Glycine max* L.) root growth. *Plant Growth Regulation*, 49 (1): 69-76.

Fürstenberg-Hägg, J.; Zagrobelny, M. & Bak, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (5): 10242-10297.

Galiñanes, C.; Freire, M. S. & González-Álvarez, J. (2015). UV protection effects of phenolic extracts from chestnut fruit and forest industries residues. *European journal of wood and wood products*, 73 (6): 731-739.

Gallardo-Lancho, J. F. (2001). Distribution of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) forests in Spain: possible ecological criteria for quality and management (focusing on timber coppices). *Forest Snow and Landscape Research*, 76 (3): 477-481.

García, A.; Díaz-González, T.E.; Majada, J. & Ciordia, M. (2014). Flora vascular acompañante en masas de monte bajo de castaño en Asturias. *Tecnología Agroalimentaria - SERIDA*, 14: 33-40.

García-Mateos, R. & Pérez-Leal, R. (2003). Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 9 (1): 5-10.

Gelsomino, A.; Araniti, F.; Lupini, A.; Princi, G.; Petrovičová, B. & Abenavoli, M.A. (2015). Phenolic acids in plant-soil interactions: a microcosm experiment. *Journal of Allelochemical Interactions*, 1 (1): 25-38.

Giel, P. & Bojarczuk, K. (2011) Effects of high concentrations of calcium salts in the substrate and its pH on the growth of selected rhododendron cultivars. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 80 (2): 105-114.

Gomes-Laranjo, J.; Dinis, L.-T.; Martins, L.; Portela, E.; Pinto, T.; Ciordia, M.; Feito, I.; Majada, J.; Peixoto, F.; Pereira, S.; Ramos, A. M.; Zhang, C.; Martins, A. & Costa, R. (2012). Characterization of chestnut behavior with photosynthetic traits. Capítulo 3, en: *Applied Photosynthesis*. Mohammad Mahdi Najafpour (Ed.): 47-80.

González, F. & Anadón, R. (2011). Análisis de escenarios de cambio climático en Asturias. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras del Principado de Asturias. Viceconsejería de Medio Ambiente. Oficina para la Sostenibilidad, el Cambio Climático y la Participación. 121 pp.

Hartzfeld, P. W.; Forkner, R.; Hunter, M. D. & Hagerman, A. E. (2002). Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (7): 1785-1790.

He, J.; Lim, L. I. & Qin, L. (2015). Growth irradiance effects on productivity, photosynthesis, nitrate accumulation and assimilation of aeroponically grown *Brassica alboglabra*. *Journal of Plant Nutrition*, 38 (7): 1022-1035.

He, H.; Wang, H.; Fang, C.; Wu, H.; Guo, X.; Liu, C.; Lin, Z. & Lin, W. (2012). Barnyard grass stress up regulates the biosynthesis of phenolic compounds in allelopathic rice. *Journal of plant physiology*, 169 (17): 1747-1753.

Hebard, F. V. & Kaufman, P. B. (1978). Chestnut callus cultures: Tannin content and colonization by *Endothia parasitica*. *Proceedings of the American Chestnut Symposium*. W.L. MacDonald, F.C. Cech, J. Luchok and C. Smith, (eds.), West Virginia University Press: 63-70.

Hevia, A.; Sánchez-Salguero, R.; Camarero, J. J.; Buras, A.; Sangüesa-Barreda, G.; Galván, J. D. & Gutiérrez, E. (2018). Towards a better understanding of long-term wood-chemistry variations in old-growth forests: A case study on ancient *Pinus uncinata* trees from the Pyrenees. *Science of the Total Environment*, 625: 220-232.

Hietz, P.; Horsky, M.; Prohaska, T.; Lang, I. & Grabner, M. (2015). High-resolution densitometry and elemental analysis of tropical wood. *Trees*, 29 (2): 487-497.

Hoffmann, E.; Lüdke, C.; Scholze, H. & Stephanowitz, H. (1994). Analytical investigations of tree rings by laser ablation ICP-MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 350 (4-5): 253-259.

- Inostroza-Blancheteau, C.; Reyes-Díaz, M.; Arellano, A.; Latsague, M.; Acevedo, P.; Loyola, R.; Arce-Johnson, P. & Alberdi, M. (2014). Effects of UV-B radiation on anatomical characteristics, phenolic compounds and gene expression of the phenylpropanoid pathway in highbush blueberry leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 85: 85-95.
- Inoue, K. H. & Hagerman, A. E. (1988). Determination of gallotannin with rhodanine. *Analytical Biochemistry*, 169 (2): 363-369.
- Iqbal, M. T. (2012). Acid tolerance mechanisms in soil grown plants. *Malaysian Journal of Soil Science*, 16: 1-19.
- Iwashina, T. (2003). Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biological Sciences in Space*, 17 (1): 24-44.
- Juárez Sanz, M.; Cerdán, M. & Sánchez-Sánchez, A. (2007). Hierro en el sistema suelo-planta. Departamento de Agroquímica y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Universidad de Alicante: 1-22.
- Karamać, M. (2009) Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by Tannin Constituents of Selected Edible Nuts. *International Journal of Molecular Sciences*, 10 (12): 5485-5497.
- Kerr, G. & Evans, J. (1993). Growing broadleaves for timber. Forestry Commission, N° 9. HMSO, London. 95 pp.
- Kraus, T. E.; Dahlgren, R. A. & Zasoski, R. J. (2003). Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. *Plant and Soil*, 256 (1): 41-66.
- Kraus, T. E.; Zasoski, R. J. & Dahlgren, R. A. (2004). Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin concentrations in foliage and roots. *Plant and Soil*, 262 (1-2): 95-109.
- Król, A.; Amarowicz, R. & Weidner, S. (2014). Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of long-term drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36 (6): 1491-1499.
- Kula, E. & Lazorič, M. (2015). Comparison of Myriapoda in beech and spruce forests. *Journal of Forest Science*, 61 (7): 306–314.
- Kumar, L.; Mahatma, M. K.; Kalariya, K. A.; Bishi, S. K. & Mann, A. (2014). Plant phenolics: important bio-weapon against pathogens and insect herbivores. *Popular Kheti*, 2 (3): 149-152.
- Laroche, A.; Freyssac, V.; Rahmani, A.; Verger, J. P. & Morvan, H. (1997). Growth and mineral content of young chestnut trees under controlled conditions of nutrition. *Annales des sciences forestières*, 54 (7): 681-693.

- Larsson, S.; Wirén, A.; Lundgren, L. & Ericsson, T. (1986). Effects of light and nutrient stress on leaf phenolic chemistry in *Salix dasyclados* and susceptibility to *Galerucella lineola* (Coleoptera). *Oikos*, 47 (2): 205-210.
- Leonardi, S.; Santa Regina, I.; Rapp, M.; Gallego, H. A. & Rico, M. (1996). Biomass, litterfall and nutrient content in *Castanea sativa* coppice stands of southern Europe. *Annales des Sciences Forestières*, 53 (6): 1071-1081.
- Li, Z. H.; Wang, Q.; Ruan, X.; Pan, C. D. & Jiang, D. A. (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15 (12): 8933-8952.
- Liang, D.; Wang, J.; Wang, Y.; Wang, F. & Jiang, J. (2008) Behavior of tannins in germanium recovery by tannin process. *Hydrometallurgy*, 93 (3-4), 140-142.
- López, A. J. (2005). Manual de edafología. Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química. Universidad de Sevilla (España).
- Luck, G.; Liao, H.; Murray, N. J.; Grimmer, H. R.; Warminski, E. E.; Williamson, M. P.; Lilley, T. H. & Haslam, E. (1994). Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, 37 (2): 357-371.
- Mahdavian, K.; Ghorbanli, M. & Kalantari, K. M. (2008). The effects of ultraviolet radiation on the contents of chlorophyll, flavonoid, anthocyanin and proline in *Capsicum annuum* L. *Turkish Journal of Botany*, 32 (1): 25-33.
- Manetti, M. C.; Amorini, E.; Becagli, C.; Conedera, M. & Giudici, F. (2001). Productive potential of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) stands in Europe. *Forest Snow and Landscape Research*, 76 (3): 471-476.
- Martin, R. R.; Sham, T. K.; Wong Won, G.; Jones, K. W. & Feng, H. (2001). Synchrotron x-ray fluorescence and secondary ion mass spectrometry in tree ring microanalysis: applications to dendroanalysis. *X-Ray Spectrometry*, 30 (5): 338-341.
- Meerts, P. (2002). Mineral nutrient concentrations in sapwood and heartwood: a literature review. *Annals of Forest Science*, 59 (7): 713-722.
- Menéndez-Miguélez, M.; Canga, E.; Barrio-Anta, M.; Majada, J. & Álvarez-Álvarez, P. (2013). A three level system for estimating the biomass of *Castanea sativa* Mill. coppice stands in north-west Spain. *Forest Ecology and Management*, 291: 417-426.
- Menéndez-Miguélez, M.; Álvarez-Álvarez, P.; Majada, J. & Canga, E. (2015). Effects of soil nutrients and environmental factors on site productivity in *Castanea sativa* Mill. coppice stands in NW Spain. *New Forests*, 46 (2): 217-233.
- Menéndez-Miguélez, M.; Álvarez-Álvarez, P.; Majada, J. & Canga, E. (2016). Management tools for *Castanea sativa* coppice stands in northwestern Spain. *Bosque (Valdivia)*, 37 (1): 119-133.

- Michalak, A. (2006) Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15 (4): 523-530.
- Mila, I.; Scalbert, A.; & Expert, D. (1996). Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry*, 42 (6): 1551-1555.
- Militz, H.; Busetto, D. & Hapla, F. (2003). Investigation on natural durability and sorption properties of Italian Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) from coppice stands. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 61 (2): 133-141.
- Moharramnejad, S.; Sofalian, O.; Valizadeh, M.; Asgari, A. & Shiri, M. (2015). Proline, glycine betaine, total phenolics and pigment contents in response to osmotic stress in maize seedlings. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 4 (3): 313-319.
- Monticelli, D.; Di Iorio, A.; Ciceri, E.; Castelletti, A. & Dossi, C. (2009). Tree ring microanalysis by LA-ICP-MS for environmental monitoring: validation or refutation? Two case histories. *Microchimica Acta*, 164 (1-2): 139-148.
- Ngadze, E.; Coutinho, T.A.; Icishahayo, D. & van der Waals, J.E. (2014) Effect of calcium soil amendments on phenolic compounds and soft rot resistance in potato tubers. *Crop Protection*, 62: 40–45.
- Niamké, F. B.; Amusant, N.; Charpentier, J. P.; Chaix, G.; Baissac, Y.; Boutahar, N.; Adima, A. A.; Kati-Coulibaly, S. & Jay-Allemand, C. (2011). Relationships between biochemical attributes (non-structural carbohydrates and phenolics) and natural durability against fungi in dry teak wood (*Tectona grandis* L. f.). *Annals of forest science*, 68 (1): 201-211.
- Oßwald, W.; Fleischmann, F.; Rigling, D.; Coelho, A. C.; Cravador, A.; Diez, J.; Dalio, R. J.; Horta Jung, M.; Pfanz, H.; Robin, C.; Sipos, G.; Solla, A.; Cech, T.; Chambery, A.; Diamandis, S.; Hansen, E.; Jung, T.; Orlikowski, L. B.; Parke, J.; Prospero, S. & Werres, S. (2014). Strategies of attack and defence in woody plant-*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology*, 44 (3): 169–190.
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (2011). *Compendium of International Methods of Analysis, Method OIV-MA-AS2-10 R2009 1* (extract of ISO 78-2:1999 Standards).
- Österås, A. H. (2004). Interactions between calcium and heavy metals in Norway spruce: Accumulation and binding of metals in wood and bark (Tesis Doctoral, Department of Botany, Faculty of Science, Stockholm University (Suecia)).
- Packalén, P.; Mehtätalo, L. & Maltamo, M. (2011). ALS-based estimation of plot volume and site index in a eucalyptus plantation with a nonlinear mixed-effect model that accounts for the clone effect. *Annals of Forest Science*, 68 (6): 1085-1092.

Panjehkeh, N.; Backhouse, D. & Taji, A. (2010). Role of proanthocyanidins in resistance of the legume *Swainsona formosa* to *Phytophthora cinnamomi*. *Journal of phytopathology*, 158 (5): 365-371.

Peraza, F. (2001). Protección preventiva de la madera. Asociación de Investigación Técnica de las Industrias de la Madera. 437 pp.

Pereira-Lorenzo, S.; Costa, R. M. L.; Ramos-Cabrer, A. M.; Ribeiro, C. A. M.; da Silva, M. F. S.; Manzano, G. & Barreneche, T. (2010). Variation in grafted European chestnut and hybrids by microsatellites reveals two main origins in the Iberian Peninsula. *Tree genetics & genomes*, 6 (5): 701-715.

Peterson, D. L. & Anderson, D. R. (1990). Content of Chemical Elements in Tree Rings of Lodgepole Pine and Whitebark Pine from a Subalpine Sierra Nevada Forest. Research Paper PSW-200. Berkeley, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, United States Department of Agriculture: 1-9.

Portela, E.; Ferreira-Cardoso, J.; Louzada, J. & Gomes-Laranjo, J. (2015). Assessment of boron application in chestnuts: Nut yield and quality. *Journal of plant nutrition*, 38 (7): 973-987.

Portela, E. & Louzada, J. (2005). Nutrient status of chestnut orchards. I. Relationship with incidence of blight. III International Chestnut Congress, ISHS Acta Horticulturae 693: 557-564.

Portela, E.; Pires, C. C. & Louzada, J. (2010). Magnesium deficiency in chestnut groves: the influence of soil manganese. *Journal of plant nutrition*, 33 (3): 452-460.

Portela, E.; Roboredo, M. & Louzada, J. (2003). Assessment and description of magnesium deficiencies in chestnut groves. *Journal of plant nutrition*, 26 (3): 503-523.

Poussart, P. M.; Myneni, S. C. B. & Lanzirrotti, A. (2006). Tropical dendrochemistry: A novel approach to estimate age and growth from ringless trees. *Geophysical Research Letters*, 33 (L17711): 1-5.

Prida, A.; Boulet, J. C.; Ducouso, A.; Nepveu, G. & Puech, J. L. (2006). Effect of species and ecological conditions on ellagitannin content in oak wood from an even-aged and mixed stand of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl. *Annals of forest science*, 63 (4): 415-424.

Psotová, J.; Lasovský, J. & Vicar, J. (2003) Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomedical Papers*, 147 (2): 147-53.

Ramya, S. & Balakrishnan, V. (2013). The effect of over exposure of Ultraviolet-B radiation on the physiological characteristics of *Aeschynomene aspera* L. *Research in Plant Biology*, 3 (3): 18-23.

- Rehman, F.; Khan, F. A. & Badruddin, S. M. A. (2012). Role of phenolics in plant defense against insect herbivory. En *Chemistry of Phytopotentials: Health, Energy and Environmental Perspectives*. Khemani, L. D.; Srivastava, M. M. & Srivastava, S. (Eds.), Springer (Ed.): 309-313.
- Rivas-Martínez, S., & Rivas-Sáenz, S. (2009). Sistema de Clasificación Bioclimática Mundial. Centro de Investigaciones Fitosociológicas, España. On line: <http://webs.ucm.es/info/cif/> (28/05/2018).
- Rodríguez, J. & Colinas, C. (1999). Resistance test for chestnut against *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Acta Horticulturae* 494 (II International Symposium on Chestnut): 369-376.
- Roces-Díaz, J. V.; Jiménez-Alfaro, B.; Álvarez-Álvarez, P. & Álvarez-García, M. A. (2014). Environmental niche and distribution of six deciduous tree species in the Spanish Atlantic region. *iForest*, 8: 214-221.
- Rubio, A.; Blanco, A. & Sánchez, O. (1997). Aportaciones al estudio ecológico de los castaños navarros: suelos, clima y fisiografía. *Edafología*, 3 (2): 479-490.
- Rubio, A.; Elena, R.; Sánchez, O.; Blanco, A.; Sanchez, F. & Gómez, V. (1999). Autoecología de los castaños catalanes. *Forest Systems*, 8 (2): 387-405.
- Rubio, A.; Elena, R.; Sánchez, O.; Blanco, A.; Sánchez, F. & Gómez, V. (2002a). Soil evaluation for *Castanea sativa* afforestation in Northeastern Spain. *New Forests*, 23 (2): 131-141.
- Rubio, A. & Gandullo, J. (1994). Análisis ecológico comparativo de los castaños de Extremadura y de la región cántabro-astur (España). *Forest Systems*, 3 (2): 111-124.
- Rubio, A.; Palomares, O. S.; Gómez, V.; Graña, D.; Elena, R. & Blanco, A. (2002b). Autoecología de los castaños de Castilla (España). *Forest Systems*, 11 (2): 373-393.
- Samanta, A.; Das, G. & Das, S. K. (2011). Roles of flavonoids in plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6 (1): 12-35.
- Sánchez, O., Sánchez, F. & Carretero, M. P. (1999). Modelos y cartografía de estimaciones climáticas termopluviométricas para la España peninsular. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (Madrid). 192 pp.
- Sánchez-Sánchez, H. & Morquecho-Contreras, A. (2017). Chemical plant defense against herbivores. En: *Herbivores*, InTech (Ed.): 3-28.
- Santa Regina, I. (2000). Organic matter distribution and nutrient fluxes within a sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) stand of the Sierra de Gata, Spain. *Annals of Forest Science*, 57 (7): 691-700.
- Sanz, M.; Cadahía, E.; Esteruelas, E.; Muñoz, A. M.; Fernández de Simón, B.; Hernández, T. & Estrella, I. (2010). Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa*

Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (17): 9631–9640.

Scharnweber, T.; Hevia, A.; Buras, A.; van der Maaten, E. & Wilmking, M. (2016). Common trends in elements? Within-and between-tree variations of wood-chemistry measured by X-ray fluorescence - A dendrochemical study. *Science of the Total Environment*, 566-567: 1245-1253.

Selmar, D. (2008). Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. *Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research* 1/2, 58: 139-144.

Selmar, D. & Kleinwächter, M. (2013). Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of the stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. *Plant and Cell Physiology*, 54 (6): 817–826.

SEN (Servicio de Espacios Naturales) (2006). Manual de Interpretación de los Hábitats de la Unión Europea. Dirección General del Medio Natural de la Junta de Castilla y León (España). 79 pp.

Serrano, J.; Puupponen-Pimiä, R.; Dauer, A.; Aura, A-M. & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53: S310–S329.

Silkin, P. P. & Ekimova, N. V. (2012). Relationship of strontium and calcium concentrations with the parameters of cell structure in Siberian spruce and fir tree-rings. *Dendrochronologia*, 30 (2): 189-194.

SITPA-IDEAS (2012). Mapas de Clases Agrológicas y Usos Agrarios Generales. Sistema de Información Territorial e Infraestructura de Datos Espaciales del Principado de Asturias. On line:
<http://sitpa.cartografia.asturias.es/Geoportal/extlayout.aspx?userId=MO/NQxQuLBE=&lang=es> (01/02/2018).

Skovsgaard, J. P. & Vanclay, J. K. (2008). Forest site productivity: a review of the evolution of dendrometric concepts for even-aged stands. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 81 (1): 13-31.

Smith, K. T.; Balouet, J. C.; Shortle, W. C.; Chalot, M.; Beaujard, F.; Grudd, H.; Vroblesky, D. A. & Burken, J. G. (2014). Dendrochemical patterns of calcium, zinc, and potassium related to internal factors detected by energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF). *Chemosphere*, 95: 58-62.

Smith, K. T. & Shortle, W. C. (2003). Dendrochemistry of base cations in red spruce: the fallacy of the passive recorder. *Eos, Transactions of the American Geophysical Union* 84(46) Fall Meeting Supplement, Abstract B12F-04.

Soil Survey Staff (2006). Keys to Soil Taxonomy, 10th ed., United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. Washington, DC. USA, pp. 341.

Soutrenon, A. (2007). Evolution du chancre dans les taillis de châtaigniers balivés: les premiers enseignements. Département de la santé des forêts, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (Francia). 7 pp.

St. Clair, S. B.; Sharpe, W. E. & Lynch, J. P. (2008). Key interactions between nutrient limitation and climatic factors in temperate forests: a synthesis of the sugar maple literature. Canadian Journal of Forest Research, 38 (3): 401-414.

Sun, B. S.; Ricardo-da-Silva, J. M. & Spranger, M. I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46 (10): 4267-4274.

Tanaka, Y.; Sasaki, N. & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. The Plant Journal, 54 (4): 733-749.

Thornthwaite, C. W., Mather, J. R. & Carter, D. B. (1957). Instructions and tables for computing potential evapotranspiration and the water balance. En Publications in climatology, Drexel Institute of Technology (Philadelphia), 10 (3): 185-311.

Toprak, S. & Seferoğlu, S. (2013). The seasonal changes of nutritional elements of chestnut (*Castanea sativa*) plant and determination of leaf sampling times. American Journal of Research Communication, 1 (5): 1-8.

Torre, M. d. (2014). Repoblación forestal en el término municipal de Onzonilla (León). Trabajo Fin de Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural, Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid (España).

UNE-EN 84:1997. Protectores de la madera. Prueba de envejecimiento acelerado de las maderas tratadas antes de los ensayos biológicos. Prueba de deslavado.

UNE-EN 350-1:1995. Durabilidad de la madera y de los materiales derivados de la madera. Durabilidad natural de la madera maciza. Parte 1: guía para los principios de ensayo y clasificación de la durabilidad natural de la madera.

UNE-EN 350:2016. Durabilidad de la madera y de los productos derivados de la madera. Ensayos y clasificación de la resistencia a los agentes biológicos de la madera y de los productos derivados de la madera.

Vivas, N. (2005). Manual de tonelería destinado a usuarios de toneles. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (España). 231 pp.

Zlatanov, T.; Velichkov, I.; Hinkov, G.; Georgieva, M.; Eggertsson, O.; Hreidarsson, S.; Zlatanova, M. & Georgiev, G. (2012). Site index curves for European Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Belasitsa mountain. Šumarski List, 136 (3-4): 153-159.

Capítulo 4

CAPÍTULO 4

Influencia de *Castanea sativa* Miller en el ecosistema

4.4 INTRODUCCIÓN

El principal interés de la plantación, conservación y aprovechamiento de la mayoría de las especies vegetales suele ser su rentabilidad económica para quien trabaja con ellas. En las especies forestales, bien sea con fines madereros o como frutales, lo más importante es que la relación producción-calidad-rentabilidad sea adecuada. Las grandes demandas de ciertas materias primas vegetales durante el siglo XIX hicieron que se tendiera a producir lo máximo posible y *a posteriori* se clasificara el producto en función de su calidad. Esta mentalidad de producción hizo que muchas especies forestales fuesen sobreexplotadas con las consecuencias que ello conlleva. Así la deforestación, el empobrecimiento de los suelos y la introducción de especies alóctonas fueron y son los principales problemas forestales. A finales del siglo XIX y principios del XX, cuando la demanda de materias primas forestales se rebajó, por escasez de éstas o por aparición de nuevos productos, en muchos sectores se pasó a primar la calidad en detrimento de la cantidad. A finales del siglo pasado, cuando la producción por calidad no alcanza la rentabilidad esperada, se busca la obtención de subproductos revalorizados procedentes de los residuos o desechos forestales no aprovechados hasta el momento. Actualmente, como un recurso mercantilista más, se recurre a lo que siempre debió ser lo primero a tener en cuenta, la sostenibilidad medioambiental del producto a comercializar. La influencia de las propias especies vegetales sobre su entorno más próximo es un aspecto al que no se le dedicó especial atención en el pasado y que, en los últimos años, empieza a ser tenido en cuenta.

La importancia del castaño, desde el punto de vista de biodiversidad, se muestra con actuaciones tales como la inclusión de los bosques de *Castanea sativa* en los hábitats prioritarios de la Directiva europea 92/43/CEE (Directiva Hábitat). El valor del castaño va, por tanto, más allá de los beneficios económicos o paisajísticos que reporta a la humanidad, ya que sirve de refugio a las aves y a muchos mamíferos, además de suministrarles alimento. La micología también se beneficia de esta especie, así como numerosos organismos que forman parte de la meso y macrofauna. Que el castaño es generador o promotor de vida en su entorno parece evidente, e intentar profundizar en el conocimiento de cómo interacciona es, aunque difícil, importante.

Tratar de estudiar y comprender la influencia de una o varias especies vegetales sobre su entorno más próximo requiere un gran trabajo. Además, considerar todas las posibles variables medioambientales no garantiza la total comprensión de estas interacciones planta-ecosistema. La multitud de variables capaces de influir directa o indirectamente en el ecosistema hacen que sólo sea posible establecer algunas relaciones y sólo se puedan abordar de forma parcial. Debido a esta gran complejidad experimental, los resultados que se presentan en este capítulo pretenden ser una

aportación más al conocimiento de la cada vez mejor conocida influencia del vegetal sobre su entorno.

La influencia que los fenoles vegetales tienen sobre el suelo, tanto a nivel fisicoquímico como biológico (flora y fauna), ha sido estudiada con anterioridad. El aporte fenólico que los suelos reciben de las especies vegetales es un aspecto a tener muy en cuenta en la composición edáfica (Strobel, 2001; Kefeli *et al.*, 2003; Kanerva, 2007; Buondonno *et al.*, 2014). En función del tipo y cantidad, incluso la composición fisicoquímica puede verse alterada. Así, la capacidad de intercambio catiónico puede aumentar en presencia de ciertos compuestos tánicos (Halvorson, 2011, 2013), y la capacidad quelante que poseen algunos fenoles (Psotová *et al.*, 2003; Michalak, 2006; Liang *et al.*, 2008; Karamać, 2009), puede retener o alterar la disponibilidad de estos elementos de los suelos.

Buondonno *et al.* (2014) tuvieron en cuenta el uso de la tierra y su cobertura vegetal (agricultura intensiva, coberturas de castaño, pastos alpinos, reforestaciones boscosas y bosques naturales) *in situ*, encontrando diferencias en la materia fenólica total del suelo (bosques naturales > pastos alpinos > castaños > reforestaciones > agricultura intensiva). Malá *et al.* (2013) evaluaron el impacto de diferentes plantas leñosas sobre la dinámica de los ácidos fenólicos en el suelo *ex situ* (en invernadero), no encontrando diferencias en el contenido fenólico de estos suelos, asumiendo que esta indiferenciación se debió a un insuficiente seguimiento de la dinámica del suelo y al escaso período de estudio (1 y 2 años).

En la mayoría de los ecosistemas forestales, la fracción vegetal que más contribuye al retorno de nutrientes son las hojas, que según reporta Santa-Regina (2000) para *C. sativa* en Cáceres (zona centro-oeste de España) es de 3 429 kg ha⁻¹ año⁻¹, representando un 69.8 % de la biomasa total caída en los castaños. La contribución de las ramas fue del 14.8 % (728 kg ha⁻¹ año⁻¹), 8.8 % de las flores (432 kg ha⁻¹ año⁻¹), 5.1 % de los frutos (250 kg ha⁻¹ año⁻¹) y 1.5 % de otros tejidos (73 kg ha⁻¹ año⁻¹). Los datos que aportan Patricio *et al.* (2012) para castaños de monte alto en el norte de Portugal, con castaños maduros de mayor porte que los estudiados por Santa-Regina, son muy semejantes a los mencionados, 68.6 % de hojas (3 460 kg ha⁻¹ año⁻¹) también respecto a la biomasa total caída, 19.8 % de ramas (1 000 kg ha⁻¹ año⁻¹), 6.0 % de erizos (300 kg ha⁻¹ año⁻¹) y 5.6 % de frutos (280 kg ha⁻¹ año⁻¹). Con estos porcentajes de biomasa vegetal caída, la hojarasca se puede considerar como una de las principales fuentes de retorno de biomoléculas al suelo, siendo, además, la composición de esta hojarasca la que determinará su propia degradación y el reciclado de nutrientes (Torreta & Takeda, 1999; Ngoran *et al.*, 2006; Martínez-Yerizar *et al.*, 2007; Carnevale & Lewis, 2009; García-Palacios *et al.* 2013), y los fenoles compuestos activos en los diferentes procesos de mineralización de la materia orgánica (MO) (Palm & Sanchez, 1990; Seneviratne *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2016). La descomposición de la hojarasca se debe a la actividad de la biota del suelo (micro, meso y macrofauna), modulada por el uso de este. Así, en los entornos menos alterados es la macrofauna el grupo que más contribuye a la descomposición de la hojarasca, y a medida que aumenta la intensidad

del uso del suelo, ambientes más perturbados, la mesofauna pasa a ser el grupo más importante (Castro-Huerta *et al.*, 2015). La íntima relación entre los fenoles vegetales, los microorganismos edáficos y la meso y macrofauna detritívora presente en el mantillo, debido al efecto disuasorio que algunos compuestos fenólicos ejercen sobre ciertos herbívoros (Wardle *et al.*, 1998; Hättenschwiler & Vitousek, 2000; Wallstedt *et al.*, 2000; Lorenz & Preston, 2002; Hao *et al.*, 2012; Kula & Lazorič, 2015), hace que esta interacción sea de suma importancia en la degradación y transformación de la hojarasca. Tampoco hay que olvidar a los depredadores, que actúan de forma directa sobre los invertebrados del suelo e indirectamente en la descomposición de la hojarasca. La supresión de estos depredadores de la red trófica deriva, a medio plazo, en menores abundancias de los de menor tamaño y descomponedores, provocando una disminución de las tasas de descomposición de la hojarasca en bosques caducifolios (Melguizo-Ruiz, 2016).

Las interacciones bioquímicas entre plantas también participan en la regulación del ecosistema (Chou, 2009). La alelopatía debida al metabolismo secundario y en ocasiones a algunos fenoles, se pone de manifiesto en las interacciones en que este tipo de compuestos median entre especies vegetales durante alguna de las etapas de su desarrollo (Buckley & Howell, 2004; Li *et al.*, 2010; Al Harun *et al.*, 2015; Cheng & Cheng, 2015; Gelsomino *et al.*, 2015). Este efecto fue estudiado en extractos foliares acuosos de diferentes especies del género *Castanea* sobre especies hortícolas (lechuga, rábano, pepino, cebolla, arroz y trigo), así Li *et al.* (2013) compararon *C. mollissima* y *C. dentata*, obteniendo mayor alelopatía en la primera de estas especies. Extractos similares de *C. sativa* fueron usados para demostrar esta alelopatía con el rábano (Basile *et al.* 2000).

A medida que se avanza en el conocimiento de los mecanismos que intervienen en la interacción de los fenoles con el ecosistema, se intenta establecer su papel en las características que los definen. Con el objetivo de concretarlo en los ecosistemas de los castaños se aborda este trabajo, cuyo planteamiento es valorar la influencia de la diferente composición de sus tejidos sobre su entorno. Para ello se eligieron castaños de 2 zonas separadas geográficamente y con distinta calidad de estación (CE), pertenecientes a una red de parcelas permanentes de monte bajo de *C. sativa* del Programa de Investigación Forestal SERIDA/CETEMAS del Principado de Asturias. Se caracterizó el perfil fenólico de los tejidos de *C. sativa* que con mayor frecuencia caen al suelo y se relacionó, teniendo en cuenta la distinta composición fenólica obtenida para las dos zonas de estudio, con los aspectos biológicos y edáficos observados en estos castaños.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 Composición fenólica en amentos, erizos, hojas y ramas

4.2.1.1 Zonas de estudio

Los castañares objeto de estudio fueron seleccionados de una red de parcelas permanentes de monte bajo de *C. sativa* del Programa de Investigación Forestal SERIDA/CETEMAS del Principado de Asturias, escogiendo 2 zonas (3 parcelas por zona) bien separadas geográficamente, Allande y Caso, y con diferente CE, estimada indirectamente a través del índice de sitio (IS) basado en el modelo de altura dominante usado en el ajuste de las tablas de producción elaboradas por Menéndez-Miguélez *et al.* (2016) (ver subapartado 3.2.1.del Capítulo 3).

4.2.1.2 Material vegetal

Las hojas y los amentos se muestrearon en julio de 2012 y 2013, tomando una muestra representativa de ambos tejidos en cada una de las 3 parcelas en las 2 zonas de estudio. Las hojas se tomaron de la zona baja de la copa del árbol y los amentos caídos recientemente se recogieron del suelo. Las muestras se transportaron desde el monte hasta el laboratorio en nevera refrigerada con hielo, guardándolas a -80 °C hasta su secado en liofilizador (Telstar Technologies SL, LyoQuest -55, Tarrasa, España) y molienda en molino criogénico (SPEX SamplePrep Inc., Freezer/Mill 6770, New Jersey, EUA) con programa de trabajo por muestra de hojas de 3 ciclos con 1 min de preenfriamiento, 1 min de molienda, 1 min entre ciclos y 7 impactos por segundo (ips) de velocidad de impacto, y para los amentos un ciclo menos.

Los erizos (sin fruto) se muestrearon en octubre de 2012 y 2013, tomando una muestra representativa en cada una de las 3 parcelas en las 2 zonas de estudio, recogiendo del suelo los caídos recientemente por senescencia y se transportaron y trataron como se describe en el párrafo anterior. El programa de trabajo por muestra para la molienda fue de 2 ciclos con 1 min de preenfriamiento, 2 min de molienda, 1 min entre ciclos y 8 ips.

Las ramas se muestrearon en enero de 2013 y 2014, tomando 2 trozos de ramas de aproximadamente 30 cm por árbol, de 5 árboles en cada una de las 3 parcelas y en las 2 zonas de estudio. Las ramas se recogieron de la parte baja de la copa del árbol, que no fuesen rebrotes, con diámetros entre 2 y 3.5 cm, libres de heridas, nudos y otras alteraciones y se transportaron desde el monte hasta el laboratorio en nevera refrigerada con hielo, manteniéndolas a 4 °C hasta su descortezado y troceado al día siguiente. Las cortezas y maderas se almacenaron a -80 °C hasta su secado por liofilización y molienda en molino criogénico con el mismo programa de trabajo utilizado para los erizos y un ciclo más para la madera.

Todas las muestras molidas se guardaron a -80 °C hasta realizar la extracción fenólica.

Para el tratamiento de los datos todos los muestreos se agruparon en 2 períodos abarcando cada período el ciclo natural de formación de cada órgano/tejido y, en el caso de las ramas, la época de mayor probabilidad de caída al suelo (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Cronograma de los muestreos realizados para la toma de muestra de los órganos/tejidos analizados de *Castanea sativa*.

Período de Muestreo 1						Período de Muestreo 2												
2012						2013						2014						
Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero
Hojas	Erizos		Ramas									Hojas	Erizos		Ramas			
Amentos												Amentos						

4.2.1.3 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos

Los productos químicos empleados y las metodologías llevadas a cabo para la extracción de los compuestos fenólicos están descritos en el apartado 2.2 del Capítulo 2 (Figura 2.1).

De cada órgano/tejido a analizar se realizaron 3 extracciones. Las muestras molidas (1 g_{ps} por muestra) se extrajeron con 100 mL de MeOH/H₂O (1:1, v/v) en agitación durante 24 h. Los extractos se filtraron, se eliminó el MeOH y se llevó a un volumen de 50 mL con agua, separando posteriormente una alícuota de 3 mL, que se conservó a -20 °C para realizar la cuantificación de los fenoles totales (FT) mediante el ensayo Folin-Ciocalteu. El resto del extracto se sometió a 2 extracciones líquido-líquido consecutivas, con 20 mL de éter dietílico y 20 mL de acetato de etilo, extractos orgánicos llevados a sequedad y guardados a -20 °C hasta la cuantificación correspondiente. En el segundo extracto se cuantificaron los taninos condensados (TC) mediante el método de la vainillina. El extracto acuoso final se liofilizó y guardó a -80 °C hasta la cuantificación de los taninos hidrolizables (TH) mediante HPLC tras metanólisis ácida para degradar estos compuestos a sus unidades básicas y diferenciarlos en galotaninos (Gts) y elagitaninos (Ets).

4.2.1.4 Estimación del potencial aporte fenólico que recibe el suelo

Para el cálculo del aporte fenólico (FT, TC y TH: Gts y Ets) que puede recibir el suelo de los castaños por parte de los órganos/tejidos de *C. sativa* caducos o susceptibles de caer (hojas, amentos, erizos y ramas) y valorados en este capítulo, se realizaron 2 estimaciones. La primera de estas estimaciones se hizo teniendo en cuenta la biomasa (kg ha⁻¹ año⁻¹) de estos órganos/tejidos que potencialmente caen en base a

los resultados de otros autores, Santa Regina (2000) para hojas, amentos y ramas y Patricio *et al.* (2012) para hojas, erizos y ramas. La segunda estimación se llevó a cabo en función de la biomasa (hojas y ramas) por árbol obtenida a partir de los árboles apeados en cada zona objeto de estudio (ver subapartado 3.2.1. del Capítulo 3), la densidad arbórea (849 árboles ha⁻¹ para Allande y 1127 para Caso) y el contenido fenólico ya mencionado. El desglose de las ramas en corteza y madera se hace considerando el porcentaje medio de cada uno de estos tejidos en las ramas analizadas (12 % de corteza y 88 % de madera).

4.2.2 Degradación de la hojarasca

4.2.2.1 Pérdida de biomasa

El seguimiento de la pérdida de biomasa se llevó a cabo tomando hojas de castaño recién caídas en noviembre de 2014 en las 2 zonas de estudio, dejándolas secar a temperatura ambiente durante una semana, y, una vez estabilizada la pérdida de humedad, introduciendo aproximadamente 10 g de hojas completas en bolsas de tela mosquitera Maurer (Distribzione Ferritalia Soc. Coop., Padova, Italia) de fibra de vidrio de 20 x 20 cm con malla de 1.8 x 1.6 mm. Se prepararon 300 bolsas para llevar a campo, teniendo en cuenta que la duración estimada de este ensayo era de 30 meses. En cada zona de ensayo se colocan 150 bolsas, a razón de 50 por parcela, que se distribuyeron en grupos de 5-7 sujetas por hilo de nylon a 8 árboles distribuidos aleatoriamente por cada parcela. Las bolsas se dejan entre la hojarasca reciente para que las condiciones sean similares a las del resto de hojas caídas, y, finalmente, se marcan los árboles para facilitar la recogida posterior (**Figura 4.1**). La periodicidad de los muestreos fue de mayor a menor frecuencia, mensualmente durante los 3 primeros meses, trimestralmente durante los 15 siguientes y los 2 últimos muestreos cada 6 meses. En cada muestreo se tomaron 3 bolsas de cada una de las 3 parcelas en las 2 zonas de estudio, que se llevaron al laboratorio, donde se recogió la hojarasca, se dejó secar a temperatura ambiente durante una semana y se pesó. Posteriormente, se secó en estufa con circulación de aire forzado (Digitronic, JP SELECTA, Barcelona, España) durante 4 días a 70 °C para obtener el peso seco. La pérdida de biomasa de cada muestra se calculó como el porcentaje de biomasa perdida respecto a la masa inicial, estimada en base al promedio de tres muestras de cada parcela, secadas en las mismas condiciones, en el momento de llevarlas a campo.



Figura 4.1. Bolsas de hojarasca en monte al inicio del ensayo.

Las muestras secadas a 70 °C correspondientes al muestreo inicial (t_0 , hojas recién caídas en noviembre de 2014) y las correspondientes al año de permanencia en campo (t_{12} , noviembre de 2015) se almacenaron en congelador a -80 °C (Kendro, HFU 486 Basic, Langensfeld, Alemania) hasta los análisis de fenoles totales, cenizas y elemental. Estas muestras de hojarasca se molieron en molino criogénico con programa de trabajo de 1 min de preenfriamiento, 2 min de molienda y 8 ips de velocidad de impacto.

4.2.2.2 Fenoles totales

De cada una de las muestras de la hojarasca secadas y molidas, a t_0 y t_{12} , se tomó 1 g_{ps} (3 muestras de cada una de las 3 parcelas en las 2 zonas de estudio) para realizar la extracción y cuantificación de los FT como se ha descrito en el apartado 4.2.1.3.

4.2.2.3 Cenizas

El contenido en cenizas se determinó en las mismas muestras de hojarasca según la norma UNE-EN 14775:2010 (Biocombustibles sólidos. Método para la determinación del contenido en cenizas), que denomina cenizas a la masa de residuo inorgánico que queda después de la combustión de un combustible o muestra bajo condiciones específicas, expresando los resultados de este análisis en porcentaje respecto de la masa de la materia seca de la muestra. Para ello a 1 g de cada muestra se le realizó un tratamiento previo de secado en base a la norma UNE-EN 14774-3:2010 (Biocombustibles sólidos. Determinación del contenido de humedad. Método de secado en estufa. Parte 3: Humedad de la muestra para análisis general), tras el cual se depositaron en crisoles de porcelana con tapa, se introdujeron en un horno (LVT 9/11/P 330, Nabertherm GmbH, Bremen, Alemania) y se inició el tratamiento térmico especificado en las normas citadas anteriormente. Una vez finalizada la combustión de las muestras y atemperadas a temperatura ambiente, se pesaron en una balanza analítica (XB120A, Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Suiza).

4.2.2.4 Análisis elemental

El análisis elemental (% , m/m, de C, H y N) se realizó en las mismas muestras de hojarasca secadas y molidas que para FT y cenizas. Este análisis se llevó a cabo en la unidad de Ensayos Térmicos y Análisis Elemental de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo, donde se empleó un analizador elemental (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Alemania) que mediante una combustión con O₂ a una temperatura de 1000 °C, oxida completa e instantáneamente la muestra. Los diferentes productos de combustión CO₂, H₂O y N₂, son transportados con He, como gas portador, a través de un tubo de reducción y después selectivamente separados en columnas específicas para posteriormente desadsorberlos térmicamente. Finalmente, los gases pasan de forma separada por un detector de conductividad térmica que suministra una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla.

4.2.3 **Estudio de la meso y macrofauna y actividad microbiana del suelo**

4.2.3.1 Estudio meso y macro faunístico

La hojarasca para el recuento y clasificación taxonómica de la pequeña fauna (meso y macrofauna) se muestreo en noviembre de 2015 (otoño), febrero de 2016 (invierno) y mayo de 2016 (primavera). Los muestreos se realizaron recogiendo la hojarasca de un área de 50 x 50 cm en 3 puntos más o menos equidistantes entre sí y representativos de cada una de las 3 parcelas en las 2 zonas de estudio. El número de individuos de cada orden identificado en cada zona se calculó promediando el valor obtenido en cada una de las 3 parcelas de cada zona procedente de la suma de los 3 puntos de muestreo en cada parcela.

Se consideró mesofauna a aquellos animales capaces de atravesar malla de 1.6 x 1.8 mm, y macrofauna a los que no pasaron por ese paso de luz. En el laboratorio, se hizo una primera separación *de visu* de la meso y macrofauna presente en las muestras de hojarasca y se redujo la biomasa recogida eliminando los fragmentos vegetales de mayor tamaño. Posteriormente, la muestra restante se trasladó a un sistema de extracción de pequeña fauna tipo Berlese-Tullgren, que es uno de los más usados para la extracción de esta fauna por su simplicidad y rápido procesamiento de las muestras (Rieff *et al.*, 2016; Yekwayo *et al.*, 2016). Este sistema está formado por un embudo plástico con un diámetro superior de 23 cm y uno inferior de 2 cm recubierto por malla de fibra de vidrio de 1.6 x 1.8 mm, sobre este se coloca una fuente de luz y calor (lámpara de alta presión de vapor de sodio, OSRAM E40/ES 400 W), que situada 30 cm por encima del embudo nos da una radiación de 1 465 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En la parte inferior del embudo se coloca un recipiente plástico con solución de etanol 30 % (v/v) acuoso para recoger la mesofauna que desciende por el embudo intentando evitar la desecación (**Figura 4.2**). Las muestras se mantuvieron en los embudos durante 4 días. Transcurrido este tiempo, se contó e identificó la fauna extraída de la hojarasca a nivel de orden

siguiendo las recomendaciones de Chu (1949). Para una mejor visualización de la mesofauna se usó un estereomicroscopio (SMZ800, Nikon Corporation, Tokyo, Japón). La descripción y comparación de la estructura de las comunidades de este tipo de biota presente en la hojarasca se realizó valorando los mejores ajustes para las curvas de rango-abundancia (dominancia/diversidad o diagramas de Whittaker), diversidad y equitatividad en cada zona.



Figura 4.2. Montaje empleado para la extracción de pequeña fauna basado en un sistema tipo Berlese-Tullgren.

Las curvas de rango-abundancia (dominancia/diversidad o diagramas de Whittaker) se crearon representando gráficamente las abundancias frente al rango de órdenes (Oksanen, 2016), obteniendo los mejores modelos de ajuste para cada comunidad en función del criterio de información de Akaike (AIC) (Burnham *et al.*, 2011), parámetro que ofrece una medida de la calidad relativa de un modelo estadístico para un conjunto de datos, siendo el mejor modelo de ajuste aquel que menor AIC presenta.

La diversidad se determinó a través del índice de Shannon (H, ecuación [4.1], Shannon, 1948), que refleja la heterogeneidad de la comunidad en función del número de órdenes presentes y su abundancia relativa, siendo, conceptualmente, una medida del grado de incertidumbre asociada a la selección aleatoria de un individuo [4.1] comunidad (Pla, 2006).

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \log_b p_i$$

donde S es el número de órdenes, p_i la abundancia proporcional de los órdenes i y \log_b es el logaritmo natural ($b=e$).

La equitatividad se valoró mediante el índice de Pielou (J, ecuación [4.2]), que muestra la proporción de la diversidad observada con relación a la máxima diversidad (Moreno, 2001). [4.2]

$$J = \frac{H}{\log_b S}$$

donde S es el número de órdenes y \log_b es el logaritmo natural ($b=e$).

4.2.3.2 Análisis microbiológico

Los análisis microbiológicos de los suelos se realizaron en el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Tecnológico NEIKER-Tecnalia (País Vasco, España). El muestreo se llevó a cabo en mayo de 2015. Se evaluó la abundancia, actividad y diversidad microbiana en cada una de las 3 parcelas en las 2 zonas de estudio. Dentro de cada parcela se tomaron 3 muestras. Cada una de ellas se componía de 10 porciones de suelo superficial, extraídas con una sonda cilíndrica de 10 cm de profundidad y 2,5 cm de diámetro. Las muestras se transportaron al laboratorio a 4 °C. Una vez allí, los suelos se tamizaron en fresco por un tamiz con paso de luz de 2 x 2 mm y se almacenaron a 4 °C hasta la realización de los análisis. Los parámetros microbianos edáficos con potencial bioindicador de la calidad del suelo que se determinaron fueron: respiración basal (RB), respiración inducida por sustrato (RIS) y diversidad funcional estimada a partir de los perfiles fisiológicos a nivel de comunidad bacteriana heterótrofa cultivable.

La RB se determinó a partir de 30 g de suelo fresco tamizado en frascos herméticos e incubados a 30 °C durante 72 h según la norma ISO 16072:2002 (Soil quality. Laboratory methods for determination of microbial soil respiration), y para la determinación de la RIS se aplicó la norma ISO 17155:2002 (Soil quality. Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves). Los valores de ambos parámetros se expresaron como μg de carbono procedente del CO_2 liberado por h y g_{ps} ($\mu\text{g C-CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{ps}}^{-1}$). La relación entre ambas respiraciones (RB/RIS) se expresó como el cociente respiratorio ($q\text{CO}_2$).

Los perfiles fisiológicos-catabólicos-metabólicos a nivel de comunidad bacteriana heterótrofa cultivable se obtuvieron mediante el test de tetrazolio, utilizando microplacas EcoPlate (Biolog Inc., Hayward, EUA), determinando espectrofotométricamente el color desarrollado en cada pocillo (31 pocillos con distintos sustratos de carbono más un pocillo como blanco, por triplicado). El tetrazolio se reduce en presencia de NADH, dando lugar a un color morado que está directamente relacionado con la tasa y extensión a la que ocurre la respiración microbiana inducida por la presencia de la fuente de carbono en cada pocillo. El número de fenotipos presentes en la comunidad bacteriana del suelo se determinó mediante los perfiles de utilización de los sustratos de carbono. La estructura de la comunidad se caracterizó

evaluando los perfiles de los fenotipos presentes. El promedio del desarrollo de color por pocillo (AWCD), indicador de potencial catabólico de la comunidad bacteriana, se estableció calculando la media del valor de la absorbancia de cada pocillo para cada tiempo de lectura espectrofotométrica. El número de sustratos utilizados (NSU) se determinó contando el número de pocillos con una absorbancia superior a 0.25 U_{mA}, considerando este valor como el límite que indica un crecimiento positivo en cada pocillo. El NSU es un valor que estima la riqueza de especies bacterianas. Para cuantificar la biodiversidad específica se usó el índice H.

4.2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos cuantitativos obtenidos se llevó a cabo con el programa informático IBM SPSS Statistics 23.0. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron en base a un análisis de varianza (ANOVA), por comparación de medias y considerando un modelo lineal general con pruebas *post hoc* para un nivel de significación de 0.05.

El tratamiento matemático realizado para la descripción y comparación de la estructura de las comunidades de pequeña fauna (meso y macrofauna) se realizó con la librería *vegan* (Package *vegan* version 2.4-0) del programa estadístico R (R Development Core Team, 2015). Para la construcción de las funciones (modelos de ajuste) se usó la orden (comando) `Curvas <- radfit(dat [1,])`, que genera un archivo llamado *Curvas* con los cálculos de las funciones ajustadas con los datos del archivo *dat* correspondientes a la 1ª fila de datos (números) para todas las columnas (órdenes identificados en este caso), cuya visualización gráfica se obtiene con el comando `plot(Curvas)`. H se calculó con el comando `H <- diversity(dat, index="shannon")`, donde *H* es el nombre dado al archivo generado con los valores de H, y *dat* es el archivo de datos utilizado para calcular este índice. H es definido en *vegan* como $-\sum p_i \log(b) p_i$, donde p_i es la abundancia proporcional de los *i* taxones diferenciados y *b* es la base del logaritmo, siendo lo más habitual el uso de logaritmos naturales (base *e*), aunque también se usa la base $b = 2$. Y por último, y aunque la librería específica *vegan* no tiene un comando preestablecido para calcular J, se calculó creando el comando `J <- H/log(specnumber(dat))`, donde *J* es el nombre dado al archivo generado con los valores de J y la función *specnumber* para calcular el número de taxones (órdenes) diferenciados.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Composición fenólica en amentos, erizos, hojas y ramas

En la **Tabla 4.2** se muestra la significación encontrada para cada factor en estudio (órgano/tejido, zona y período de muestreo) y sus interacciones en cada análisis fenólico (FT, TC y TH: Gts y Ets). Destacar las diferencias significativas obtenidas en

todos los análisis realizados, lo que indica la gran variación que existe en el contenido de estos metabolitos secundarios según el órgano/tejido analizado, como también indican otros autores (Barreira *et al.*, 2008; Mujčić *et al.*, 2009; Sanz *et al.*, 2010; Vázquez *et al.*, 2010; Živković *et al.*, 2010; Nazzaro *et al.*, 2012; Eichhorn *et al.*, 2017). El período de muestreo influye en el contenido en TC y Gts indicando que hay un efecto de la variabilidad interanual motivada por los cambios en las variables climáticas (Figura 3.2) o por las interacciones con otros organismos que puedan producirse de forma diferente en los dos periodos de muestreo. La influencia del entorno se constata con las diferencias entre zonas que resultaron ser significativas para FT y TC. No obstante, existe una interacción entre variables significativa, tanto para órgano/tejido*zona como para órgano/tejido*período de muestreo, lo que podría indicar que el efecto debido a la zona y el debido al período de muestreo pueden ser diferentes según el tejido/órgano analizado.

Tabla 4.2. Significación (valor de p) de los factores/interacciones en los análisis fenólicos realizados. Nivel de significación de 0.05. ANOVA según modelo lineal general multivariante para Fenoles Totales y Taninos Condensados, n=9, y mediante modelo lineal general univariado para Taninos Hidrolizables (Galotaninos y Elagitaninos), n=3-6.

Factor / Interacción	Análisis Fenólico	Grados de libertad	p
Tejido	Fenoles Totales	4	.000
	Taninos Condensados	4	.000
	Galotaninos	4	.000
	Elagitaninos	4	.000
Zona	Fenoles Totales	1	.001
	Taninos Condensados	1	.000
	Galotaninos	1	.208
	Elagitaninos	1	.196
Período muestreo	Fenoles Totales	1	.744
	Taninos Condensados	1	.048
	Galotaninos	1	.030
	Elagitaninos	1	.897
Tejido * Zona	Fenoles Totales	4	.000
	Taninos Condensados	4	.000
	Galotaninos	4	.000
	Elagitaninos	4	.052
Tejido * Período muestreo	Fenoles Totales	4	.010
	Taninos Condensados	4	.000
	Galotaninos	4	.082
	Elagitaninos	4	.002
Zona * Período muestreo	Fenoles Totales	1	.387
	Taninos Condensados	1	.444
	Galotaninos	1	.024
	Elagitaninos	1	.104
Tejido * Zona * Período muestreo	Fenoles Totales	4	.904
	Taninos Condensados	4	.000
	Galotaninos	4	.209
	Elagitaninos	4	.624

Los resultados de los análisis fenólicos realizados (FT, TC y TH: Gts y Ets) en amentos, erizos, hojas y ramas (corteza y madera) de *C. sativa* se muestran en la **Figura 4.3**. Para los órganos de carácter sexual, amentos y erizos, el periodo de muestreo parece influir más en las parcelas de Caso que en las de Allande, tomando en el primer muestreo valores superiores para todas las familias de compuestos analizadas. En Allande, esta tendencia es similar, pero es mucho menos marcada. Para las hojas, otro de los órganos caducos analizados, las diferencias entre muestreos son menores, siendo tan solo los TH los que las marcan, con tendencia similar en las dos ubicaciones, pero inversa para Ets y Gts. Los órganos más permanentes, como son las ramas, tanto en el tejido de madera como de corteza, muestran una dinámica muy similar en las dos ubicaciones y para todos los compuestos analizados, destacando el contenido más alto de todos ellos en el segundo periodo de muestreo.

El efecto del periodo de muestreo en la concentración de estos metabolitos pone de manifiesto la influencia de la variación interanual en la composición fenólica. No obstante, con carácter general, los compuestos fenólicos analizados en los distintos órganos muestran una variación por zona superior, indicando que el ambiente en ambas ubicaciones está teniendo mayor relevancia. En este sentido, cabe destacar que para todos los órganos caducos propiamente dichos (amentos, erizos y hojas), el contenido en todas las familias de compuestos tiende a ser superior en las parcelas de Caso, con la única excepción de los FT y Ets en hoja, que no varían. Por el contrario, el órgano más permanente, ramas (diferenciando madera y corteza), presenta un contenido igual o superior de todas las familias de compuestos en las parcelas de Allande, con la única excepción de los TC en corteza, que es superior en Caso. Esta situación favorable de Allande para la acumulación de fenoles en madera y corteza, con la excepción de los TC en corteza externa, ya se observó en los análisis realizados a los troncos de los árboles apeados en ambas localidades con anterioridad (2011) (Tabla 3.9).

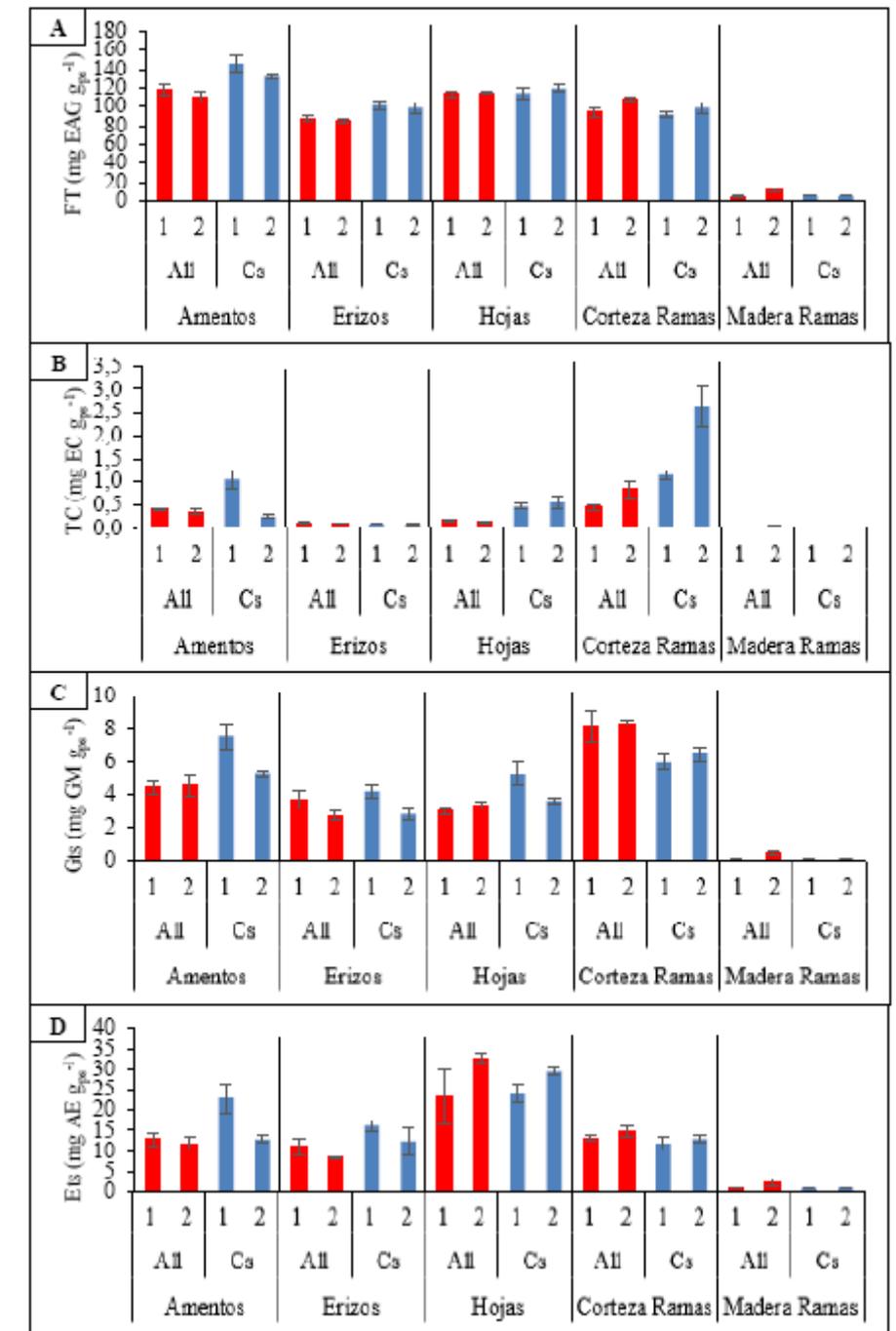


Figura 4.3. Valores medios del contenido de Fenoles Totales (FT, mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco), Taninos Condensados (TC, mg equivalentes de (+)-catequina/g de peso seco) y Taninos Hidrolizables: Galotaninos (Gts, mg de galato de metilo/g de peso seco) y Elagitaninos (Ets, mg de ácido elágico/g de peso seco) en distintos órganos/tejidos de *Castanea sativa* en Allande (All) y Caso (Cs) en los dos períodos muestreados (1 y 2) . Las barras verticales sobre las columnas representan el EE.

La graduación del contenido fenólico de los distintos órganos/tejidos coincide para los TC y Gts (corteza ramas > amentos > hojas > erizos > madera ramas). En los FT y Ets el orden se invierte para amentos y hojas (amentos > hojas en FT, y hojas > amentos en Ets) y se mantiene en los otros tres tejidos (corteza ramas > erizos > madera ramas), confirmándose el menor aporte de la madera (**Figura 4.4**).

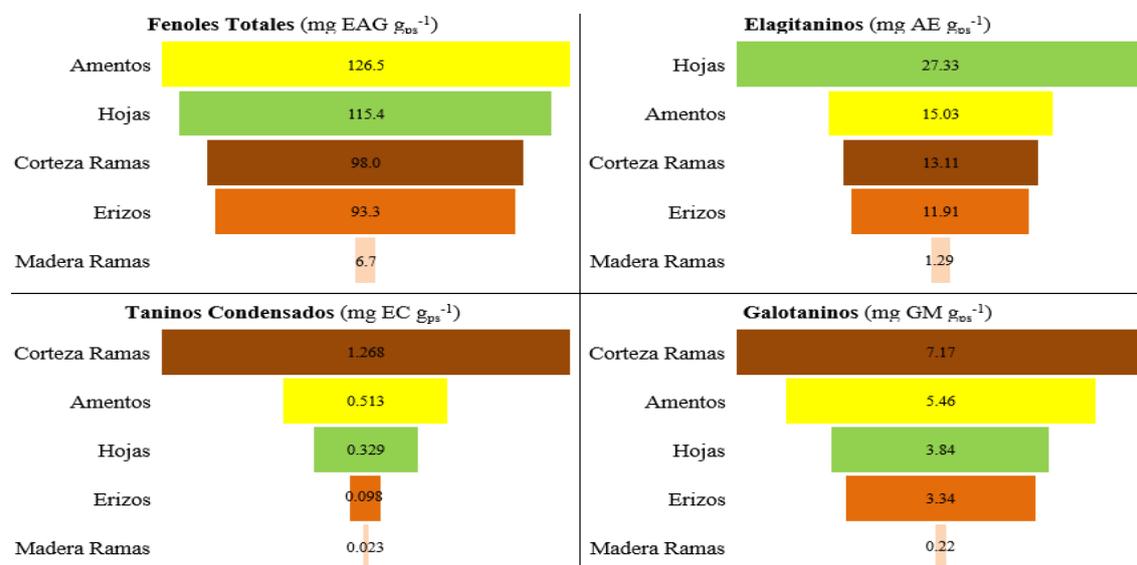


Figura 4.4. Valores medios de Fenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco), Taninos Condensados (mg equivalentes de (+)-catequina/g de peso seco), Galotaninos (mg de galato de metilo/g de peso seco) y Elagitaninos (Ets, mg de ácido elágico/g de peso seco) en los distintos órganos/tejidos de *Castanea sativa* de todas las muestras analizadas de Allande y Caso en los períodos de muestreo

Teniendo en cuenta tanto los resultados fenólicos obtenidos en este capítulo como en el anterior, los compuestos de naturaleza fenólica tienden a acumularse en mayor proporción en los órganos/tejidos caducos de castaños situados en zonas desfavorables, mientras que estos compuestos están en mayor cantidad en las partes estructurales de castaños ubicados en zonas favorables para el desarrollo de la especie. Por tanto, la CE donde crece el árbol influye en la composición fenólica de sus órganos y tejidos, pero además esta relación es biunívoca, ya que, a través de la dehiscencia de los órganos caducos, el ecosistema edáfico está influenciado por las características de la MO que recibe.

Los suelos son enriquecidos continuamente por una gran variedad de biomoléculas. Kanerva (2007) observó que las concentraciones de compuestos secundarios disminuían desde las capas edáficas más superficiales a las más profundas, sugiriendo que estos compuestos no se lixivian fácilmente a las capas inferiores del suelo o que se degradan parcialmente en la hojarasca. Entre estas biomoléculas se encuentran los compuestos fenólicos. En la bibliografía se recoge la gran variabilidad en cuanto a composición fenólica en los suelos de los castaños, debida fundamentalmente a la presencia de MO procedente de los castaños y en gran medida de las partes caducas

de estos. En este sentido, Buondomo *et al.* (2014) describen y cuantifican rangos de distribución de compuestos fenólicos agrupándolos en tres tipos: materia fenólica total, desde 0.09 hasta 5.92 g kg⁻¹, fenoles solubles en agua, de 0.02 hasta 0.61 g kg⁻¹, y fracción fenólica retenida en el suelo, entre 0.07 y 5.32 g kg⁻¹. Lorenz & Preston (2002) extrajeron y caracterizaron TC del humus recolectado en un bosque de piceas negras, demostrando que la descomposición de la hojarasca puede ralentizarse por la capacidad de estos compuestos para unirse a proteínas, que afectarían al funcionamiento de las enzimas fúngicas extracelulares, y determinarían de esta forma la actividad enzimática del suelo. Las biomoléculas fenólicas, bien directa o indirectamente, provienen principalmente de los distintos tejidos vegetales que caen al suelo (Strobel, 2001; Kefeli *et al.*, 2003).

La cantidad de fenoles que se incorpora al suelo procedente de los órganos caducos y aquellos tejidos que caen con asiduidad depende de la cantidad de masa vegetal aportada y de su composición fenólica. En las parcelas objeto de estudio no se cuantificó el reparto de biomasa que llega al suelo, pero los datos descritos por otros trabajos indican que las hojas son el componente mayoritario. Así, Raimundo *et al.* (2008), para castañares de producción de fruto en el norte de Portugal, obtuvieron el 49.8 y 39.8 % de hojas y erizos, respectivamente. Santa Regina (2000), para castañares de monte alto en Cáceres (centro oriente de España), indica que el 69.8 % de la materia vegetal que cae al suelo son hojas (3 429 kg ha⁻¹ año⁻¹), 14.8 % corresponde a ramas (728 kg ha⁻¹ año⁻¹), 8.8 % flores (432 kg ha⁻¹ año⁻¹) y 5.1 % frutos (250 kg ha⁻¹ año⁻¹). Patricio *et al.* (2012), también para castañares de monte alto en el norte de Portugal, recogieron 68.17 % de hojas (3327 kg ha⁻¹ año⁻¹), 14.56 % ramas (707 kg ha⁻¹ año⁻¹), 9.65 % erizos (470 kg ha⁻¹ año⁻¹) y 7.63 % fruto (373 kg ha⁻¹ año⁻¹). En base a estos datos medios de las fracciones que caen al suelo en los castañares y de los datos de aporte de las distintas familias fenólicas de los órganos/tejidos en cada ubicación, se estimó la cantidad de estas biomoléculas que recibiría el suelo de cada zona en estudio por año (**Tabla 4.3**). Además, se estimó el aporte fenólico de aquellos órganos de los que se disponían datos empíricos sobre su biomasa (hojas y ramas) obtenidos de los árboles apeados por parcela (**Tabla 4.4**).

Tabla 4.3. Aporte fenólico estimado de los órganos/tejidos de *Castanea sativa* en función de la biomasa teórica que cae anualmente y de los resultados del análisis fenólico en los distintos órganos/tejidos de cada zona. FT: Fenoles Totales (kg equivalentes de ácido gálico/ha). TC: Taninos Condensados (kg equivalentes de (+)-catequina/ha). Gts: Galotaninos (kg de galato de metilo/ha). Ets: Elagitaninos (kg de ácido elágico/ha).

Órgano/Tejido	kg _{ps} ha ⁻¹	FT (kg EAG ha ⁻¹)		TC (kg EC ha ⁻¹)		Gts (kg GM ha ⁻¹)		Ets (kg AE ha ⁻¹)	
		Allande	Caso	Allande	Caso	Allande	Caso	Allande	Caso
Hojas	3 378	385.39	394.19	0.50	1.72	10.72	15.01	94.53	90.08
Amentos	432	49.33	59.93	0.16	0.28	1.94	2.77	5.29	7.70
Erizos	470	40.60	47.07	0.05	0.04	1.51	1.61	4.53	6.66
Ramas									
Corteza	88	8.92	8.42	0.06	0.17	0.73	0.55	1.23	1.09
Madera	629	5.15	3.26	0.02	0.01	0.19	0.08	1.05	0.58
TOTAL	4 998	489.39	512.88	0.79	2.22	15.09	20.02	106.63	106.11

Tabla 4.4. Aporte fenólico estimado para cada zona de las hojas y ramas de *Castanea sativa* en función de la biomasa obtenida a partir de árboles apeados, densidad arbórea y contenido fenólico. FT: Fenoles Totales (kg equivalentes de ácido gálico/ha). TC: Taninos Condensados (kg equivalentes de (+)-catequina/ha). Gts: Galotaninos (kg de galato de metilo/ha). Ets: Elagitaninos (kg de ácido elágico/ha). Ø: Diámetro de las distintas fracciones de las ramas. * Diferencia significativa entre zonas (ANOVA, comparación de medias, $p \leq 0.05$, $n=3$).

Órgano/Tejido	Kg _{ps} árbol ⁻¹		FT (kg EAG ha ⁻¹)		TC (kg EC ha ⁻¹)		Gts (kg GM ha ⁻¹)		Ets (kg AE ha ⁻¹)	
	Allande	Caso	Allande	Caso	Allande	Caso	Allande	Caso	Allande	Caso
Hojas	1.59 ±0.33	3.01 ±0.49	153.98	395.88	0.20	1.73	4.28	15.07	37.77	90.46
Ramas (Ø, cm)										
2-7	13.8 ±2.3	11.2 ±2.6								
Corteza	1.70	1.39	145.38	148.75	0.93	2.96	11.89	9.76	20.09	19.19
Madera	12.12	9.83	84.28	57.47	0.32	0.17	3.19	1.37	17.15	10.20
0.5-2	3.42* ±0.51	7.66* ±0.70								
Corteza	0.42	0.95	35.93	101.55	0.23	2.02	2.94	6.66	4.97	13.10
Madera	3.00	6.71	20.83	39.23	0.08	0.11	0.79	0.93	4.24	6.97
<0.5	0.30* ±0.040	1.13* ±0.19								
Corteza	0.04	0.14	3.15	15.02	0.02	0.30	0.26	0.99	0.44	1.94
Madera	0.26	0.99	1.83	5.80	0.01	0.02	0.07	0.14	0.37	1.03

Esta estimación permite constatar que las parcelas ubicadas en Caso recibirían un aporte de biomoléculas de naturaleza fenólica superior a las parcelas de Allande, ya que, con la excepción de los Ets, que presentan el mismo valor, la contribución total al suelo de Caso siempre es superior, estableciendo la máxima diferencia los TC, para los que prácticamente se triplica (**Tabla 4.3**). A partir de estos datos, también podemos corroborar el mayor impacto de las hojas en cuanto al aporte fenólico al suelo, pues representan entre un 63 %, para los TC en Allande, como valor mínimo, y un 88 %, para los Ets, también en esa zona, como valor máximo. Por el contrario, los amentos, que parecen tener mucha importancia para el suministro de FT, o la corteza de las ramas, para los TH (Gts y Ets), representan como máximo un 11% de contribución en FT, para el primer caso y un 1 % y 5 % del aporte de Gts y Ets, respectivamente, por parte del segundo tejido mencionado.

Las estimaciones de la contribución fenólica, hechas en base a los datos bibliográficos (**Tabla 4.3**) del aporte medio de biomasa foliar, se ajustan con mucha precisión a los datos más reales (**Tabla 4.4**) obtenidos de forma empírica, en base al reparto de biomasa del apeo de los árboles y de la densidad forestal en Caso, pero no así para Allande, donde la contribución media a las distintas familias de compuestos fenólicos por parte de la biomasa foliar se reduce en torno a la mitad. Este hecho magnifica las diferencias entre localidades en cuanto a la proporción de estos compuestos, que este órgano aportaría al suelo en cada zona, alcanzando la máxima diferencia para los TC, que pasan a ser casi 9 veces superiores en las parcelas de Caso, frente a las algo más de 3 veces que se obtuvieron con los datos teóricos de biomasa foliar. Para las ramas, en el rango de diámetros de 2 a 7 cm, que son las comparables, la estima en base al reparto de biomasa de los árboles apeados da lugar a unos datos muy

superiores a la realmente caída según la bibliografía, en torno a 15 veces superior, lo cual se debe al hecho de tratarse de un órgano cuya dehiscencia sólo se produce asociada a algún agente ambiental y no anualmente de forma general como ocurre con las hojas. La comparación entre zonas muestra que el suelo de Allande recibiría un aporte fenólico procedente de la madera de las ramas próximo al doble del que recibiría el de Caso. Esta diferencia se reduce en la corteza de las ramas, destacando los TC, que muestran un contenido 3 veces superior en Caso (**Tablas 4.3 y 4.4**).

4.3.2 Degradación de la hojarasca

De todos los órganos/tejidos que se han considerado por su destino natural final, caída al suelo, por su momento de senescencia, o por circunstancias climáticas o sanitarias del árbol, se han seleccionado las hojas para un estudio más detallado de su degradación, por ser el órgano que mayor contenido fenólico total aportaría al suelo, considerando la biomasa de cada órgano/tejido por árbol de *C. sativa* y el contenido fenólico (**Tabla 4.3 y 4.4**). Este órgano mayoritario tiene además el papel más importante en el reciclado de los nutrientes en el ecosistema, la gradación encontrada por Santa Regina (2000) así lo corrobora (hojas > ramas > tronco), y a pesar de que la concentración de los nutrientes principales (los macronutrientes N, P y K) disminuya durante el ciclo vegetativo, desde la emergencia foliar hasta la senescencia, para evitar la pérdida de nutrientes, la hojarasca es responsable del 80 % del total de nutrientes que retornan al suelo a través del detrito vegetal (Santa Regina *et al.*, 2001). No obstante, la degradación de la hojarasca, y por tanto la liberación de nutrientes, va a estar condicionada por factores climáticos (temperatura, precipitación y radiación solar), composición foliar, actividad microbiana y pequeña fauna del suelo (Salazar, 2008; Castellanos-Barliza & León, 2011), por lo que diferirá entre zonas y a lo largo del tiempo, por la variación de estos factores (Martín *et al.*, 1996).

4.3.2.1 Pérdida de biomasa

En la **Figura 4.5** se representa la pérdida de masa de la hojarasca que se colocó en bolsas entre el mantillo en las 3 parcelas de las 2 zonas objeto de estudio, obtenida a partir de la diferencia entre el peso seco inicial y los pesos secos obtenidos en los distintos muestreos realizados a intervalos crecientes durante los 30 meses de duración del ensayo. Los resultados obtenidos muestran una mayor degradación de la hojarasca en la zona de Allande, parcela con mejor CE. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las dos zonas empiezan a observarse a partir del tercer mes, con un 4.4 % de mayor degradación en Allande, hasta los 12 meses, donde la diferencia es del 9.0 %, la máxima de todo el periodo de estudio. Desde los 15 hasta los 24 meses se observa una ligera estabilización en la pérdida de masa en ambas zonas, no mostrando, además, diferencias significativas entre ellas. Finalmente, desde los 24 hasta los 30 meses se produce un notable incremento en la degradación de la hojarasca en las dos zonas, estableciendo nuevamente diferencias significativas entre ambas, también favorables a Allande con un 7.6 % de mayor degradación a los 24 meses y un 4.0 % a los 30 meses.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos en otros trabajos con la misma especie (Raimundo *et al.*, 2008) pero con destino frutícola y en los cuales se realiza un manejo agronómico del suelo, del que están exentas nuestras parcelas forestales.

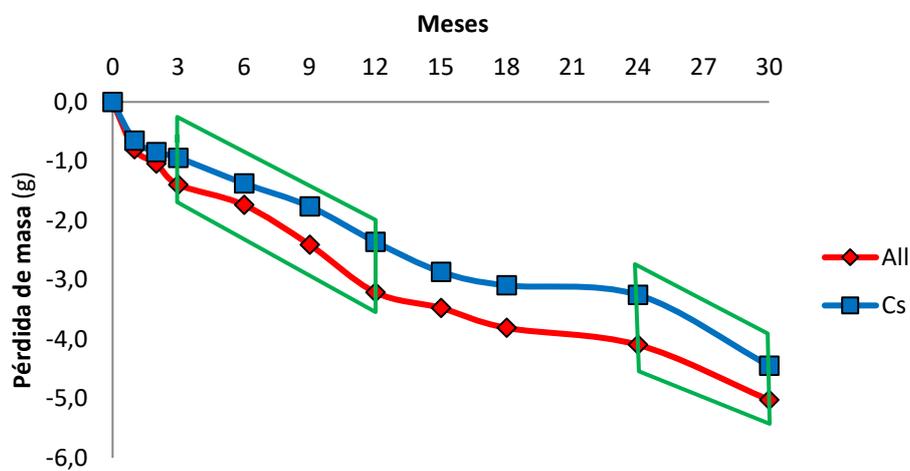


Figura 4.5. Pérdida de masa de la hojarasca (secada a 70 °C) en los once muestreos realizados durante 30 meses en las zonas de estudio, Allande (All, rojo) y Caso (Cs, azul). En verde se enmarcan los muestreos que presentan diferencias significativas en la pérdida de masa de la hojarasca entre las dos zonas de estudio (ANOVA, comparación de medias, $p \leq 0.05$, $n = 9$).

Además de los factores climáticos, actividad microbiana y pequeña fauna del suelo, la propia composición de la hojarasca es uno de los factores que más influye en la degradación (Martínez-Yerizar *et al.*, 2007; Carnevale & Lewis, 2009; García-Palacios *et al.*, 2013), donde los compuestos fenólicos, dado su influencia en las relaciones tróficas que se establecen en el mantillo, posiblemente desempeñen un papel importante.

4.3.2.2 Fenoles totales

Los FT analizados en las hojas muestreadas *in vivo* en julio mostraban poca diferencia entre zonas, valor medio de los dos muestreos de 114 y 117 mg EAG g_{ps}^{-1} para Allande y Caso, respectivamente. Sin embargo, tras la considerable reducción en FT que se produce antes de la caída de la hoja y que parece tener menor intensidad en Caso, el contenido de las hojas de Allande pasa a ser la mitad del que muestran las hojas de Caso, 28 y 56 mg EAG g_{ps}^{-1} para Allande y Caso, respectivamente (**Figura 4.6.A**). Tras 12 meses de permanencia de la hojarasca en el mantillo, se reduce significativamente el contenido de FT y toman valores prácticamente iguales, 4 y 5 mg EAG g_{ps}^{-1} para ambas localidades. La disminución de la concentración de FT en *C. sativa* previa a la caída de la hoja es debido a la degradación natural de este tipo de compuestos durante el período de senescencia de este órgano, al igual que ocurre en otras especies, como *Quercus robur* (Thomas & Schafellner, 1999; Covelo & Gallardo, 2004) o *Picea abies* (Gallet & Lebreton, 1995). Estos resultados nos llevan a concluir

que los datos del perfil fenólico medidos en las hojas de julio no serían totalmente representativos del aporte fenólico de la hojarasca y que para estos compuestos ocurre un proceso similar al observado para nutrientes, siendo la eficiencia en la reducción mayor en Allande (un cuarto) que en Caso (la mitad) e incrementando de esta forma las diferencias en los aportes estimados a partir de los datos obtenidos de los tejidos *in vivo*. Esta drástica reducción en FT después de 12 meses de permanencia de la hojarasca en el mantillo, cerca del 90 %, independientemente de la concentración de partida, llega a valores muy bajos, igualándose en ambas localidades. La lixiviación producida por la lluvia o la degradación de estos compuestos serían los posibles factores que inducen esta disminución, que se produce de forma muy rápida también en otras especies como *Picea abies* y *P. mariana*, alcanzando un 80 % en el primer año, con una caída muy importante en los seis primeros meses (Lorenz *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos en pérdida de biomasa de la hojarasca mantienen una pauta diferente en las 2 localidades también en el segundo año de permanencia (**Figura 4.5**), no relacionable *a priori* con la composición fenólica al final del primer año que iguala ambas localidades (**Figura 4.6.A**), sin embargo, no descarta el potencial papel de estos compuestos, ya que su actuación puede ser indirecta a través de la modificación del entorno e incluso seguir siendo directa en el segundo año, dada su potencial permanencia en el mantillo.

4.3.2.3 Cenizas

En la **Figura 4.6.B** se recoge el resultado del análisis de cenizas de la hojarasca durante los primeros 12 meses de permanencia en el mantillo. Los resultados muestran un incremento significativo en este periodo y de forma muy similar en ambas localidades, no observándose diferencias según ubicación. El incremento de cenizas a los 12 meses indica de forma indirecta la pérdida de MO en el proceso natural de degradación de la hojarasca, aspecto valorado de forma directa en la pérdida de biomasa (**Figura 4.5**), cuyos resultados podrían relacionarse con la influencia de la composición fenólica inicial (**Figura 4.6.A**) en esta degradación. La degradación de la MO parece estar influenciada por el contenido de compuestos capaces de inhibir la actividad biológica en los tejidos. Singh *et al.* (1999) obtuvieron correlaciones positivas del contenido de cenizas con los compuestos solubles en agua, entre los que estarían algunos compuestos fenólicos, que consideraron como uno de los mejores predictores de la pérdida de masa de la hojarasca, además de la mineralización de N y P. Tripathi *et al.* (2006), para abedul y bambú, correlacionaron significativamente de forma negativa las cenizas de la hojarasca con los contenidos de C y N.

4.3.2.4 Análisis elemental

Los resultados obtenidos para el análisis elemental de C, H y N de la hojarasca expresados como, % (m/m) y el cociente C/N se muestran en la **Figura 4.6.C y D**, respectivamente. A excepción del N, no se aprecian diferencias significativas entre las dos ubicaciones en el momento de la caída de las hojas. El contenido en N en la hojarasca resultó ser menor en Caso, que, sin embargo, en Julio presentaba un mayor

contenido en las hojas (Tabla 3.7), lo que indica que la resorción de los nutrientes antes de la dehiscencia de las hojas es más eficiente en las zonas menos apropiadas para la especie. Después de 12 meses de permanencia de la hojarasca en el mantillo, se mantienen las diferencias en este elemento y también se observan para el H, en el mismo sentido, lo que indica que el proceso de liberación de estos elementos está ocurriendo también de forma diferencial. No obstante, el C, elemento mayoritario, no muestra diferencias significativas para ninguna de las fechas analizadas, pero si se manifiestan expresadas en la relación C/N, manteniéndose esta relación significativamente superior en Caso. Este menor contenido en N y mayor relación C/N tiene su reflejo en el análisis fisicoquímico del suelo (Tabla 3.6), si bien, en este caso, sin llegar a ser significativamente diferentes. Una relación C/N elevada se asocia con un menor grado de descomposición, debido a unas temperaturas más bajas, menor aporte de MO o de N en esa MO, incremento en el secuestro de N en estructuras recalcitrantes o a la actividad de los organismos vivos del suelo (Pastor *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1998). Desde este punto de vista, las parcelas de Caso estarían recibiendo un aporte en MO más desfavorable en cuanto al equilibrio C/N, pero, además, las propias condiciones ambientales de las parcelas, como las menores temperaturas (Tabla 3.3), lo mantendrían, ya que tanto la hojarasca, después de un año de permanencia (**Figura 4.6.C y D**), como el análisis de suelo de las parcelas (Tabla 3.6), así lo atestiguan. La evolución en el tiempo del C y N, en ambas zonas, muestra una reducción significativa para el elemento mayoritario (C) y un aumento para el N en esos 12 meses de permanencia (**Figura 4.6.C**), lo que conlleva una reducción de la relación C/N, resultado similar al encontrado para dos especies del género *Picea* evaluadas en condiciones ambientales diferentes (Lorenz *et al.*, 2000).

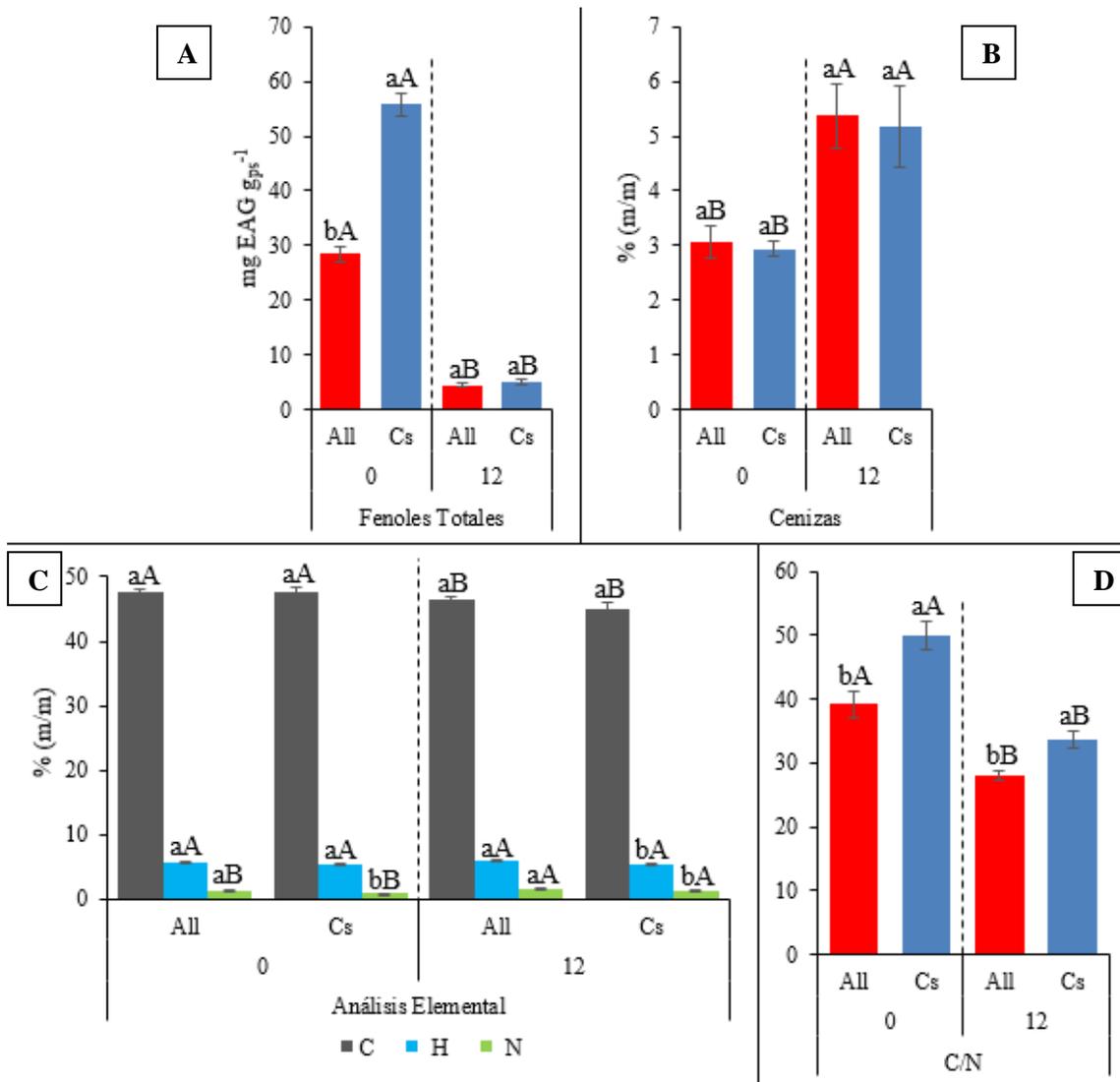


Figura 4.6. Análisis realizados a la hojarasca (secada a 70 °C) de *Castanea sativa* en Allande (All, en rojo) y Caso (Cs, en azul) en la caída de la hoja (0) y a los 12 meses. A: Fenoles Totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco. B: Análisis de cenizas. C: Análisis Elemental de C (negro), H (azul claro) y N(verde) expresados como % (m/m). D: Relación C/N. En cada análisis, diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre zonas por muestreo, y diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre muestreos por zona. ANOVA, $p \leq 0.05$, modelo lineal general univariado, $n = 27$ para Fenoles Totales, y $n = 9$ para el resto de los análisis.

Los valores alcanzados para la relación C/N después de 12 meses de permanencia (**Figura 4.6.D**) están muy por encima de los valores óptimos para considerarse una buena humificación, el N tiende a inmovilizarse cuando la relación C/N es superior a 20, retardando la descomposición de la hojarasca (Ngoran *et al.*, 2006), que, sin embargo, con porcentajes de pérdida de masa de 36.1 y 27.2 % , para Allande y Caso, respectivamente (**Figura 4.5**) , es similar a la obtenida por Raimundo *et al.* (2008) para esta misma especie, y superior a lo descrito en otras especies, como las 2 especies de abeto que detalla Lorenz *et al.* (2000), superando el 50 % de degradación tras los 36 meses que duró el estudio.

A través del contenido en N y la relación C/N puede preverse la mineralización de la MO (Torreta & Takeda, 1999). La liberación del N vegetal también está influenciada por el contenido fenólico, como observaron Handayanto & Giller (1994). Estos autores valorando la degradación de podas en leguminosas, obtuvieron buenas correlaciones negativas entre el N liberado y la relación del contenido en (ligninas+fenoles)/N. Seneviratne *et al.* (1997), en hojas de leguminosas y girasol, no obtuvieron las mejores correlaciones para esa relación, y si con el contenido fenólico, obteniendo correlaciones negativas significativas para altos regímenes de humedad (>31 L m⁻² durante 8 semanas). En algunas especies, como *Aegiceras corniculatum*, el contenido en N y P en hojas maduras y senescentes también muestra correlaciones negativas con el contenido fenólico total (Chen *et al.*, 2016). Así, en nuestra hojarasca recién caída, el mayor contenido en N observado en Allande estaría relacionado con el menor contenido en FT. Por lo que respecta a los compuestos de naturaleza fenólica, su degradación o lixiviado fue muy alto, superior al 90% al cabo de un año, por lo que su papel directo sobre la disponibilidad de N, dada su unión a proteínas, o su papel indirecto a través de los microorganismos del suelo, podría ser discutible (Lorenz *et al.*, 2000). No obstante, no hay que descartar su influencia en el reciclado de nutrientes a través de los lixiviados, tal como concluyen Majuakim & Kitayama (2013) y que podrían justificar las diferencias encontradas en la relación C/N entre localidades.

4.3.3 Meso y macrofauna y actividad microbiana del suelo

Un factor para tener muy en cuenta en la degradación de la hojarasca es la presencia, tipo y actividad de la fauna presente en el suelo y de la componente microbiológica. A pesar de que la gran fauna (reptiles, anfibios, aves y mamíferos) también participa en este proceso, fragmentando la hojarasca y transformándola en abono orgánico tras su ingestión y excreción, no se ha tenido en cuenta, ya que la ingesta se presupone escasa o nula en base a los estudios realizados de forma paralela sobre la producción de porcino autóctono del Principado de Asturias (Gochu Asturcelta) en régimen extensivo en monte bajo de castaño. Así, el análisis de la fauna edáfica en las parcelas objeto de estudio, Allande y Caso se limitó a la pequeña fauna y desde el punto de vista microbiológico se evaluó la abundancia, actividad y diversidad a través de los perfiles fisiológicos-catabólicos bacterianos y las respiraciones microbianas como bioindicadores de la calidad del suelo.

4.3.3.1 Estudio meso y macro faunístico

A partir de la identificación taxonómica realizada en las parcelas de estudio en los tres muestreos faunísticos llevados a cabo en noviembre de 2015 y febrero y mayo de 2016, se caracterizó y comparó la estructura de las comunidades de pequeña fauna (meso y macrofauna) en la hojarasca de Allande y Caso. La división de la fauna identificada entre meso y macrofauna se realizó en función de la exclusión por tamaño que permitiera diferenciar aquellos individuos capaces de atravesar la malla con la que se confeccionaron las bolsas empleadas en el estudio de la degradación de la hojarasca y

que tenían un paso de luz de 1.6 x 1.8 mm, denominándose mesofauna a los que accederían al interior y macrofauna a los que solo actuarían desde el exterior.

Los taxones identificados, hasta el nivel de orden en la mayoría de los casos, en la hojarasca de las zonas de estudio fueron los herbívoros Coleoptera, Collembola, Dermaptera, Diptera, Ephemeroptera, Glomerida, Haplotaxida, Hemiptera, Heterobranchia, Hymenoptera, Isopoda, Julida, Lepidoptera, Orthoptera, Trichoptera y Zygentoma, el omnívoro Opiliones, y los predadores Acariformes, Araneae, Geophilomorpha, Lithobiomorpha y Pseudoscorpiones. Los taxones Heterobranchia y Acariformes, debido a su complejidad para diferenciarlos, sólo se pudieron identificar hasta superorden. Collembola es considerado como orden por algunos autores (Grimaldi & Engel, 2005; Gullan & Craston, 2010), como subclase por otros (Delsuc *et al.*, 2003, Gao *et al.*, 2008) e incluso como clase (Mandaville, 1999). En la **Figura 4.7** se muestra el promedio del número de individuos de cada orden en las 3 parcelas de cada zona de estudio.

En la **Figura 4.8** se muestran los mejores ajustes obtenidos para las curvas de rango-abundancia (dominancia/diversidad o diagramas de Whittaker), considerando como mejor modelo de ajuste aquel que presentó un menor criterio de información de Akaike, parámetro que ofrece una medida de la calidad relativa de un modelo estadístico para un conjunto de datos. Los resultados obtenidos con estas representaciones, y sus correspondientes ajustes para toda la pequeña fauna (meso y macrofauna), ponen de manifiesto diferencias en cuanto a las comunidades de invertebrados en las dos zonas de estudio. En el primer y tercer muestreo, noviembre 2015 y mayo 2016, Allande presenta un modelo Zipf, donde la abundancia del taxón *i*-ésimo es inversamente proporcional al rango que ocupa, siguiendo el principio de “mínimo esfuerzo” o minimización de entropía, y Caso se ajusta a un modelo Mandelbrot, con distribución fractal, cuya estructura básica se repite a diferentes escalas. En el muestreo intermedio (febrero 2016), Allande se ajusta al modelo Mandelbrot, que presenta Caso en los 2 muestreos extremos y esta última zona toma un modelo nuevo, Null, en el que los individuos se distribuyen al azar entre los taxones observados.

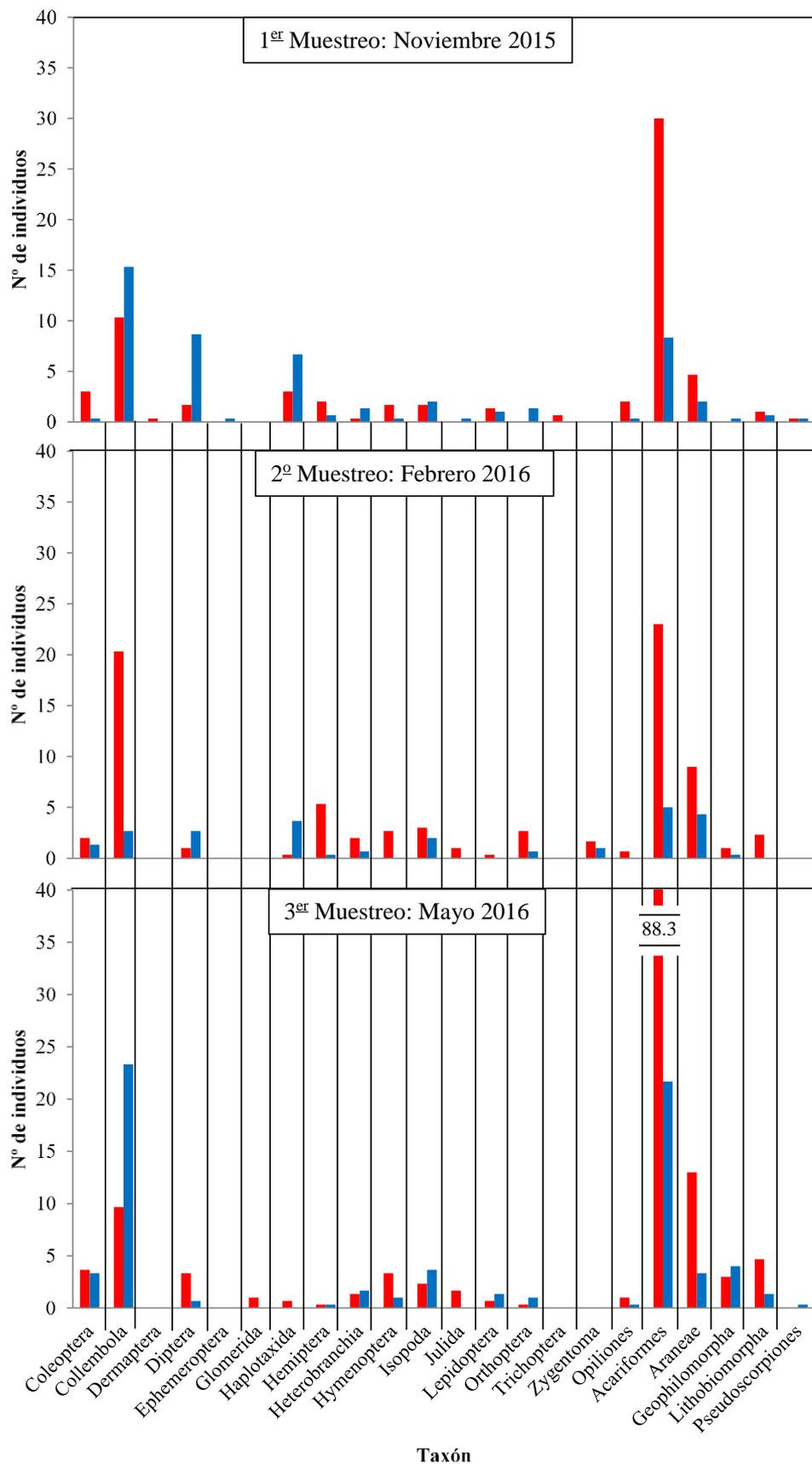


Figura 4.7. Promedio del número de individuos de meso y macrofauna de las tres parcelas en cada zona de estudio, Allande (en rojo) y Caso (en azul), para los taxones identificados en los tres muestreos realizados.

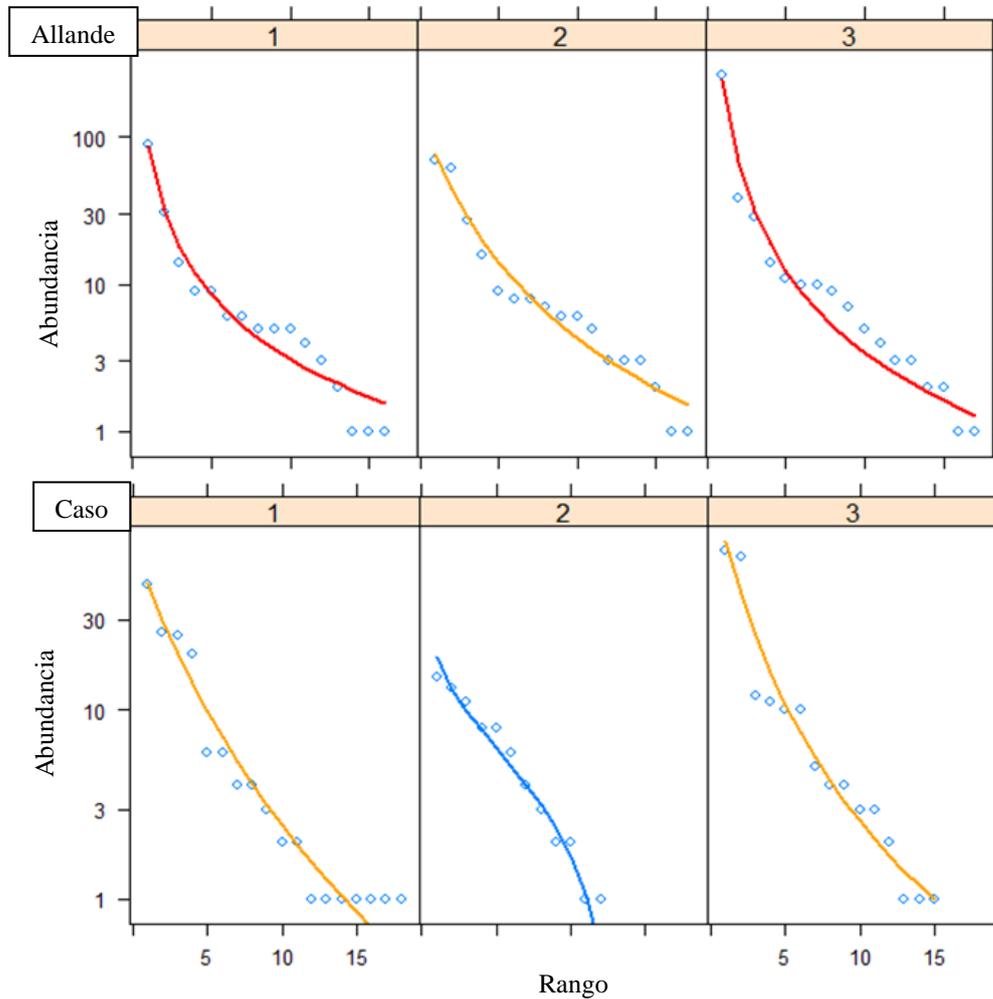


Figura 4.8. Mejores ajustes de los modelos de curvas de rango-abundancia en las zonas de estudio, Allande y Caso, para los muestreos de noviembre 2015 (1), febrero 2016 (2) y mayo 2016 (3). Los modelos representados son Zipf (rojo), Mandelbrot (naranja) y Null (azul), obtenidos con el paquete Vegan del software estadístico R.

Aunque los modelos de las curvas de rango-abundancia son diferentes en cada muestreo para las 2 zonas, aquellos con mayor pendiente son los obtenidos en Caso, lo que implica una menor equitatividad de la pequeña fauna (**Figura 4.8**).

La cuantificación de la biodiversidad, mediante el índice H, y la equitatividad, a través del índice J, para cada zona de estudio en los 3 muestreos realizados se presentan en la **Tabla 4.5**. En contra de lo esperado, según los ajustes de los modelos de curva rango-abundancia, la equitatividad no mostró diferencias significativas entre zonas, aunque si entre los 3 muestreos (febrero 2016 > noviembre 2015 > mayo 2016), para la parcela de Caso. En Allande, este parámetro mostró el mismo orden que en Caso, pero sin diferencias significativas. Este orden de equitatividad que se mantiene en ambas

ubicaciones se asocia posiblemente a las condiciones climáticas en los momentos de muestreo. Para el Principado de Asturias, la AEMET describió noviembre de 2015 como muy cálido y seco, febrero de 2016 térmicamente normal y extremadamente húmedo, y mayo de 2016 cálido y normal o húmedo. La biodiversidad medida a través del índice H no mostró diferencias significativas ni entre localidades ni entre muestreos.

Tabla 4.5. Biodiversidad y equitatividad cuantificadas con los índices de Shannon (H) y Pielou (J) respectivamente, para los tres muestreos realizados en las zonas de estudio, Allande (All) y Caso (Cs) (media \pm EE). Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestreos de una misma zona (ANOVA, *post hoc* DMS, $p \leq 0.05$, $n = 3$).

	Noviembre 2015		Febrero 2016		Mayo 2016	
	All	Cs	All	Cs	All	Cs
Biodiversidad (H)	1.83 (± 0.33)	1.94 (± 0.13)	2.03 (± 0.16)	1.79 (± 0.20)	1.51 (± 0.15)	1.72 (± 0.068)
Equitatividad (J)	0.76 (± 0.10)	0.80 ^b (± 0.016)	0.78 (± 0.052)	0.89 ^a (± 0.012)	0.61 (± 0.076)	0.72 ^c (± 0.0038)

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la proporción de herbívoros, predadores y omnívoros presentes en el conjunto de la meso y macrofauna. Del total de órdenes determinados, un 73 % corresponde a herbívoros, 23 % a predadores y 4 % a omnívoros. En la **Figura 4.9** se representan los porcentajes medios de herbívoros y predadores en los tres muestreos y en las 2 zonas, observándose una distribución de ambos diferente según zona. En Allande, los porcentajes de ambos grupos se mantienen entorno al 50 % en los 2 primeros muestreos (noviembre 2015 y febrero 2016), incrementándose la abundancia de predadores de forma significativa en el tercer muestreo (mayo 2016). Por el contrario, en Caso se parte, en noviembre de 2015, de una tasa de herbívoros significativamente superior al de predadores, diferencia que en los siguientes muestreos va disminuyendo hasta situar estos porcentajes próximos al 50 %. Aunque visualmente (**Figura 4.9**) puede parecer que la evolución del porcentaje de herbívoros y predadores es opuesta en ambas zonas, la diferencia principal es la situación inicial, ya que tanto en Allande como en Caso se produce una reducción absoluta del porcentaje de herbívoros similar (25), mientras que la reducción relativa es mayor en Allande, donde los herbívoros disminuyen un 50 %, frente al 33 % de Caso. La evolución del porcentaje de predadores es totalmente contraria a la de los herbívoros, lo que hace pensar en el equilibrio natural existente en la cadena trófica. Así, el mayor porcentaje de predadores existente en Allande hace que se alimenten de los herbívoros, reduciendo la población de estos a la mitad, mientras que en Caso, el menor porcentaje de predadores reduce en menor medida los herbívoros. Aunque pudiera existir algún tipo de efecto disuasorio, repelente, tóxico e incluso mortal de los fenoles sobre la pequeña fauna herbívora presente en el mantillo forestal (Wardle *et al.*, 1998; Hättenschwiler & Vitousek, 2000; Kula & Lazorík 2015), compuestos presentes en mayor cantidad en la hojarasca de Caso (**Figura 4.6.A**), este efecto no se puede valorar con este tipo de ensayo, ya que la presencia de predadores impide ver el posible efecto de los fenoles en herbivoría.

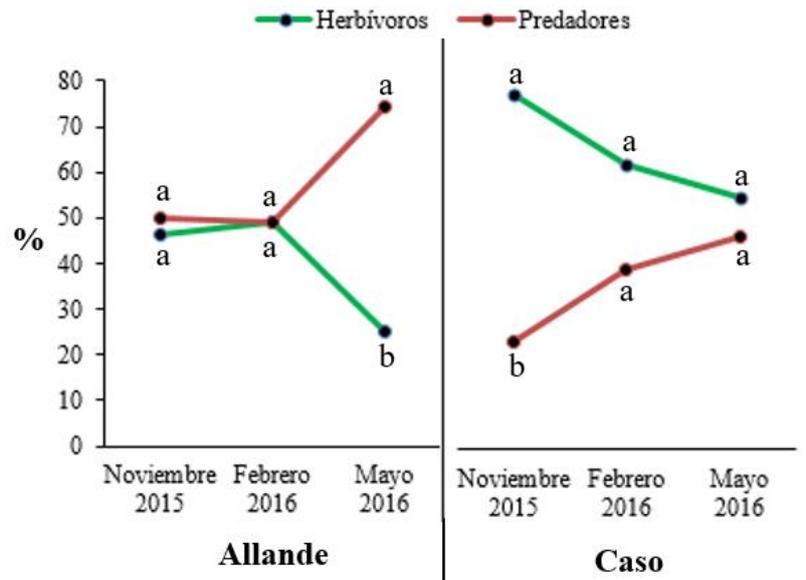


Figura 4.9. Porcentaje medio de herbívoros y predadores para Allande y Caso en cada muestreo. Diferentes letras indican diferencias significativas entre herbívoros (verde) y predadores (rojo) en cada zona. ANOVA, $p \leq 0.05$, modelo lineal general univariado, $n=3$.

Todos los datos obtenidos en relación con la meso y macrofauna no permiten establecer diferencias significativas entre las 2 zonas, ya que, aunque los modelos rango-abundancia son diferentes, ni el índice H ni el J muestran esas diferencias.

4.3.3.2 Análisis microbiológico

En la **Tabla 4.6** se muestran los resultados obtenidos del análisis de los parámetros microbianos con potencial bioindicador de la calidad del suelo: respiración microbiana y diversidad funcional estimada a partir de los perfiles fisiológicos a nivel de comunidad bacteriana heterótrofa cultivable en los suelos de las zonas objeto de estudio. Los valores de AWCD, significativamente superiores en Allande ($p \leq 0.05$), indican un mayor potencial catabólico bacteriano, implicando una mayor velocidad de degradación de fuentes de carbono por las comunidades bacterianas cultivables en los suelos de esta zona. También fueron significativamente más altos en esa localidad tanto los valores de NSU, que reflejan una mayor capacidad para degradar diferentes fuentes de carbono, o sea mayor versatilidad metabólica, como el índice H, que tiene en consideración la riqueza de especies y su abundancia relativa de forma simultánea, indicando una mayor riqueza, abundancia y diversidad funcional bacteriana. Asimismo, el valor de RB es superior en estas mismas parcelas evidenciando que además es significativamente mayor la actividad microbiana. Las dos valoraciones, RIS y qCO_2 (RB/RIS) que no mostraran diferencias significativas, debido quizá al sesgo estadístico al no poder cuantificar la RIS en seis de las muestras de Caso por no alcanzar el límite de cuantificación para este parámetro ($5 \mu\text{g C-CO}_2 \text{ (h g}_{ps})^{-1}$), también fueron favorables a Allande y la diferencia sería aún superior si se consideran los no detectados.

Tabla 4.6. Perfiles fisiológicos-catabólicos bacterianos (AWCD: promedio del desarrollo de color por pocillo, NSU: número de sustratos utilizados, H: índice de Shannon) y respiración microbiana (RB: respiración basal, RIS: respiración inducida por sustrato, qCO_2 : cociente metabólico) en los suelos de Allande y Caso (media \pm EE). * Diferencia significativa entre zonas. ANOVA, $p \leq 0.05$, modelo lineal general univariado, $n = 9$ a excepción de ^a donde $n=3$ por no alcanzar 6 de las muestras analizadas el valor límite de cuantificación para RIS ($5 \mu\text{g C-CO}_2 (\text{h g}_{\text{ps}})^{-1}$).

Zona	AWCD	NSU	H	RB ($\mu\text{g C-CO}_2 \cdot (\text{h} \cdot \text{g}_{\text{ps}})^{-1}$)	RIS ($\mu\text{g C-CO}_2 \cdot (\text{h} \cdot \text{g}_{\text{ps}})^{-1}$)	qCO_2
Allande	0.656* (± 0.041)	16.67* (± 0.58)	3.73* (± 0.062)	3.42* (± 0.12)	8.33 (± 0.66)	0.425 (± 0.028)
Caso	0.517* (± 0.048)	14.33* (± 0.85)	3.46* (± 0.11)	2.41* (± 0.25)	6.73 ^a (± 0.79)	0.477 ^a (± 0.0098)

En consecuencia, la comparación de los suelos de ambas localidades permite concluir que los de Allande albergan unas comunidades microbianas con mayor actividad y biomasa, junto con una mayor diversidad funcional bacteriana heterótrofa, en relación con la utilización de diferentes fuentes de carbono por la porción cultivable de dicha comunidad bacteriana, lo cual, *a priori*, les confiere una ventaja competitiva, como se deriva de su versatilidad metabólica. Esta situación es compatible con la mayor degradación, pérdida de biomasa, de la hojarasca en las parcelas de esta zona (**Figura 4.5**), así como con unas condiciones más favorables en cuanto a pH y nutrientes disponibles en la fracción asimilable (Tabla 3.6), con una estructura de suelo menos proclive al encharcamiento (Figura 3.5) y con la influencia, directa o indirecta, de los compuestos fenólicos que se incorporan al mismo procedentes de los órganos/tejidos que caen al suelo (**Figura 4.4** y **Tablas 4.3** y **4.4**). Directamente, algunos de estos compuestos de naturaleza fenólica pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre ciertos microorganismos (Wardle *et al.*, 1998; Wallstedt *et al.*, 2000) y en concreto, para esta especie, Hao *et al.* (2012) demostraron la actividad antimicrobiana de extractos de castaño frente a ciertos microorganismos edáficos. Indirectamente, los fenoles pueden hacer variar el pH del suelo, factor muy influyente en la comunidad microbiana edáfica, siendo el crecimiento bacteriano favorecido por condiciones neutras o ligeramente alcalinas (Rousk *et al.*, 2009), aunque algunas bacterias acidófilas también se desarrollen a bajos pH (Glenn & Dilworth, 1991). Así, el carácter ácido de los fenoles aumentará la actividad de los protones (menor pH) en aquellos suelos donde el contenido fenólico sea mayor, contribuyendo a mantener un pH más ácido en Caso (Tabla 3.6) como consecuencia de un aporte mayor de MO con alto contenido en estos compuestos (**Tablas 4.3** y **4.4**) y favoreciendo una menor actividad microbiana.

A nivel del ecosistema, se sabe que los compuestos de naturaleza fenólica, y fundamentalmente los TC, orquestan las relaciones de la planta con su entorno, tanto a nivel de superficie como a nivel de suelo. Así, en *Populus* se definen varios aspectos bien documentados, en los que se asume su importante papel (Schweitzer *et al.*, 2008). En la parte aérea condicionarían la productividad, la eficiencia de los herbívoros, sus poblaciones y composición de las comunidades, las relaciones multitróficas y las relaciones con endófitos. Además, a nivel de suelo actuarían sobre producción de raíz fina, comunidades microbianas, degradación de la hojarasca y mineralización y

nitrificación. Sobre parte de estas interacciones hemos realizado estudios en una especie en la que, hasta donde sabemos, aún no se había abordado la temática desde el punto de vista de relación de la planta con su entorno. Para *Populus* se describen las correspondientes relaciones de retroalimentación planta/entorno que para castaño abordamos de forma separada según el criterio direccional del efecto que consideramos más importante en los Capítulos 3 y 4.

Según la bibliografía, el órgano con mayor plasticidad en respuesta al entorno son las hojas (Schweitzer *et al.*, 2008), cuyo contenido en TC depende del CO₂, O₃, disponibilidad de nutrientes o presencia de herbívoros, siendo además el órgano que presenta una mayor heredabilidad en sentido amplio ($H^2=0.70$ frente a $H^2=0.38$ para ramas), lo que implica que las hojas responden de forma más plástica al ambiente, heredando esta posibilidad. No obstante, la mayor parte de los estudios realizados se refieren a cambios cuantitativos en una familia de compuestos, por lo que la ampliación, al menos desde el punto de vista de las familias de compuestos, nos da una información relevante en este sentido.

Los resultados de este trabajo confirman que las hojas son el órgano más destacado en cuanto a la posible influencia del árbol en su entorno, no tanto por la composición más elevada en las distintas familias de compuestos fenólicos, ya que solamente lo es para Ets (**Figura 4.4**), ni por establecer las máximas diferencias entre CE, y por tanto responder a un entorno diferencial (**Figura 4.3**), sino por tratarse de órganos renovables anualmente con un reparto de biomasa muy favorable (**Tablas 4.3 y 4.4**).

Respecto a las familias de compuestos fenólicos, confirmaríamos que el mayor impacto en el medio ambiente probablemente sea debido a los TC, no por ser mayoritarios, sino por ser los que muestran mayor plasticidad en respuesta al ambiente, llegando a ser más de tres veces superiores en una CE desfavorable para el órgano con mayor peso en el entorno, las hojas (**Tabla 4.3**), coincidiendo con lo descrito para estos compuestos, que pueden llegar a ser hasta 5 veces superiores en respuesta al entorno (Schweitzer *et al.*, 2008).

En cuanto a su impacto en el entorno, se ha valorado la degradación de la propia hojarasca y se ha visto que existe un paralelismo entre la velocidad de degradación y la microbiota, y ambos son inversamente proporcionales a la composición fenólica de la hoja y, en mayor grado de la hojarasca, pudiendo asociarse a la diferente CE, entendiendo esto como una visión holística en la que la componente de alguna de las familias de estos compuestos fenólicos, como son los TC, muestran un rol adaptativo (Schweitzer *et al.*, 2008).

A pesar de no haberse observado aspectos diferenciales claros de la meso y macrofauna, sin embargo, si se apreciaron en la microbiota edáfica, pudiendo esta aportar sus efectos beneficiosos al desarrollo del castaño, diferenciado por la CE de los castaños y la calidad del producto del bosque, en relación con su metabolismo secundario y su estatus nutricional (Capítulo 3).

4.4 BIBLIOGRAFÍA

Al Harun, M. A. Y.; Johnson, J.; Uddin, M. N. & Robinson, R. W. (2015). Identification and phytotoxicity assessment of phenolic compounds in *Chrysanthemoides monilifera* subsp. *monilifera* (boneseed). PLoS ONE, 10 (10), e0139992: 1-19.

Barreira, J. C.; Ferreira, I. C.; Oliveira, M. B. P. & Pereira, J. A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. Food Chemistry, 107 (3): 1106-1113.

Basile, A.; Sorbo, S.; Giordano, S.; Ricciardi, L.; Ferrara, S.; Montesano, D.; Castaldo Cobianchi, R.; Vuotto, M. L. & Ferrara, L. (2000). Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. Fitoterapia, 71, Suppl 1: S110-6.

Buckley, P. & Howell, R. (2004) The Ecological Impact of Sweet Chestnut Coppice Silviculture on Former Ancient, Broadleaved Woodland Sites in South-east England. English Nature, Report 627. 154 pp.

Bobinaitė, R.; Viškelis, P. & Venskutonis, P. R. (2012). Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. Food Chemistry, 132 (3): 1495-1501.

Buondonno, A.; Capra, G. F.; Coppola, E.; Dazzi, C.; Grilli, E.; Odierna, P.; Rubino, M. & Vacca, S. (2014). Aspects of soil phenolic matter (SPM): An explorative investigation in agricultural, agroforestry, and wood ecosystems. Geoderma, 213: 235-244.

Burnham, K. P.; Anderson, D. R. & Huyvaert, K. P. (2011). AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and comparisons. Behavioral Ecology and Sociobiology, 65 (1): 23-35.

Carnevale, N. J. & Lewis, J. P. (2009). Leaf litter quality and litter decomposition of woody species in a seasonal subtropical forest (Argentina). ECOTROPICA, 15: 23-33.

Castellanos-Barliza, J. & León, J. D. (2011). Descomposición de hojarasca y liberación de nutrientes en plantaciones de *Acacia mangium* (Mimosaceae) establecidas en suelos degradados de Colombia. Revista de Biología Tropical, 59 (1): 113-128.

Castro-Huerta, R. A.; Falco, L. B.; Sandler, R. V. & Coviella, C. E. (2015) Differential contribution of soil biota groups to plant litter decomposition as mediated by soil use. PeerJ 3: e826.

Chen, H.; Xu, B.; Wei, S.; Zhang, L.; Zhou, H. & Lin, Y. (2016). Nutrient Resorption and Phenolics Concentration Associated with Leaf Senescence of the Subtropical Mangrove *Aegiceras corniculatum*: Implications for Nutrient Conservation. Forests, 7 (290): 1-12.

Cheng, F. & Cheng, Z. (2015) Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. *Frontiers in Plant Science*, 6, article 1020: 1-16.

Chou, C.-H. (2009) Biochemical interactions among plants: allelopathy as ecosystem regulator. Volume V (Neurophysiology, Plant Physiology and Environment: A Synopsis Physiology and maintenance), edited by Osmo Otto Päiviö Hänninen & Mustafa Atalay, into Physiology and Maintenance, of *Encyclopedia of Biological, Physiological and Health Sciences*, in *Encyclopedia of life support systems* (Eolss Publishers Co. Ltd., Oxford, United Kingdom): 303-321.

Chu, H. F. (1949). How to know the immature insects. M. C. Brown Company Publishers; Iowa (EUA). 234 pp.

Covelo, F. & Gallardo, A. 2004. Green and senescent leaf phenolics showed spatial autocorrelation in a *Quercus robur* population in northwestern Spain. *Plant and Soil*, 259 (1): 267-276.

Delsuc, F.; Phillips, M. & Penny, D. (2003). Comment on "Hexapod Origins: Monophyletic or Paraphyletic?". *Science*, 301 (5639): 1482.

Directiva 92/43/CEE, del Consejo, de 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 206 (22 de julio de 1992): 7-50.

Eichhorn, S.; Erfurt, S.; Hofmann, T.; Seegmueller, S.; Németh, R. & Hapla, F. (2017). Determination of phenolic extractive content in sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood. *Wood Research*, 62 (2): 181-196.

Gallet, C. & Lebreton, P. (1995). Evolution of phenolic patterns in plants and associated litters and humus of a mountain forest ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 27 (2): 157–166.

Gao, Y.; Bu, Y. & Luan, Y.-X. (2008). Phylogenetic relationships of basal hexapods reconstructed from nearly complete 18S and 28S rRNA gene sequences. *Zoological Science*. 25 (11): 1139–1145.

García-Palacios, P.; Maestre, F.T.; Kattge, J. & Wall, D.H. (2013). Climate and litter quality differently modulate the effects of soil fauna on litter decomposition across biomes. *Ecology Letters*, 16 (8): 1045–1053.

Gelsomino, A.; Araniti, F.; Lupini, A.; Princi, G.; Petrovičová, B. & Abenavoli, M.A. (2015). Phenolic acids in plant-soil interactions: a microcosm experiment. *Journal of Allelochemical Interactions*, 1 (1): 25-38.

Glenn, A. R. & Dilworth, M. J. (1991). Soil acidity and the microbial population: Survival and growth of bacteria in low pH. En capítulo *Plant–Soil interactions at low pH*. *Proceedings of the Second International Symposium on Plant-Soil Interactions at*

Low pH, Virginia, EUA). Eds.: Wright, R. J.; Baligar, V. C. & Murrmann, R. P., 45: 567-579.

Grimaldi, D. & Engel, M. S. (2005). *Arthropods and the origin of insects. Evolution of the Insects*. Cambridge University Press: 93-118.

Gullan, P. J. & Cranston, P. (2010). *Insect systematics: phylogeny and classification. The Insects: an Outline of Entomology (4th edición)*. John Wiley and Sons: 189-222.

Halvorson, J. J.; Gonzalez, J. M. & Hagerman, A. E. (2011). Repeated applications of tannins and related phenolic compounds are retained by soil and affect cation exchange capacity. *Soil Biology and Biochemistry*, 43 (6): 1139–1147.

Halvorson, J. J.; Gonzalez, J. M. & Hagerman, A. E. (2013). Retention of tannin-C is associated with decreased soluble nitrogen and increased cation exchange capacity in a broad range of soils. *Soil Science Society of America Journal*, 77:1199–1213.

Handayanto, E. & Giller, K. E. (1994). Nitrogen release from prunings of legume hedgerow trees in relation to quality of the prunings and incubation method. *Plant and Soil*, 160 (2): 237-248.

Hao, J. J.; Liu, H.; Donis-Gonzalez, I. R.; Lu, X. H.; Jones, A. D. & Fulbright, D. W. (2012). Antimicrobial activity of chestnut extracts for potential use in managing soilborne plant pathogens. *Plant Dis*, 96 (3): 354-360.

Hättenschwiler, S. & Vitousek, P.M. (2000). The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology & Evolution*, 15 (6), 238-243.

ISO 16072:2002. Soil quality. Laboratory methods for determination of microbial soil respiration.

ISO 17155:2002. Soil quality. Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves.

Kanerva, S. 2007. Plant secondary compounds and soil microbial processes in carbon and nitrogen cycling in relation to tree species. *Dissertationes Forestales*, 52. 44 pp.

Karamać, M. (2009) Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by Tannin Constituents of Selected Edible Nuts. *International Journal of Molecular Sciences*, 10 (12): 5485-5497.

Kefeli, V. I.; Kalevitch, M. V. & Borsari, B. (2003). Phenolic Cycle in Plants and Environment. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2: 13-18.

Kula, E. & Lazorić, M. (2015). Comparison of Myriapoda in beech and spruce forests. *Journal of Forest Science*, 61 (7): 306–314.

Li, Z.-H.; Wang, Q.; Ruan, X.; Pan, C.-D. & Jiang, D.-A. (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15 (12): 8933-52.

Li, X.-J.; Wang Q.; Ni, S.; Ruan, X.; Wang, Y.-H.; Zhang, H. & Geoff W. (2013) Allelopathy comparison between *Castanea mollissima* and *C. dentata*. Chinese Journal of Plant Ecology, 37(2): 173-182.

Liang, D.; Wang, J.; Wang, Y.; Wang, F. & Jiang, J. (2008) Behavior of tannins in germanium recovery by tannin process. Hydrometallurgy, 93 (3–4), 140–142.

Lorenz, K.; Preston, C. M.; Raspe, S.; Morrison, I. K. & Feger, K. H. (2000). Litter decomposition and humus characteristics in Canadian and German spruce ecosystems: information from tannin analysis and ¹³C CPMAS NMR. Soil Biology and Biochemistry, 32 (6): 779-792.

Lorenz, K. & Preston, C. M. (2002). Characterization of high-tannin fractions from humus by carbon-13 cross-polarization and magic-angle spinning nuclear magnetic resonance. Journal of Environmental Quality, 31 (2): 431-436.

Majuakim, L. & Kitayama, K. (2013). Influence of polyphenols on soil nitrogen mineralization through the formation of bound protein in tropical montane forests of Mount Kinabalu, Borneo. Soil Biology and Biochemistry, 57, 14-21.

Malá, M.; Cvikrová, M.; Hrubcová, P. & Máchová. (2013). Influence of vegetation on phenolic acid contents in soil. Journal of Forest Science, 59 (7): 288–294.

Mandaville, S. M. (1999). Bioassessment of Freshwaters Using Benthic Macroinvertebrates-A Primer. First Ed. Project E-1, Soil & Water Conservation Society of Metro Halifax. Capítulo XVIII: Class Collembola (springtails).

Martínez-Yrizar, A.; Nuñez, S. & Búrquez, A. (2007). Leaf litter decomposition in a southern Sonoran Desert ecosystem, northwestern Mexico: Effects of habitat and litter quality. Acta Oecologica, 32: 291-300.

Martín, A.; Gallardo, J.F. & Santa-Regina, I. (1996). Dinámica de las fracciones orgánicas en la descomposición de hojas de rebollos y castaño. Silva Lusitana, 4 (2): 199-216.

Melguizo-Ruiz, N.; Jimenez-Navarro, G.; De Mas, E.; Pato, P.; Scheu, S.; Wise, D.H.; Austin, A.T. & Moya-Larano, J. (2016) Capítulo 3 (Deterioro trófico experimental en redes tróficas del suelo): 115-154, de la Tesis Doctoral Determinantes ecológicos de la red trófica del suelo de los hayedos: disponibilidad hídrica, regulación por grandes depredadores y estructuras clave en la hojarasca (Melguizo-Ruiz, N.; Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo)

Menéndez-Miguélez, M.; Álvarez-Álvarez, P.; Majada, J. & Canga, E. (2016). Management tools for *Castanea sativa* coppice stands in northwestern Spain. Bosque (Valdivia), 37 (1): 119-133.

- Michalak, A. (2006) Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15 (4): 523-530.
- Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. Manuales y Tesis Sociedad Entomológica Aragonesa, Volumen 1, Zaragoza (España). 84 pp.
- Mujić, I.; Dudaš, S.; Živković, J.; Tomin, J.; Zeković, Z.; Alibabić, V.; Jukić, H. & Šahinović, R. (2009). Determination of Total Phenolic Compounds in Cultivars of *Castanea sativa* Mill. In International Workshop on Chestnut Management in Mediterranean Countries-Problems and Prospects 815: 63-68.
- Nazzaro, M.; Mottola, M. V.; La Cara, F.; Del Monaco, G.; Aquino, R. P. & Volpe, M. G. (2012). Extraction and characterization of biomolecules from agricultural wastes. *Chemical Engineering*, 27: 331-336.
- Ngadze, E.; Coutinho, T.A.; Icishahayo, D. & van der Waals, J.E. (2014) Effect of calcium soil amendments on phenolic compounds and soft rot resistance in potato tubers. *Crop Protection*, 62: 40–45.
- Ngoran, A.; Zakra, N.; Ballo, K.; Kouamé, C.; Zapata, F.; Hofman, G. & Van Cleemput, O. (2006). Litter decomposition of *Acacia auriculiformis* Cunn. Ex Benth. and *Acacia mangium* Willd. under coconut trees on quaternary sandy soils in Ivory Coast. *Biology and Fertility of Soils*. 43: 102-106.
- Oksanen, J. (2016). *Vegan: ecological diversity*. R Project. 12 pp.
- Palm, C.A. & Sanchez, P.A. (1990). Decomposition and nutrient release patterns of the leaves of three tropical legumes. *Biotropica*, 22: 330–338.
- Pastor, J.; Gardner, R. H.; Dale, V. H. & Post, W. M. (1987). Successional changes in nitrogen availability as a potential factor contributing to spruce declines in boreal North America. *Canadian Journal of Forest Research*, 17 (11): 1394-1400.
- Patricio, M., Nunes, L., & Pereira, E. (2012). Litterfall and litter decomposition in chestnut high forest stands in northern Portugal. *Forest Systems*, 21 (2), 259-271.
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31 (8): 583-590.
- Psotová, J.; Lasovský, J. & Vicar, J. (2003) Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomedical Papers*, 147 (2): 147-153.
- R Development Core Team (2015). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna (Austria).

Raimundo, F.; Martins, A. & Madeira, M. (2008). Decomposition of chestnut litterfall and eight-year soil chemical changes under a no-tillage management system in Northern Portugal. *Annals of forest science*, 65: 408p1-11.

Rieff, G. G.; Natal-da-Luz, T.; Sousa, J. P.; Wallau, M. O.; Hahn, L. & Saccol de Sá, E. L. (2016). Collembolans and mites communities as a tool for assessing soil quality: effect of eucalyptus plantations on soil mesofauna biodiversity. *Current Science*, 110 (4): 713-719.

Rousk, J., Brookes, P. C., & Bååth, E. (2009). Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (6), 1589–1596.

Salazar, S. 2008. Estudio de procesos ecológicos para el desarrollo sostenible del castaño (*Castanea sativa*) de la Sierra de Francia. Tesis del Departamento de Biología animal, ecología, parasitología, edafología y química agrícola de la Universidad de Salamanca (España).

Santa Regina, I. (2000). Organic matter distribution and nutrient fluxes within a sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) stand of the Sierra de Gata, Spain. *Annals of Forest Science*, 57 (7): 691-700.

Santa Regina, I.; Leonardi, S. & Rapp, M. (2001). Foliar nutrient dynamics and nutrient-use efficiency in *Castanea sativa* coppice stands of southern Europe. *Forestry*, 74 (1): 1-10.

Sanz, M.; Cadahía, E.; Esteruelas, E.; Muñoz, A. M.; Fernández de Simón, B.; Hernández, T. & Estrella, I. (2010). Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (17): 9631–9640.

Schweitzer, J. A.; Madritch, M. D.; Bailey, J. K.; LeRoy, C. J.; Fischer, D. G.; Rehill, B. J.; Lindroth, R. L.; Hagerman, A. E.; Wooley, S. C.; Hart, S. C. & Whitham, T. G. (2008). From genes to ecosystems: the genetic basis of condensed tannins and their role in nutrient regulation in a *Populus* model system. *Ecosystems*, 11 (6): 1005-1020.

Seneviratne, G.; Van Holm, L. H. J. & Kulasooriya, S. A. (1997). Quality of different mulch materials and their decomposition and N release under low moisture regimes. *Biology and Fertility of Soils*, 26: 136-140.

Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*, 27: 379–423, 623–656.

Singh, K. P.; Singh, P. K. & Tripathi, S. K. (1999). Litterfall, litter decomposition and nutrient release patterns in four native tree species raised on coal mine spoil at Singrauli, India. *Biology and Fertility of Soils*, 29 (4): 371-378.

- Smith, C. K.; Munson, A. D. & Coyea, M. R. (1998). Nitrogen and phosphorus release from humus and mineral soil under black spruce forests in central Quebec. *Soil Biology and Biochemistry*, 30 (12): 1491-1500.
- Strobel, B. W. (2001). Influence of vegetation on low-molecular-weight carboxylic acids in soil solution: a review. *Geoderma*, 99: 169-198.
- Thomas, F.M. & Schafellner, C. (1999). Effects of excess nitrogen and drought on the foliar concentrations of allelochemicals in young oaks (*Quercus robur* L. and *Q. petraea* [Matt.] Liebl.). *Journal of Applied Botany*, 73, 222–227.
- Torreta, N.K. & Takeda, H. (1999). Carbon and nitrogen dynamics of decomposing leaf litter in a tropical hill evergreen forest. *European Journal of Soil Biology*; 35: 57-63.
- Tripathi, S. K.; Sumida, A.; Shibata, H.; Ono, K.; Uemura, S.; Kodama, Y. & Hara, T. (2006). Leaf litterfall and decomposition of different above-and belowground parts of birch (*Betula ermanii*) trees and dwarf bamboo (*Sasa kurilensis*) shrubs in a young secondary forest in Northern Japan. *Biology and Fertility of Soils*, 43 (2):, 237-246.
- UNE-EN 14774-3:2010. Biocombustibles sólidos. Determinación del contenido de humedad. Método de secado en estufa. Parte 3: Humedad de la muestra para análisis general.
- UNE-EN 14775:2010. Biocombustibles sólidos. Método para la determinación del contenido en cenizas.
- Vázquez, G.; Fernández-Agulló, A.; Freire, M. S.; Antorrena, G. & González-Álvarez, J. (2010). Chestnut bur extracts as antioxidants: optimization of the extraction stage. *WIT Transactions on Ecology and the Environment, Waste Management and the Environment V*, 140: 155-165.
- Wallstedt, A.; Nilsson, M. C.; Zackrisson, O. & Odham, G. (2000) *Journal of Chemical Ecology*, 26 (6): 1311.
- Wardle, D. A.; Nilsson, M.-C.; Gallet, C. & Zackrisson, O. (1998). An ecosystem-level perspective of allelopathy. *Biological Reviews*, 73: 305–319.
- Yekwayo, I., Pryke, J. S., Roets, F., & Samways, M. J. (2016). Conserving a variety of ancient forest patches maintains historic arthropod diversity. *Biodiversity and conservation*, 25 (5): 887-903.
- Živković, J.; Zeković, Z.; Mujić, I.; Vidović, S.; Cvetković, D.; Lepojević, Ž.; Nikolić, G. & Trutić, N. (2010). Scavenging capacity of superoxide radical and screening of antimicrobial activity of *Castanea sativa* Mill. extracts. *Czech Journal of Food Sciences*, 28 (1): 61-68.

Capítulo 5

CAPÍTULO 5

Influencia de la gestión forestal en las defensas de *Castanea sativa* Miller

5.1 INTRODUCCIÓN

Desde mediados del siglo pasado, el cultivo del castaño (*Castanea sativa* Miller) disminuyó considerablemente debido a la pérdida de importancia de la especie como alimento básico, la despoblación progresiva del campo y la aparición de patógenos causantes de enfermedades como la tinta, producida por el hongo *Phytophthora cambivora* Petr. & Buism., o el chancro, causada por *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr (Zlatanov *et al.*, 2013), y, como consecuencia, los castaños se abandonaron parcial o totalmente (Pividori *et al.*, 2005; Lushaj & Tabaku, 2009). Sin embargo, los castaños siguen cubriendo grandes áreas en la cuenca mediterránea, especialmente en Portugal, España, Francia, Italia y Grecia, por lo que, es urgente analizar los efectos del abandono para desarrollar estrategias que permitan la conservación de la biodiversidad y, al mismo tiempo, optimicen la productividad y rentabilidad (Gondard *et al.*, 2007).

El estado sanitario de los castaños asturianos de monte bajo debería ser tenido en cuenta, ya que aunque en Asturias la extensión que ocupan, 80 560.05 ha (AIEF, 2012), pueda darnos la sensación de no estar en peligro, la continua problemática con diferentes enfermedades y plagas no sólo complica su desarrollo y reduce su productividad y calidad, tanto de madera como de fruto, sino que amenaza su permanencia. Primero fue la tinta, enfermedad que está presente fundamentalmente en el occidente de Asturias, y que actualmente parece controlable por acciones forestales concretas (Miranda-Fontaina *et al.*, 2007; Dinis *et al.*, 2011; Oßwald *et al.*, 2014). Posteriormente, el chancro que se extendió por toda Asturias, presentando un gradiente de incidencia aumentando del oriente al occidente asturiano (Valdezate *et al.*, 2001), y que actualmente se intenta controlar con una gestión forestal de claras y mediante lucha biológica con la inoculación de cepas hipovirulentas (Lee *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2016; Trapiello, 2017). Estas cepas han sido aisladas en distintas zonas de la comunidad autónoma permitiendo disponer de los grupos de compatibilidad más abundantes en la región de tal forma que la herramienta de lucha está desarrollada (Trapiello, 2017) y sólo faltaría conseguir agilizar el sistema de dispersión en campo y que sea económicamente viable para las características de nuestros castaños. Por si estos ataques fúngicos no fueran suficiente para poner a prueba la supervivencia del castaño, en los últimos años, la plaga de *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, conocida como avispa del castaño (Moriya *et al.*, 2003; Bernardo *et al.*, 2013; Cerasa & Massa, 2016), está aumentando su población exponencialmente, año a año, en los castaños asturianos tras su llegada en 2014 (Sanidad Vegetal, 2014) y contra la que la Administración del Principado de Asturias inició un programa de lucha biológica en el año 2017 con sueltas controladas del parasitoide *Torymus sinensis* Kamijo.

Nos centraremos en el chancro por ser uno de los factores más importantes en el riesgo de los castañares de Asturias, por estar *C. parasitica* incluida en la lista de las 100 especies exóticas invasoras más dañinas del mundo (Global Invasive Species Database, 2018) y por ser la causa de la práctica desaparición de algunas especies del género, como *C. dentata* (castaño americano) en EUA (Anagnostakis, 1987). En Asturias, esta enfermedad está muy extendida y con una elevada incidencia en algunas zonas (Valdezate *et al.*, 2001). A pesar de los numerosos recursos que se dedican a la investigación de los factores que influyen en el deterioro del castaño, a excepción del control biológico con la cepa hipovirulenta de *C. parasitica* (Robin & Heiniger, 2001), se han aplicado pocas medidas correctivas con implicaciones de gestión forestal (Zlatanov *et al.*, 2013). Los buenos resultados que podría aportar el control biológico del chancro y la creciente demanda de madera de castaño de alta calidad en los últimos años, vuelve a hacer interesante la gestión de los castañares (Cutini, 2001; Manetti *et al.*, 2010b). Actualmente, en Europa, la producción de madera de castaño de alto valor se intensificó por las buenas condiciones de crecimiento (Conedera *et al.*, 2004). Sin embargo, la producción de madera de alta calidad resulta difícil en el monte bajo de rotación corta tradicional, por lo que se debe reconsiderar el tipo de gestión forestal a realizar.

Las prácticas silvícolas tradicionales son muy diferentes según la zona. En el extremo de la no actuación tendríamos el rebrote natural y la gestión con rotaciones prolongadas de hasta 30-50 años (Amorini *et al.*, 2001; Manetti *et al.*, 2010a). En algunas zonas, como Grecia, encontraríamos el lado contrario, la gestión de los castañares comienza con una clara bien definida, a los 7 años se eliminan los brotes de los tocones no deseados (selección negativa), a los 14-15 años se dejan sólo los brotes de mejor calidad (selección positiva), y el período de rotación es 20-22 años, manteniendo 5-10 árboles por hectárea por un período de rotación adicional, para la producción de madera de gran tamaño (Papaioannou, 2013). En Asturias, desde la Administración se promueve una intervención intermedia basada en la gestión realizada en Francia (García, 2011). Esta gestión diferencia 2 tipos de actuaciones en función de la calidad de estación (CE) de los castañares y el posterior uso de su madera. Para castañares con peor CE, 3 ó 4 (ver apartado “3.2.1 Zonas de estudio: características y productividad” del Capítulo 3) y alturas dominantes menores de 9 m, se aconseja la corta a hecho a los 20 años, destinando esta madera para la producción de estacas o energía. Por el contrario, aquellos castañares con mejor CE, 1 ó 2 y alturas dominantes mayores de 9 m, se realiza una 1ª clara a los 8-12 años, con una densidad final de 600-800 pies ha⁻¹, siendo conveniente realizar una poda, podando sólo los árboles de porvenir (los que llegarán a la corta final) hasta una altura máxima de 4-6 m, para conseguir dos trozas rectas libres de nudos (no eliminando nunca más de la mitad de la copa viva). Si existe mercado para este tipo de madera, se valora la conveniencia de realizar una 2ª, e incluso una 3ª, clara. La 2ª clara se realiza a los 16-18 años, con una densidad final de 300-350 pies ha⁻¹. Y la 3ª clara a los 25 años, con una densidad final de 150-180 pies ha⁻¹. El turno de corta de esta madera de alta calidad varía entre 25-45 años, según el itinerario silvícola elegido (1, 2 o 3 claras).

Dependiendo del tipo de gestión forestal aplicada, la diversidad vegetal puede llegar a modificarse, siendo mayor en montes cultivados, ya que el abandono de los castaños genera una vegetación cerrada y homogénea con disminución de diversidad (Gondard *et al.*, 2007).

El castaño es una de las especies que rebrota de cepa, aspecto que se aprovecha para su utilización como monte bajo. La implicación de no realizar algún tipo de gestión lleva a que tras la corta a hecho se deja que las cepas rebroten y, actualmente en la mayoría del monte asturiano, no se interviene en la masa hasta que se alcance otra vez el turno, que para madera de buena calidad suele establecerse alrededor de los 40 años. La competencia natural entre brotes determinará cuales se convierten en árboles de porvenir y cuáles no. Esta competencia entre pies comienza a ser importante entre los 8-12 años. La eliminación de brotes y, por tanto, mayor aireado y mejor insolación de la masa revierte en una mejora sanitaria. Sin embargo, hay que tener muy en cuenta que cuando se interviene masas con presencia de chancro, la propia enfermedad limita las actuaciones a realizar, ya que, en ocasiones, las heridas producidas en la poda pueden convertirse en un punto de entrada para *C. parasitica*, que normalmente no es capaz de atravesar la corteza exterior si esta está intacta. Debido a la importante incidencia del chancro en el castañar elegido para este estudio, se decidió no realizar poda de ramas para evitar el contagio por *C. parasitica* en las heridas causadas al cortar las ramas. Los criterios de selección de los árboles de porvenir son, en general, y siempre que sea posible (no hay criterios inamovibles), estos:

- No dejar árboles con chancro, especialmente si es chancro alto (mayor facilidad de dispersión).
- Dejar los árboles más gruesos de cada cepa (salvo que tengan algún defecto importante).
- Dejar los árboles con buena forma (sobre todo en la primera parte del tronco): buena inserción en la cepa y poca ramosidad, o sea aquellos para los que la intervención no les suponga heridas importantes.

Amorini *et al.* (2001) valoró el efecto de un tratamiento silvícola en castaño basado en el establecimiento y mantenimiento de una base dominante formada por los mejores brotes de los castaños cortados, con crecimiento sostenido y regular, así como condiciones vegetativas óptimas, sobre la presencia de *C. parasitica*. Al eliminar los pies más afectados por el chancro con la clara, los castaños con una afección de chancro intermedia favorecían la cicatrización de estos. Por lo que una buena gestión forestal puede hacer que la enfermedad no sea letal para el castaño, pudiendo alcanzar un equilibrio ecológico hospedador-patógeno en el ecosistema forestal gestionado.

Además de la gestión forestal y el control biológico para reducir la incidencia del chancro, los compuestos fenólicos pueden ser también otra posibilidad para combatir esta enfermedad. *C. parasitica* no es un hongo descomponedor de la madera, no está involucrado en la degradación de la lignina, pero reacciona con la barrera tánica

natural del huésped (Chung *et al.*, 2008). Esta competencia entre *C. parasitica* y los taninos se observa en la resistencia que algunos castaños y robles muestran a este hongo (Speilman, 2003; Bolvanský *et al.*, 2014). Nienstaedt (1953) detectó diferentes grados de resistencia a *C. parasitica* en función del distinto contenido tánico que presentaron los extractos de corteza de 3 especies de *Castanea*, seleccionadas en función de su resistencia natural a este hongo, *C. dentata* (castaño americano) susceptible, *C. crenata* (castaño japonés) intermedia y *C. mollissima* (castaño chino) resistente.

Esta reactividad que los compuestos fenólicos parecen tener frente a *C. parasitica* es un ejemplo más del efecto antifúngico atribuido a estos compuestos (Philp *et al.*, 1995; Deflorio *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2008; Panjehkeh *et al.*, 2010). Los fenoles no sólo actúan frente a organismos huéspedes de la planta *in vivo*, sino que también tienen un papel importante frente a organismos degradadores de la madera (Peraza, 2001; Capuz, 2005; Schwarze *et al.*, 2012), por lo que la mayor durabilidad que estos compuestos aportan a la madera es de especial interés para la industria transformadora, siendo uno de los aspectos fundamentales y que le confiere valor añadido para diferentes usos. La durabilidad de la madera es debida a la presencia de compuestos químicos que dificultan la acción de los agentes degradadores (Peraza, 2001; Capuz, 2005). La presencia de taninos hidrolizables (TH) en la madera de castaño es uno de los factores que determina su durabilidad. La alta resistencia de la madera de castaño frente al ataque de hongos es debida, al igual que ocurre con la tolerancia a enfermedades, a la capacidad de los taninos de precipitar proteínas (Helm *et al.*, 1997) o de capturar metales que actuarían como cofactores (Mila *et al.*, 1996). A medida que se han ido conociendo estas influencias de los taninos en la madera, el análisis de este tipo de compuestos ha evolucionado continuamente.

El objetivo de este capítulo es determinar la influencia de la gestión forestal en las defensas de *C. sativa* frente al chancro (*C. parasitica*) mediada por el contenido fenólico de sus tejidos.

5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1 Ecosistema, composición fenólica y chancro

5.2.1.1 Zona de estudio

La zona seleccionada para valorar la influencia de la gestión forestal en las defensas de *C. sativa* fue el monte Canales, en el municipio de Riosa (zona central del Principado de Asturias). Este castañar de monte bajo está situado a una altitud de 546 m, con orientación N, pendiente del 39 % y fue cortado a hecho en 1998, por lo que se trata de una masa forestal juvenil, seleccionada para poder realizar una silvicultura efectiva y un seguimiento a largo plazo. Tras la corta a hecho, a los 12 años se inició la gestión forestal de una parte del monte, bajo la coordinación del personal especializado del Programa de Investigación Forestal SERIDA/CETEMAS, que consistió en una clara que redujo la densidad arbórea inicial de 4 250 pies ha⁻¹ a 880 pies ha⁻¹. Aunque en estas

gestiones forestales también se suelen realizar podas, en este caso se decidió no hacerlas debido a la abundante presencia de chancro en este castaño y evitar posibles contaminaciones por *C. parasitica* en las heridas que dejarían en los árboles las podas. Las zonas seleccionadas para este estudio fueron 2 parcelas contiguas, una gestionada y otra sin gestionar, separadas por una pista forestal. La ubicación de estas parcelas es, según coordenadas UTM, X: 266421.525; Y: 4788778.499; huso 30.

5.2.1.2 Valoración del Índice de Chancro en Campo (IChC)

La valoración de la incidencia del chancro se calculó en función del IChC, tal y como se explica en el apartado 3.2.8 del Capítulo 3. Esta valoración se realizó trascurridos los primeros 5 años, en 2 años consecutivos, 2016 y 2017.

5.2.1.3 Suelo

El análisis fisicoquímico de los suelos se realizó en el Laboratorio Kudam S. L. (Alicante, España). El muestreo se llevó a cabo en mayo de 2015. En cada una de las 2 parcelas de estudio se tomaron 8 muestras (en cruz, con 4 muestras por dirección), que se extrajeron con una barrena Edelman de 20 cm longitud y 5 cm de diámetro de perforación, para posteriormente mezclarlas y tener una muestra homogénea y representativa de cada parcela. En el extracto acuoso 1:2 (m/v) se analizó el pH, los iones Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , NO_3^- , SO_4^{2-} y la relación de adsorción de sodio (SAR, $\text{Na}^+ / ((\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}) / 2)^{1/2}$). Los cationes intercambiados fueron Na^+ , Mg^{2+} , K^+ y Ca^{2+} . Se estudió la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y se calculó el porcentaje de saturación de sodio (Sat Na, $(\text{Na}^+ \text{ intercambiado} / \text{CIC}) \times 100$). Los elementos asimilables que se cuantificaron fueron B, Na, Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Cu y Zn. También se determinó la textura, densidad aparente (ρ_{ap}), capacidad de retención de agua disponible (CRAD, considerando una profundidad media del suelo de 60 cm), materia orgánica (MO), carbono orgánico (C Org), nitrógeno total (N tot) y se calculó la relación C Org/N tot (C/N).

5.2.1.4 Estatus nutricional foliar

El análisis químico elemental foliar de los castaños de las parcelas objeto de estudio también se realizó en el Laboratorio Kudam S. L. (Alicante, España). El muestreo se llevó a cabo en julio de 2017. En cada una de las 2 parcelas de estudio se tomaron 10 hojas de la primera rama viva de cada uno de los 4 árboles muestreados por parcela. Una vez mezcladas las hojas recogidas en cada parcela, para tener una muestra homogénea y representativa, se enviaron 50 g a temperatura ambiente al laboratorio de análisis, donde una vez secada la muestra se analizaron los siguientes elementos químicos: N, P, K, Ca, Mg, Na, B, Mn, Fe, Zn, Cu y Mo.

5.2.1.5 Degradación de la hojarasca

Los diferentes ensayos y análisis realizados para valorar la degradación de la hojarasca se detallan en el apartado 4.2.2 del Capítulo 4.

La *pérdida de biomasa* se determinó tomando hojas de castaño recién caídas en noviembre de 2014 en las parcelas de estudio, dejándolas secar a temperatura ambiente durante una semana, y, una vez estabilizada la pérdida de humedad, se introdujeron aproximadamente 10 g de hojas completas en bolsas de fibra de vidrio de 20 x 20 cm, con malla de 1.8 x 1.6 mm. La duración estimada de este ensayo fue de 30 meses. Las bolsas con la hojarasca se repartieron por las parcelas atándolas a los árboles. Los muestreos se realizaron a los 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 y 30 meses. En cada muestreo se tomaron 3 bolsas, de cada una de las 2 parcelas de estudio, que se llevaron al laboratorio, para el secado de la hojarasca, primero a temperatura ambiente y luego en estufa durante 4 días a 70 °C, para, finalmente, obtener el peso seco (ps). La pérdida de biomasa de cada muestra se calculó como el porcentaje de biomasa perdida respecto a la masa inicial llevada a campo, estimada en base al promedio de la pérdida de humedad de tres muestras de cada parcela secadas en las mismas condiciones en el momento de llevarlas a campo. Las muestras secas se almacenaron en congelador a -80 °C hasta su molienda en molino criogénico para los análisis de fenoles totales (FT), cenizas y elemental.

Para el análisis de *FT*, su extracción se lleva a cabo como se describió en el apartado 4.2.1.3 del Capítulo 4.

Las cenizas se analizaron según la norma UNE-EN 14775:2010.

El *análisis elemental* (% m/m, de C, H y N) se realizó en las mismas muestras de hojarasca secadas y molidas para FT y cenizas.

5.2.1.6 Composición fenólica en ramas

5.2.1.6.1 *Material vegetal*

Las ramas se muestrearon en enero, mayo y julio de 2013 y 2014, tomando 2 trozos de ramas de aproximadamente 30 cm por árbol, de 5 árboles en cada una de las 2 parcelas de estudio. Las ramas se recogieron de la parte baja de la copa del árbol, que no fuesen rebrotes, con diámetros entre 2 y 3.5 cm, libres de heridas, nudos y otras alteraciones y se transportaron desde el monte hasta el laboratorio en nevera refrigerada con hielo, manteniéndolas a 4 °C hasta su descortezado y troceado al día siguiente. Las cortezas y maderas se almacenaron a -80 °C hasta su secado por liofilización y molienda en molino criogénico. Las muestras molidas se guardaron a -80 °C hasta realizar la extracción fenólica.

5.2.1.6.2 *Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos*

Los productos químicos empleados y las metodologías llevadas a cabo para la extracción de los compuestos fenólicos están descritos en el apartado 2.2 del Capítulo 2.

De cada tejido a analizar se realizaron 2 extracciones. La extracción de los compuestos fenólicos se basó en la metodología optimizada en el Capítulo 2 (Figura 2.1). Las muestras molidas (1 g_{ps} por muestra) se extrajeron con 100 mL de MeOH/H₂O (1:1, v/v) en agitación durante 24 h. Los extractos se filtraron, se eliminó el MeOH y se

llevó a un volumen de 50 mL con agua, separando posteriormente una alícuota de 3 mL, que se conservó a -20 °C para realizar la cuantificación de los FT mediante el ensayo Folin-Ciocalteu. El resto del extracto se sometió a 2 extracciones líquido-líquido consecutivas, con 20 mL de éter dietílico y 20 mL de acetato de etilo, extractos orgánicos llevados a sequedad y guardados a -20 °C hasta la cuantificación correspondiente. En el segundo extracto se cuantificaron los taninos condensados (TC) mediante el método de la vainillina. El extracto acuoso final se liofilizó y guardó a -80 °C hasta la cuantificación de los TH mediante HPLC tras metanólisis ácida para degradar estos compuestos a sus unidades básicas y diferenciarlos en galotaninos (Gts) y Ets.

5.2.1.7 Crecimiento *in vivo* de *Cryphonectria parasitica* en ramas *ex situ*

Ensayo realizado de forma análoga a como se describió en el apartado 3.2.9 del Capítulo 3. Las ramas usadas fueron las muestreadas en julio de 2014, de las cuales se tomaron 5 trozos de cada una de las 2 parcelas, inoculando con el hongo *C. parasitica* la madera, corteza o madera+corteza (rama descortezada con ambas partes en contacto, intentando simular el estado sin descortezar, con el inóculo entre ambos tejidos). A los 3 días de la inoculación se fotografiaron las ramas y se analizaron las imágenes para el cálculo de la superficie de crecimiento de *C. parasitica*.

5.2.2 **Efecto de la aplicación exógena de extractos fenólicos en el crecimiento de *Cryphonectria parasitica***

5.2.2.1 Obtención y caracterización de los extractos fenólicos

Los extractos fenólicos usados procedían de corteza (EFC) y madera (EFM) de *C. sativa*. Para su obtención se utilizaron 2.5 kg de corteza y 3 kg de serrín, que fueron triturados en un molino semi-industrial (Retsch, Biometra SM 100; Frankfurt, Alemania) con una malla inicial de 4 mm y una final de 1 mm. La extracción se llevó a cabo en recipientes plásticos autoclavables abiertos de 30 L, utilizando 25 L de agua destilada para extraer la corteza y 15 L para el serrín. Ambas extracciones se llevaron a cabo en dos ciclos de 20 min a 120°C en autoclave (RaypaSteamSterilizer, AES75, Linden, Alemania). Los extractos se filtraron por gravedad en tres pasos: malla de 1 mm, muselina de 0.5 mm y, finalmente, papel de filtro. Una vez filtrados se conservaron a 4 °C hasta su caracterización (3 muestras de cada extracto) por los siguientes parámetros:

-*pH*: medido a temperatura ambiente con pH-metro (CRISON GLP22, Barcelona, España).

- *Residuo sólido* (RS): 50 mL se liofilizaron (Telstar Technologies SL, LyoQuest -55, Tarrasa, España), y por diferencia de pesada se obtuvo el RS. El resultado final se expresa en mg RS mL⁻¹.

- *Índice de fenoles totales a 280 nm* (IFT₂₈₀) (Somers & Evans, 1977): medida de la densidad óptica (DO, absorbancia) de los extractos en microplaca de cuarzo de 96

pocillos en espectrofotómetro (BIOTEK Instruments, Synergy HT, Winooski, EUA). El IFT₂₈₀ se calculó multiplicando la DO medida por la dilución realizada.

- FT, TC y TH (*Gts* y *Ets*): análisis realizado según se describe en el apartado 5.2.1.6.2, con las siguientes diferencias por tratarse de muestras acuosas. Los FT se analizan directamente de los extractos diluidos con H₂O (1:50). Para los TC y TH, se parte de 10 mL y los fraccionamientos se realizan con 10 mL (x3), enrasando a 25 mL con H₂O la fase acuosa final.

5.2.2.2 Crecimiento *in vitro* de *Cryphonectria parasitica* en presencia de extractos fenólicos de corteza y madera de *Castanea sativa*

Se utilizó la cepa virulenta de *C. parasitica* LPPA-F-187, perteneciente al grupo de compatibilidad vegetativa EU-1 con idiomorfo MAT-I, cedida por la Dra. Gonzalez del Programa de Investigación en Patología Vegetal del SERIDA. Esta cepa se mantuvo repicándola en placa Petri de vidrio cada 3-4 semanas en medio de cultivo de malta (40 g de extracto de malta y 20 g de agar por L de agua destilada) a 22 °C, 70 % de humedad y en oscuridad.

El ensayo consistió en inocular *C. parasitica* en medios de cultivo con EFC o EFM a 3 concentraciones finales en base a los valores de FT (0.5, 50 y 5 000 mg EAG L⁻¹), preparando 4 placas (repeticiones) por tratamiento y otras 4 como control sin extracto. El medio de cultivo y los extractos fenólicos se autoclavaron y, a la menor temperatura a la que la mezcla permanece en estado líquido, se dosificó en placas Petri (en torno a 22 mL placa⁻¹). Una vez solidificados los medios, se inoculó el hongo y las placas se mantuvieron durante 4 días en las mismas condiciones en que se mantuvo el cultivo del hongo, descritas en el párrafo anterior. Trascurrido este tiempo, las placas se fotografiaron y, mediante el software ImageJ (v1.43u, Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA), se calculó la superficie de crecimiento de *C. parasitica*.

5.2.2.3 Aplicación de los extractos fenólicos a planta juvenil de *Castanea sativa*

La aplicación exógena de los extractos fenólicos (EFC y EFM) se realizó sobre planta juvenil de *C. sativa* en condiciones de invernadero. Los castaños utilizados fueron sembrados (procedencia semilla: ES-02 Mesetas interiores Galicia) en diciembre de 2012. Dos años después, las plantas se acondicionan en invernadero y al cabo de un mes se trasplantan a maceta de 1.8 L incorporando abono de liberación lenta y se dejan aclimatar durante 2 meses. Trascurrido este tiempo, se aplican los extractos fenólicos durante 4 meses. La aplicación de los extractos se realizó por pulverización (P, con adición de tensoactivo adherente, también adicionado a los blancos pulverizados con agua, Pa) o riego (R), con una concentración en base a FT de 5 mg EAG L⁻¹. Esta concentración se estableció a partir de los resultados obtenidos del ensayo *in vitro* realizado previamente. La P se realizó sobre las plantas hasta mojar todas las hojas. Las plantas R, con EFC (Rc) y EFM (Rm), al igual que las control, también se pulverizaron con agua + tensoactivo. El volumen de extracto aplicado por R fueron 10 mL, tanto de EFC (Rc) o EFM (Rm) como de H₂O para las plantas control y de P.

Inicialmente, se prepararon 345 plantas, de las cuales 132 se sometieron a tratamiento con extractos fenólicos por P (66 Pc y 66 Pm), 132 por R (66 Rc y 66 Rm) y 66 Pa. De estas plantas, tras los 4 meses de tratamiento, se toman 6 de cada tratamiento para el análisis fenólico en tronco (corteza y madera) y el ensayo de crecimiento de *C. parasitica* en ramas. Las 60 plantas restantes por tratamiento se dividen en 3 bloques (repeticiones).

5.2.2.4 Composición fenólica del tronco de *Castanea sativa* tras la aplicación de los extractos fenólicos

La zona media del tronco de las 6 plantas por tratamiento que se muestrearon tras la finalización de la aplicación del EFC y EFM se cortó, se separó la corteza de la madera y se trocearon ambos tejidos por separado. Todas las muestras troceadas se guardaron a -80 °C hasta su análisis fenólico. De cada tejido a analizar se realizaron 3 extracciones. La extracción de los compuestos fenólicos se basó en la metodología optimizada en el Capítulo 2 (Figura 2.1) y resumida en el apartado 5.2.1.6.2 de este capítulo, partiendo de 1 g de peso fresco (pf) por muestra.

5.2.2.5 Crecimiento *in vivo* de *Cryphonectria parasitica* en planta juvenil de *Castanea sativa* tratada con extractos fenólicos

Las 20 plantas por bloque que quedaron tras aplicar los extractos fenólicos y muestrear las 6 para el análisis fenólico, se separaron aleatoriamente en dos bloques que se ubicaron en dos invernaderos contiguos con exactamente las mismas condiciones ambientales, de riego y fertilización. En uno de los invernaderos se realizó la inoculación con el hongo y en el otro se realizó el tratamiento control inoculándolas con el medio de cultivo sin hongo, para reducir el riesgo de contaminación de las plantas control.

La inoculación de *C. parasitica*, y del medio de cultivo sin hongo, se realiza en el centro del tronco, tras haber retirado una pequeña superficie de la corteza (círculo de 0.5 cm de diámetro), y protegiendo posteriormente la herida con plástico de parafina (Parafilm, Bemis NA, Wisconsin, EUA). Un mes después de la inoculación se procede a valorar los efectos producidos midiendo el engrosamiento del tronco y la aparición de una mancha naranja indicadora del avance del crecimiento del hongo.

5.2.2.6 Crecimiento *in vivo* de *Cryphonectria parasitica* en ramas *ex situ*

Este ensayo se realizó de forma similar a como se hizo en ramas adultas de campo, descrito en el apartado 3.2.9 del Capítulo 3, con las siguientes diferencias. Las ramas usadas fueron tomadas de las 6 plantas muestreadas para el análisis fenólico del tronco. De cada una de estas plantas se cortó una rama y se descortezó, inoculando *C. parasitica* en la corteza y madera por separado. A los 3 días de la inoculación se fotografiaron las ramas y se analizaron las imágenes para el cálculo de la superficie de crecimiento de *C. parasitica*.

5.2.2.7 Evolución de *Castanea sativa* juvenil tras la inoculación de *Cryphonectria parasitica*

A las plantas juveniles de *C. sativa* tratadas con los extractos fenólicos de plantas adultas de la misma especie e inoculadas posteriormente con *C. parasitica* en el tronco en invernadero se les hizo un seguimiento durante 9 meses para ver su respuesta y evolución al chancro. Al mes de la inoculación se cuantificó la formación de brotes adventicios y cuando se dio por finalizado el ensayo, a los 9 meses, se contabilizó la mortandad del tallo principal.

5.2.3 **Aplicación de extractos fenólicos de *Castanea sativa* como tratamiento antifúngico protector de la madera**

Este ensayo se realizó de la misma forma que el descrito en el apartado 5.2.2.2, con la diferencia de que en vez de *C. parasitica*, se valoraron 4 hongos de pudrición de la madera (*Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, *Poria placenta* y *Trametes versicolor*).

5.3 **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

5.3.1 **Ecosistema, composición fenólica y chancro**

5.3.1.1 Zonas de estudio: características y productividad

El índice de sitio calculado (ecuación [3.1] del Capítulo 3) para este castañar fue de 16 m, lo que correspondería a una calidad de estación (CE) 2 (buena). La CE de la masa es adecuada y similar a la establecida en el Capítulo 3 para las parcelas de Allande (Tabla 3.1), a pesar de que la orientación no es favorable (N). La altitud está en el rango adecuado para la especie y la pendiente estaría en la media de las que se encuentran en Asturias.

La valoración a nivel de producción de la actuación no se ha podido realizar dado el corto periodo de tiempo transcurrido, 2 años desde el inicio de la gestión forestal (clara) hasta las primeras valoraciones llevadas a cabo (muestreo de ramas). Sin embargo, ya que dentro de los posibles efectos favorables de la gestión se encuentra la disminución de patologías como el chancro y esta zona está especialmente afectada por esta enfermedad, se evaluó la incidencia de la misma a través de datos visuales en las dos parcelas en estudio.

5.3.1.2 Índice de Chancro en Campo

En la **Figura 5.1** se muestra el IChC para las parcelas gestionada y control durante los años 2016 y 2017. Estos IChC obtenidos muestran la notable reducción de la incidencia del chancro en la parcela gestionada.

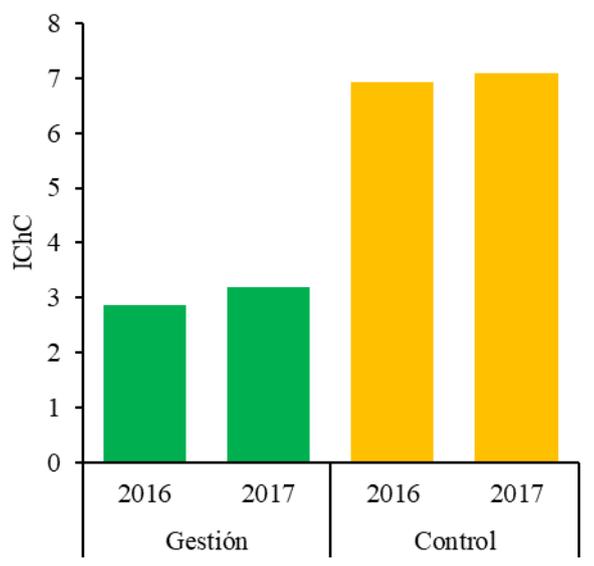


Figura 5.1. Índice de chancro en campo (IChC) en la parcela gestionada y la control en los años 2016 y 2017.

Esta notable diferencia de la incidencia del chancro entre ambas parcelas podría explicarse a través de la mejora en las condiciones ambientales que se generan tras la gestión de los castaños, así como a la disminución de la presencia de inóculo del hongo, ya que, aunque no se hayan eliminado todos los restos de la clara, su propagación desde el suelo será más limitada. No obstante, los cambios a nivel fisiológico inducidos por la gestión realizada también podrían ser responsables, ya que la actuación mejora varios aspectos relacionados con las defensas de los árboles, tales como la modificación del metabolismo secundario que condicionaría el nivel de taninos y cuya relación con la tolerancia evaluamos en este trabajo. El estado nutricional es uno de los parámetros que se modifican tras las intervenciones ya que por un lado se disminuye la competencia, pero por otro se alteran numerosos aspectos del ecosistema que condicionan el reciclado de los nutrientes, además de otros muchos aspectos.

5.3.1.3 Suelo

El análisis fisicoquímico realizado en los suelos de la parcela gestionada y la control (**Tabla 5.1** y **Figura 5.2**), permite considerarlos como no salinos, con una concentración de los iones más tóxicos (Na^+ y Cl^-) normal, lo que implica una sodicidad del suelo (saturación de Na) también normal. Ambos presentan unas características muy similares, lo que nos corrobora la posibilidad de utilizar las 2 parcelas en la

comparativa, al menos desde este punto de vista. No obstante, sorprenden los resultados obtenidos, ya que para una CE similar a la de Allande (Tablas 3.1 y 5.1) nos encontramos con unas características fisicoquímicas de suelo más similares a las de Caso (Tabla 3.6 y Fig. 3.5).

De los parámetros destacados, por marcar diferencia entre las parcelas de Caso y Allande, como son el pH, la CIC y el Ca^{2+} extraíble, en todos los casos se aprecia una gran similitud entre los datos obtenidos en Riosa (Tabla 5.1) y los reflejados por Caso (Tabla 3.6). El pH, destacado por su papel en la absorción de nutrientes, es igual de ácido en ambas localidades, Caso y Riosa. La CIC es incluso superior en Riosa, quizá debido a que la componente en arcilla también lo es (Figuras 5.2 y 3.5) y por tanto la textura franco-arcillosa está en el límite con arcillosa. Una orientación N, con poca pendiente y suelo rico en arcilla sigue siendo sorprendente para esta CE. Respecto al Ca^{2+} extraíble muestra también valores similares a los que encontramos en Caso, si bien el Ca^{2+} intercambiable y asimilable duplica en Riosa los valores que habíamos determinado en las parcelas de peor CE, que ya eran superiores a los de Allande. La MO en las 2 parcelas de Riosa, gestionada y control, es alta, según los límites establecidos por Afif-Khouri *et al.* (2011), en castañares asturianos (2.09 - 5.28 %), siendo ligeramente superior en la parcela gestionada lo cual probablemente se deba al impacto de los restos de la clara efectuada en 2010 ya que no se extraen totalmente de la parcela. En la valoración de la fertilidad del suelo también tiene gran importancia la relación C/N, que cuando se encuentra en torno a 10 se considera un suelo fértil (López, 2005). El suelo de la parcela gestionada presenta un valor para esta relación de 15.3, también algo superior al de la control (12.47), estando ambos valores cercanos al valor medio descrito por Afif-Khouri *et al.* (2011) para castañares asturianos (14.18) y superiores a los encontrados en Caso y Allande.

Al igual que se planteó en el Capítulo 3, en el siguiente apartado se valora la composición de los nutrientes presentes en las hojas, ya que, en general, el estado nutricional de una planta se refleja mejor a través del análisis de este órgano (Portela & Louzada, 2005).

Tabla 5.1. Análisis fisicoquímico del suelo de las parcelas gestionada y control de Riosa (n=1). ^a Concentración de protones expresada como pH del extracto acuoso en el que se han extraído y cuantificado el resto iones de este grupo. ^b SAR: Relación de adsorción de sodio. ^c CIC: Capacidad de intercambio catiónico. ^d Sat Na (%): Porcentaje de saturación de sodio. ^e MO: Materia orgánica. ^f C Org: Carbono orgánico. ^g N tot: Nitrógeno total. ^h C/N: Relación carbono/nitrógeno.

Parcela	Iones extraídos con H ₂ O 1:2 m/v (meq Kg ⁻¹)										Cationes intercambiables (meq Kg ⁻¹)					
	H ⁺ (pH) ^a	Na ⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	SAR ^b	HCO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Ca ²⁺	CIC ^c	Sat Na ^d (%)
Gestión	4.54	0.40	0.34	1.46	0.16	0.76	0.38	0.60	0.24	1.20	0.20	2.10	2.10	12.80	132.20	0.15
Control	4.63	0.20	0.28	1.34	0.14	0.62	0.21	0.80	0.18	1.20	0.20	1.60	1.80	9.50	121.60	0.16

Parcela	Elementos asimilables (mg Kg ⁻¹)										MO ^e (% m/m)	C Org ^f (% m/m)	N tot ^g (% m/m)	C/N ^h
	B	Na	Mg	P	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn				
Gestión	0.60	127.40	292.40	266.80	880.80	2715.00	1.86	190.26	0.28	1.88	5.54	3.21	0.21	15.30
Control	0.70	95.00	230.90	224.80	764.90	2031.50	1.52	155.60	0.30	2.24	4.73	2.74	0.22	12.47

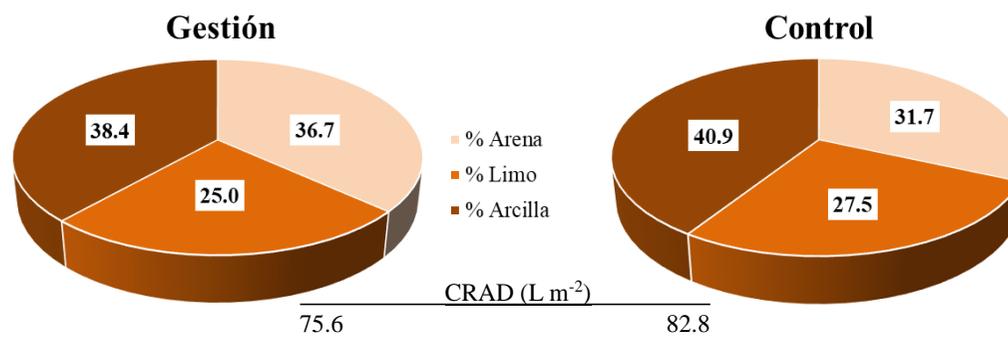


Figura 5.2. Capacidad de retención de agua disponible (CRAD) y porcentaje (% m/m) de las distintas texturas (granulometrías) del análisis fisicoquímico del suelo en las parcelas gestionada y control de Riosa (n=1).

5.3.1.4 Estatus nutricional foliar

En la **Tabla 5.2** se muestran los resultados obtenidos del análisis químico elemental foliar realizado en las hojas de los castaños de las parcelas gestionada y control. Los elementos que presentan una diferencia más marcada entre las dos parcelas son N, Ca, B y Zn, que muestran un mayor contenido en la parcela gestionada, y K y Cu, más abundantes en la control. Aunque como ya mencionamos en el capítulo III no siempre existe una relación directa entre la disponibilidad de un elemento en el suelo y la concentración en los tejidos de la planta, para el Ca, el mayor contenido en las hojas de los castaños de la parcela gestionada responde probablemente a la mayor presencia en el suelo de este elemento en todas las fracciones analizadas: asimilable, intercambiable y extraíble (Tabla 5.1). Por el contrario, para el N, B y Zn no cabría esperar un mayor contenido en los tejidos, ya que su presencia en el suelo es inferior y, por tanto, es razonable pensar que bien la gestión a que fueron sometidos estos árboles de forma directa, o bien por el aporte de la MO al suelo que supone, procedente de los restos de la clara, han influenciado la captación y acumulación de estos nutrientes, sin olvidar el papel que puedan tener otros parámetros ambientales diferenciales de las dos parcelas. Para el K ocurriría algo parecido a lo sucedido con estos últimos elementos, pero a la inversa, ya que el contenido en hoja es mayor donde está menos disponible y sin actuación sobre los árboles, de forma que con el mismo planteamiento se podría considerar que la gestión le afectó desfavorablemente. Ahora bien, este efecto quizá no sea directo sino por el antagonismo con el resto de los elementos que se ven favorecidos, ya que en los suelos de estas parcelas las relaciones K/Ca y K/Mg están muy por debajo de los límites adecuados, que deben fluctuar entre 2 y 10 y, por tanto, son muy desfavorables para una buena asimilación de K. Solo la relación K/Mg, en la fracción asimilable, entraría en el margen adecuado. En cuanto a la relación N/P en la hoja, que se recomienda esté en torno a 10 (Aerts & Chapin, 1999), observamos que en ambas parcelas está muy desplazada hacia el N (con valores de 21 y 15 para gestión y control, respectivamente), lo cual corrobora que desde el punto de vista nutricional estas parcelas estarían más próximas a las del municipio de Caso (ver Capítulo III). La concentración de P en la hoja, inferior a los datos publicados por otros autores [0.250-0.280 (Leonardi *et al.*, 1996), 0.24 (Santa Regina, 2000), 0.18 (Toprak & Seferoğlu, 2013) y 0.171 % (Portela *et al.*, 2015)], se podría considerar deficiente para esta especie según límite de 0.2 % establecido por Barceló *et al.* (1987) pero, sin embargo, no se apreciaría el efecto negativo en el desarrollo vegetal que se le supone, quizá porque los árboles aún son jóvenes. Para algunos elementos como el Mg, que ya estaba presente en menor proporción en las hojas de los árboles de las parcelas de Caso, con respecto a los de Allande (Tabla 3.7), siendo éste un elemento determinante para el castaño (Portela *et al.*, 2003, 2010), además de relacionarse con las defensas frente a hongos (Huber & Jone, 2013), llega a tomar en Riosa valores en el límite de la deficiencia (Tabla 5.2), rango de 0.2 a 0.6 % (Arrobas *et al.*, 2017, 2018). Por el contrario, en base al contenido foliar, la asimilación de B en Riosa, otro de los elementos trascendentales en el castaño (Arrobas *et al.*, 2017), parece verse favorecida, pues se encuentra en el rango definido para este elemento por los autores citados, de 20 a 100 mg kg⁻¹, y aún más favorable cuando la parcela estuvo sometida a gestión, no pudiendo achacarse este resultado al

contenido en el suelo ya que de haber diferencias, el contenido sería menor en la parte gestionada.

Tabla 5.2. Análisis químico elemental foliar de *Castanea sativa* en las parcelas gestionada y control de Riosa (n=1).

Parcela	% (m/m)						mg kg ⁻¹					
	N	P	K	Ca	Mg	Na	B	Mn	Fe	Zn	Cu	Mo
Gestión	2.74	0.13	0.93	0.55	0.25	0.01	36.0	960	119	48.8	7.02	<0.100
Control	2.24	0.15	1.25	0.42	0.21	0.02	25.3	892	129	33.2	11.0	<0.100

Estas hojas, con composición en minerales muy similar en ambas parcelas, aportan al suelo, tras la caída en otoño, unos nutrientes en proporción similar. No obstante, la liberación de estos podría ser diferente dado que las condiciones del mantillo pueden haber cambiado debido a la actuación realizada, que aportó por un lado una materia orgánica puntual, en forma de restos de la clara, pero además porque permitirá una mayor incidencia de la luz solar, con todo lo que ello implica.

5.3.1.5 Degradación de la hojarasca

5.3.1.5.1 Pérdida de biomasa

En la **Figura 5.3** se representa la pérdida de masa de la hojarasca, en base al peso seco, en los muestreos realizados durante 30 meses, no existiendo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las parcelas gestionada y control en todos los muestreos. El comportamiento que muestran ambas parcelas en cuanto a la degradación, pérdida de masa de la hojarasca, es similar al observado en las parcelas de Allande y Caso del Capítulo 4 (Figura 4.8) y en otros trabajos sobre esta especie (Raimundo *et al.*, 2008), pero con destino frutícola, donde se realiza un manejo agronómico del suelo, que no se da en nuestras parcelas forestales.

La degradación de la hojarasca está condicionada por factores climáticos (temperatura, precipitación y radiación solar) y la composición foliar, pero también por la actividad microbiana y pequeña fauna del suelo (Castellanos-Barliza & León, 2011). La similitud observada entre ambas parcelas respecto a la evolución de la hojarasca hace pensar a priori que las actividades desarrolladas en la parcela gestionada no modificaron de forma importante estos parámetros. No obstante ya que la propia composición de la hojarasca es uno de los factores que más influye en la degradación, siendo considerada como predictora de su descomposición (Martínez-Yrizar *et al.*, 2007; Carnevale & Lewis, 2009; García-Palacios *et al.*, 2013) analizamos la evolución fenólica como indicador, al igual que hicimos en las parcelas de Caso y Allande (Figura 4.9) donde parecía existir una relación inversa entre la actividad microbiana, que condiciona la degradación de la hojarasca, y de la propia degradación durante el primer año, frente al aporte fenólico de las hojas en el momento de la caída (ver Capítulo 4).

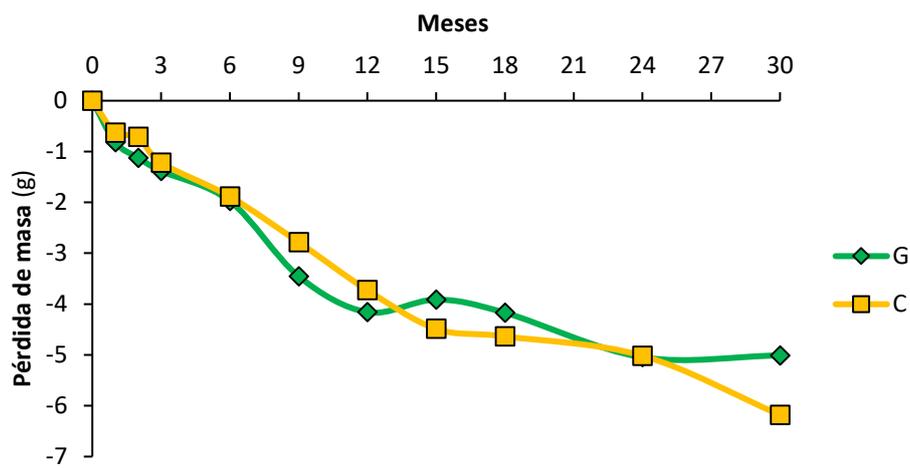


Figura 5.3. Pérdida de masa (media, n=3) de la hojarasca (secada a 70 °C) en los once muestreos realizados durante 30 meses en las parcelas de estudio, gestionada (G, verde) y control (C, naranja).

5.3.1.5.2 Fenoles totales

En la **Figura 5.4.A** se observa una reducción significativa en el contenido de FT de los tejidos desde el momento de la caída de la hoja hasta un año de permanencia de la hojarasca en el mantillo, al igual que vimos en las parcelas de Caso y Allande (Figura 4.9). La reducción drástica del contenido de FT se debe tanto a la lixiviación producida por la lluvia como a la degradación de estos compuestos. El contenido en FT es significativamente superior en la hojarasca de los árboles sometidos a gestión y aunque se produzca una reducción similar a lo largo del año de permanencia en el mantillo, al final del ensayo se mantienen las diferencias entre ambas parcelas. Que esta diferencia en el contenido en FT no induzca diferente degradación (**Figura 5.3**) parece indicar que la composición de la hoja, en lo que a FT del propio tejido se refiere, no influye de forma significativa en su degradación. No obstante, este resultado no resta importancia al papel que estos compuestos puedan llegar a tener (Lorenz et al., 2000) cuando se produce una acumulación en el mantillo fruto de la caída año tras año de tejidos con alto contenido en estos metabolitos, ya que hemos de tener en cuenta que en estas parcelas las diferencias en composición foliar debidas a la gestión, reflejadas en la composición inicial de la hojarasca (**Figura 5.4**) son muy recientes (4 años tras la actuación) y su influencia en la composición del suelo, en cuanto a MO o relación C/N, es limitada (Tabla 5.1).

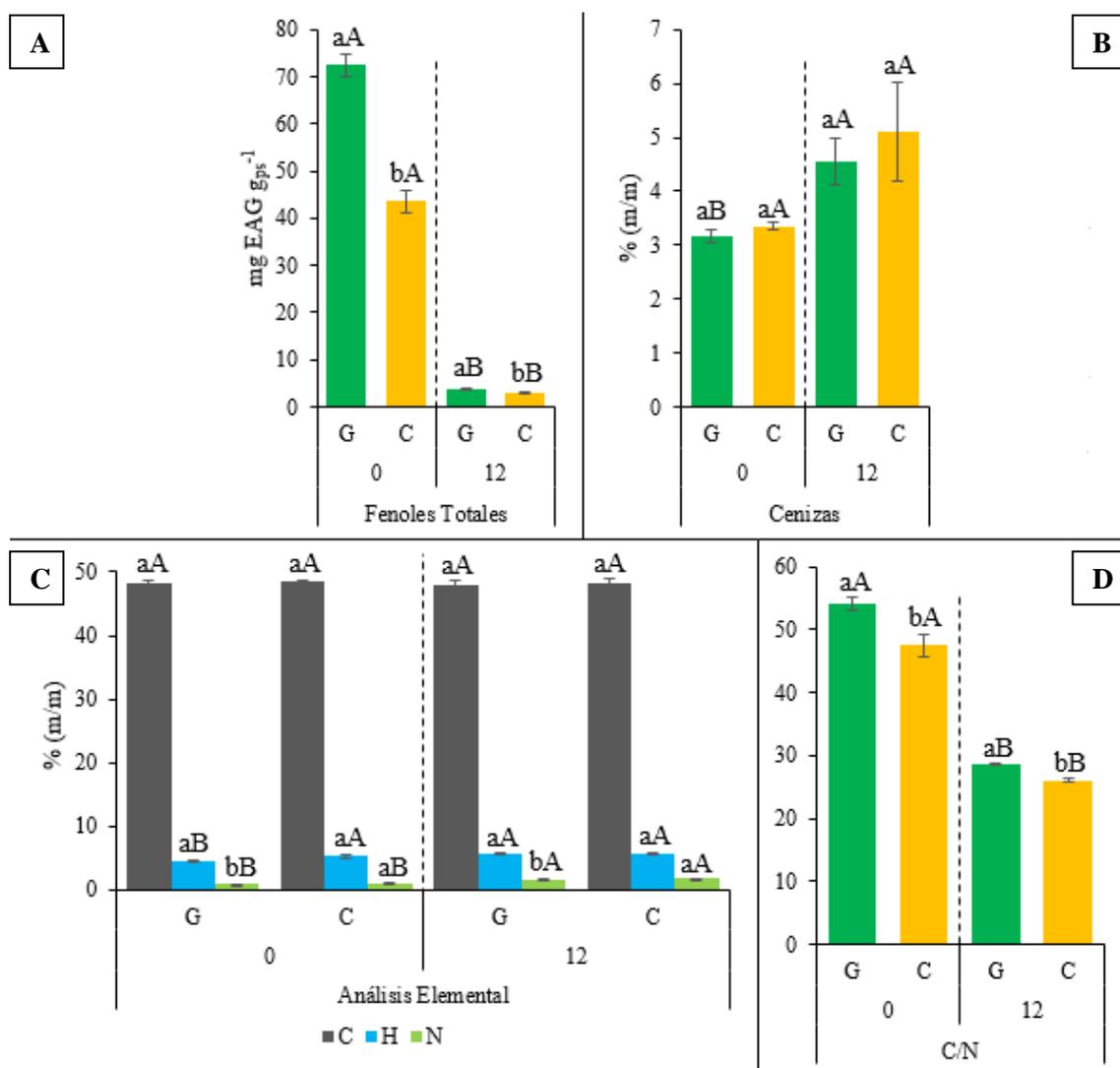


Figura 5.4. Análisis realizados a la hojarasca (secada a 70 °C) de *Castanea sativa* en las parcelas gestionada (G, en verde) y control (C, en naranja) en la caída de la hoja (0) y a los 12 meses. Fenoles Totales (A) expresados como mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco. Porcentaje de cenizas (B). Análisis Elemental (C) de: carbono (C, en negro), hidrógeno (H, en azul claro) y nitrógeno (N, en verde claro). C/N (D): Relación carbono/nitrógeno. En cada análisis, diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre zonas por muestreo, y diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre muestreos por zona. ANOVA, $p \leq 0.05$, modelo lineal general univariado, $n=9$ para Fenoles Totales, y $n=3$ para el resto de los análisis.

5.3.1.5.3 Cenizas

La **Figura 5.4.B** muestra el porcentaje de cenizas en la hojarasca, que se incrementa en ambas parcelas desde el momento de la caída de la hoja hasta un año después de permanencia en el mantillo, aunque sólo resulte significativo en la parcela gestionada debido a la variación observada en el último muestreo en la parcela control. El incremento de este parámetro a lo largo del tiempo como indicador de la degradación de la materia orgánica, nos confirma que el proceso ocurre de forma similar en las dos parcelas, ya que además las diferencias en este parámetro no fueron significativas, ni en el momento inicial, ni al cabo de un año. Esta ausencia de

diferencias, junto con la igualdad de comportamiento en la pérdida de peso de la hojarasca (**Figura 5.3**), viene a confirmar la ausencia de efecto directo de la distinta composición fenólica interna de los tejidos en la degradación de la hojarasca.

5.3.1.5.4 *Análisis elemental*

Los resultados obtenidos para el análisis elemental de la hojarasca (% m/m, de C, H y N, con el cociente C/N) se muestran en la **Figura 5.4.C y D**. El elemento mayoritario (C) apenas varía, ni de un muestreo a otro, ni de una a otra parcela. El H no se diferencia entre parcelas, aunque aumenta significativamente en el año en la parcela gestionada. Y el N, también se incrementa de forma significativa al año, en ambas parcelas, y muestra diferencias entre parcelas, con mayores valores en la control. Dada la estabilidad del C y la evolución en el N, la relación también diferirá pero, lógicamente, en sentido contrario a este último.

El contenido en N obtenido en el análisis foliar *in vivo* de las hojas muestreadas en julio (**Tabla 5.2**) mostró un mayor valor de este elemento en las hojas de los castaños de la parcela gestionada. Contenido en N, que no sólo disminuye en el momento de la caída de la hoja, sino que invierte las diferencias observadas *in vivo*, debido a que en las hojas de la parcela gestionada la reducción de este elemento fue de un 67 % y en las de la control de un 54 %. Esto supone, por un lado, una mayor translocación del N desde las hojas hacia otros tejidos del árbol durante el periodo de senescencia foliar en los castaños de la parcela gestionada, pero por otro lado, el mayor contenido en N en la hojarasca de la parcela control refleja una situación más favorable de este material vegetal en relación con el ciclo del N, ya que este elemento sería suministrado al mantillo en mayor cantidad, lo que supone un suelo más rico en el elemento, con una relación C/N más baja. El análisis fisicoquímico del suelo (**Tabla 5.1**) muestra un valor de N total ligeramente superior en la parcela control, así como una menor relación C/N.

5.3.1.6 Composición fenólica en ramas

En la **Tabla 5.3** se muestra la significación encontrada para cada factor en estudio (tejido, gestión, año y mes de muestreo) y sus interacciones en cada análisis fenólico (FT, TC y TH: Gts y Ets). En cuanto a los tejidos analizados, destacar las diferencias significativas obtenidas en todos los análisis realizados, presentando siempre la corteza mayores valores que la madera. El efecto de la gestión sólo se ve reflejado en los TC (gestión > control). El año de muestreo influye significativamente en todos los análisis fenólicos, pero de forma distinta. En los FT y Ets 2013 > 2014, y para los TC y Gts 2014 > 2013. Dentro del año, el mes de muestreo presenta diferencias significativas para los FT, Gts y Ets, destacando el mes de julio en todos los casos y con una graduación para FT y Ets (julio > enero > mayo) y cambiando en los dos últimos meses para Gts (julio > mayo > enero). Esta diferente variabilidad intra e interanual podría deberse a distintas condiciones climáticas en estos años o por las diferentes interacciones con otros organismos, como la notable incidencia del hongo patógeno *C. parasitica* en estas parcelas. En cuanto a las interacciones, estas son significativas en la mayor parte de los casos y especialmente cuando una de las variables analizadas es

temporal, lo que se relacionaría con el efecto variable del ambiente. La variable gestión es la que muestra una menor interacción, aunque en algunos casos llega a ser significativa, indicando que la actuación realizada pudo tener en general un efecto en el perfil fenólico.

En la **Figura 5.5** se representan los valores medios obtenidos para los FT, TC, Gts y Ets en la corteza y madera de las ramas de *C. sativa*. Lo más destacable es el diferente contenido en los dos tejidos analizados, corteza y madera, que alcanza valores de hasta 60 veces más en la corteza, para los TC, o 10 veces más para los Ets y, como mínimo, es de 3 veces para los FT. Este diferente contenido ya se apreciaba en los análisis realizados en las ramas provenientes de las parcelas con diferente CE (Figura 4.5). No se observan diferencias claras en los análisis fenólicos entre las parcelas gestionada y control. Comparando muestreo a muestreo, los TC suelen mostrar valores más altos en la parcela gestionada. Estas mínimas diferencias pueden ser debidas a la variabilidad existente tanto intra como interanualmente.

Tabla 5.3. Significación (valor de p) de los factores/interacciones en los análisis fenólicos realizados. Nivel de significación de 0.05. ANOVA según modelo lineal general univariado, n=6 para Fenoles Totales (FT) y Taninos Condensados (TC), y n=2-4 para Taninos Hidrolizables: Galotaninos (Gts) y Elagitaninos (Ets). gl: grados de libertad.

Factor	Análisis Fenólico	gl	p	Interacción	Análisis Fenólico	gl	p	
Tejido (Corteza > Madera)	FT	1	.000	Tejido * Gestión	FT	1	.017	
	TC	1	.000		TC	1	.000	
	Gts	1	.000		Gts	1	.365	
	Ets	1	.000		Ets	1	.869	
Gestión (Gestión > Control)	FT	1	.161	Tejido * Año	FT	1	.000	
	TC	1	.000		TC	1	.000	
	Gts	1	.315		Gts	1	.000	
	Ets	1	.619		Ets	1	.002	
Año (2013 > 2014)	FT	1	.000	Tejido * Mes	FT	2	.000	
	TC	1	.000		TC	2	.989	
	Gts	1	.000	Gts	2	.000		
	Ets	1	.001	Ets	2	.008		
	(2014 > 2013)	FT	1	.918	Gestión * Año	FT	1	.918
		TC	1	.000		TC	1	.000
Gts		1	.035	Gts		1	.035	
Ets		1	.079	Ets		1	.079	
Mes (Julio > Enero > Mayo)	FT	2	.032	Gestión * Mes	FT	2	.032	
	TC	2	.061		TC	2	.061	
	Gts	2	.055		Gts	2	.055	
	Ets	2	.001		Ets	2	.001	
(Julio > Mayo > Enero)	FT	2	.000	Año * Mes	FT	2	.000	
	TC	2	.063		TC	2	.063	
	Gts	2	.000		Gts	2	.000	
	Ets	2	.000		Ets	2	.000	
(Julio > Enero > Mayo)	FT	1	.041	Tejido * Gestión * Año	FT	1	.041	
	TC	1	.000		TC	1	.000	
	Gts	1	.045		Gts	1	.045	
	Ets	1	.112		Ets	1	.112	
	FT	2	.116	Tejido * Gestión * Mes	FT	2	.116	
	TC	2	.060		TC	2	.060	
	Gts	2	.054		Gts	2	.054	
	Ets	2	.001		Ets	2	.001	
	FT	2	.000	Tejido * Año * Mes	FT	2	.000	
	TC	2	.046		TC	2	.046	
	Gts	2	.000		Gts	2	.000	
	Ets	2	.000		Ets	2	.000	
	FT	2	.000	Gestión * Año * Mes	FT	2	.000	
	TC	2	.000		TC	2	.000	
	Gts	2	.282		Gts	2	.282	
	Ets	2	.136		Ets	2	.136	
	FT	2	.468	Tejido * Gestión * Año * Mes	FT	2	.468	
	TC	2	.000		TC	2	.000	
	Gts	2	.474		Gts	2	.474	
	Ets	2	.358		Ets	2	.358	

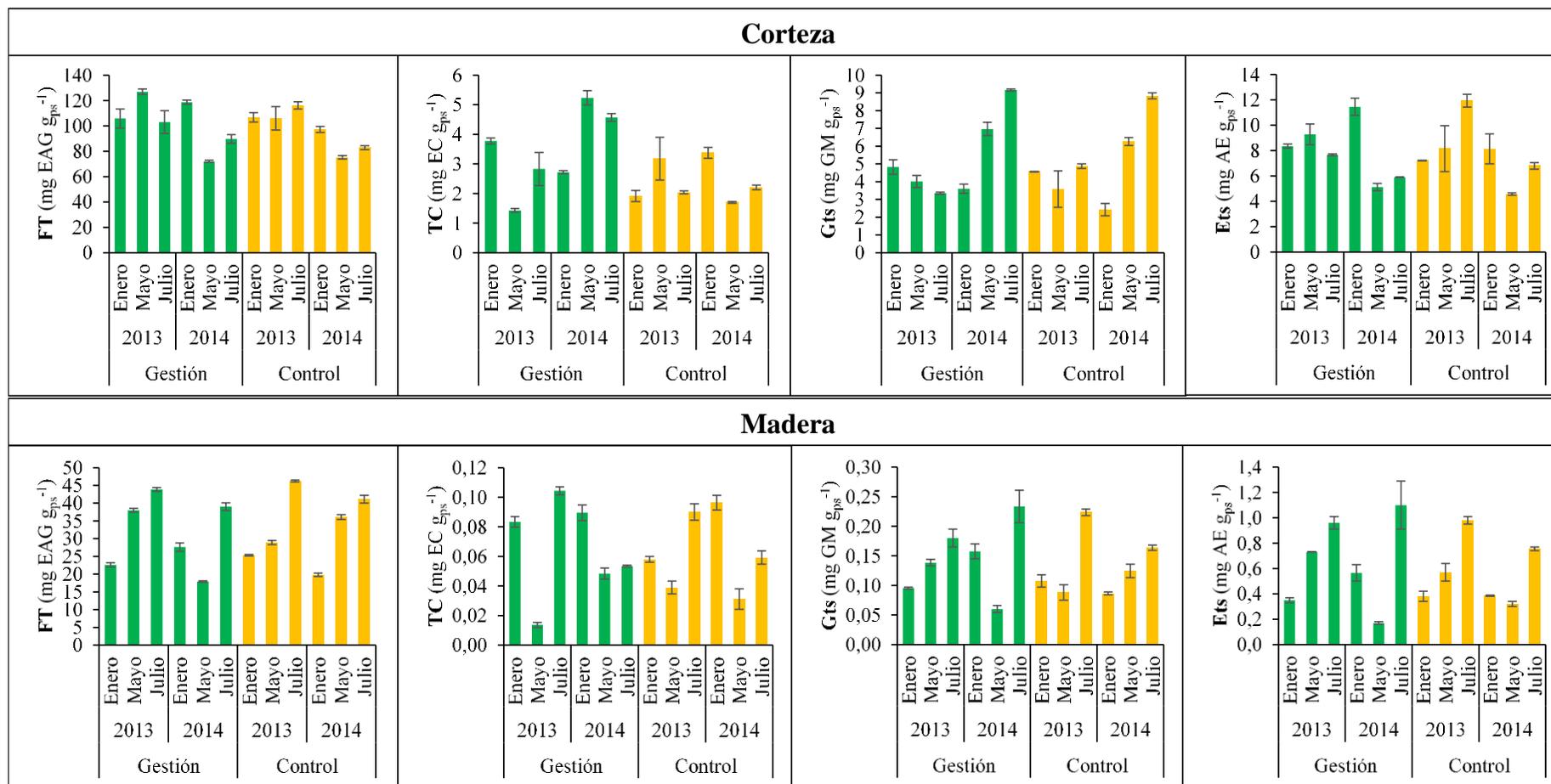


Figura 5.5. Valores medios del contenido de Fenoles Totales (FT, mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco), Taninos Condensados (TC, mg equivalentes de (+)-catequina/g de peso seco) y Taninos Hidrolizables: Galotaninos (Gts, mg de galato de metilo/g de peso seco) y Elagitaninos (Ets, mg de ácido elágico/g de peso seco) en la corteza y madera de las ramas de *Castanea sativa* en las parcelas gestionada y control en los años (2013 y 2014) y meses (enero, mayo y julio) muestreados. Las barras verticales sobre las columnas representan el EE (n=6 para FT y TC, y n=2-4 para Gts y Ets).

A excepción de los TC, que muestran bastante variación en los dos años de estudio, para el resto de los compuestos la dinámica es bastante similar y lo es aún más en la madera, resultado que parece lógico si tenemos en cuenta que la corteza es el tejido que está expuesto al exterior y por tanto se verá afectado en mayor medida por las variaciones que se estén produciendo entre los años.

La variación dentro del año, fundamentalmente en madera, muestra un incremento de enero a julio. En corteza esta tendencia sólo se observa en Gts en 2014 para ambas parcelas.

En los trabajos realizados por Rodríguez & Colinas (1999) se selecciona como fecha más adecuada para la realización de bioensayos frente a *C. parasitica* el mes de julio por observarse una mayor reactividad de las ramas. Este hecho se achaca al posible incremento en el metabolismo de los fenoles, aspecto que se corroboraría a partir de estos resultados. Que este efecto se vea fundamentalmente reflejado en la madera parece lógico, ya que en la corteza la posible interferencia con otros procesos a los que se está viendo sometido el árbol puede estar enmascarándolo.

Por lo que respecta al efecto de la gestión, no parece que ésta haya actuado en la dinámica de forma significativa, ya que el perfil obtenido es muy similar en ambas parcelas, no obstante, se realiza bioensayo en relación al crecimiento de *C. parasitica* a partir de las ramas recolectadas en julio de 2014, cuyo perfil fenólico se destaca en la **Figura 5.6**, donde se resumen los datos correspondientes a esta fecha concreta, con y sin gestión. En la figura podemos ver que solamente los TC en las cortezas muestran un contenido diferencial en base a la actuación realizada. Que las diferencias encontradas sean debidas o no a la actuación es difícil de establecer, pero lo que es descartable es que sean debidas a la presencia de la enfermedad, cuya incidencia baja con la gestión. Los fenoles actúan como protectores vegetales frente a ciertos patógenos como el hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands (Dinis *et al.*, 2011; Oßwald *et al.*, 2014), causante de la tinta. Su implicación directa en respuesta al chancro, principal patología en la parcela, no ha sido demostrada fehacientemente, aunque se supone por la formación de la barrera de células que acumulan fenoles (Beckman, 2000).

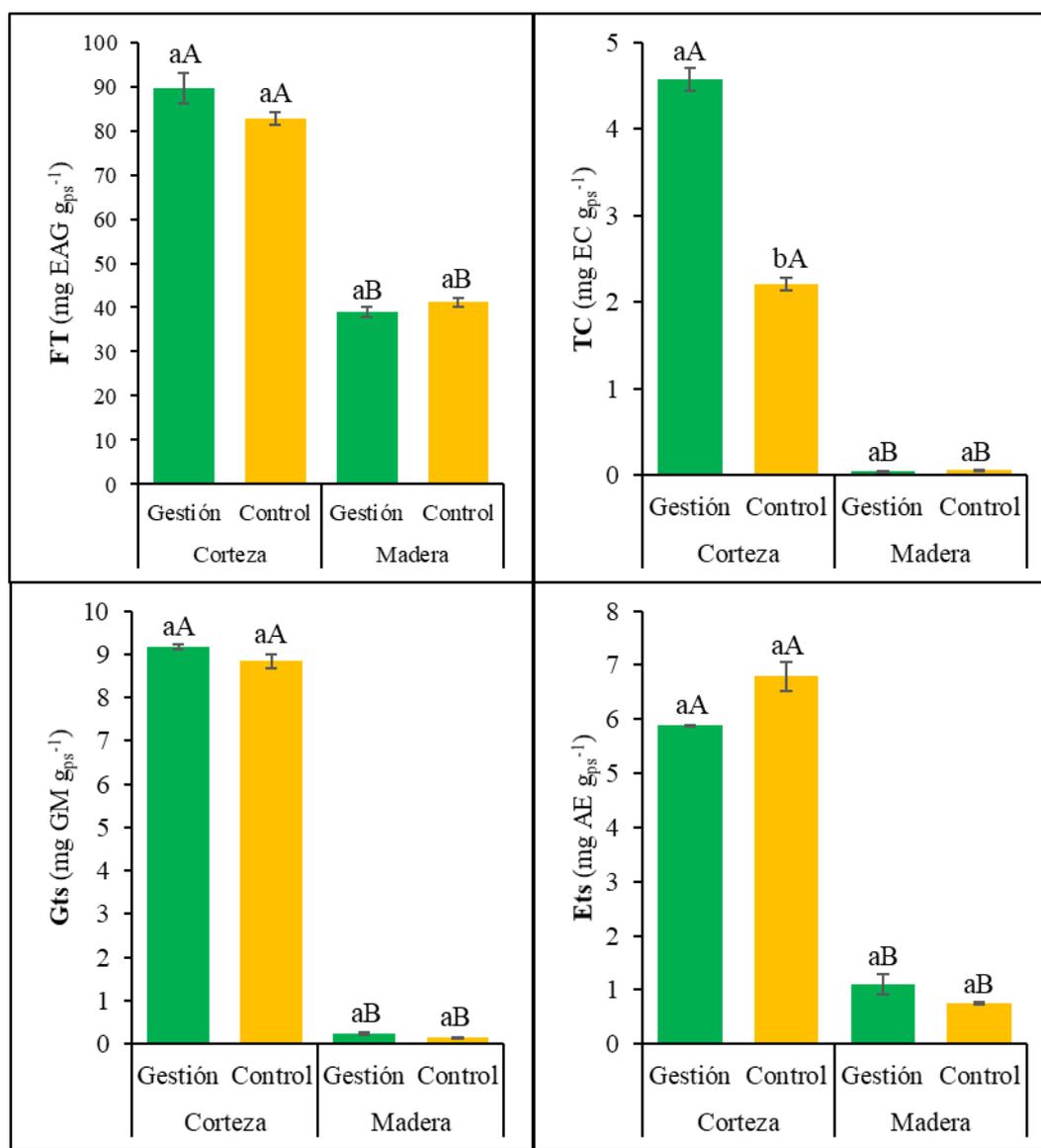


Figura 5.6. Valores medios del contenido de Fenoles Totales (FT, mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco), Taninos Condensados (TC, mg equivalentes de (+)-catequina/g de peso seco) y Taninos Hidrolizables: Galotanninos (Gts, mg de galato de metilo/g de peso seco) y Elagitaninos (Ets, mg de ácido elágico/g de peso seco) en la corteza y madera de las ramas de *Castanea sativa* en las parcelas gestionada y control del muestreo de julio del 2014. Las barras verticales sobre las columnas representan el EE. Las diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre parcela gestionada y control, y las distintas letras mayúsculas muestran las diferencias significativas entre distintos tejidos. ANOVA, comparación de medias, $p \leq 0.05$, $n=6$ para FT y TC, y $n=2-4$ para Gts y Ets.

5.3.1.7 Crecimiento *in vivo* de *Cryphonectria parasitica* en ramas *ex situ*

El crecimiento en superficie de *C. parasitica* en la corteza y madera de ramas adultas de castaños de las parcelas gestionada y control se muestra en la **Figura 5.7**. La inoculación de *C. parasitica* sobre la corteza y madera se realizó tanto en los tejidos por separado como conjuntamente (corteza+madera, con el inóculo entre ambos tejidos).

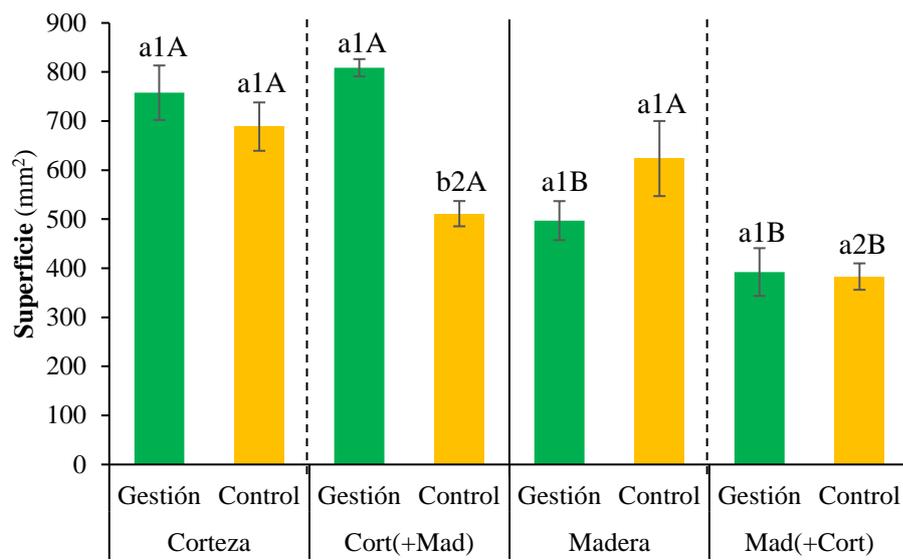


Figura 5.7. Crecimiento medio en superficie (mm^2) de *Cryphonectria parasitica* sobre la corteza (Cort) y madera (Mad) de las ramas de los castaños de las parcelas gestionada y control, con los tejidos separados y en contacto. Las diferencias significativas se muestran con diferentes letras o números. Letras minúsculas entre parcelas, números entre un mismo tejido de forma separada o conjunta y letras mayúsculas entre distintos tejidos separados o conjuntamente. ANOVA, *post hoc* DMS, $p \leq 0.05$, $n=5$ para corteza y madera por separado, y $n=10$ para corteza+madera. Las barras verticales sobre las columnas representan el EE.

La ausencia de diferencias, e incluso el hecho de que en algunos casos la presencia de la rama completa procedente de la parcela de gestión pueda suponer un incremento en el desarrollo del hongo, nos indica que la gestión no ha modificado la tolerancia a la enfermedad y que por tanto el efecto en la incidencia del chancro (**Figura 5.1**), se debe principalmente a una actuación curativa, por eliminación de zona afectada y del inóculo, y no preventiva en el periodo de tiempo analizado.

Otro resultado interesante de este bioensayo es el mayor crecimiento de *C. parasitica* en la corteza y en los tejidos ensayados de forma separada. En general, el mayor crecimiento de este hongo se podría relacionar con el mayor contenido fenólico, y más concretamente, a la vista de los resultados obtenidos, con el mayor contenido en TC. Si este contenido fenólico no es una respuesta debida a la infección por *C.*

parasitica, sino por otras situaciones del entorno de la planta, los compuestos fenólicos presentes tendrán una función diferente a la publicada por Beckman (2000), que destaca que frente a infecciones fúngicas los compuestos fenólicos son liberados, oxidados y polimerizados, uniéndose a otras moléculas como proteínas o carbohidratos de la pared celular, formando estructuras lignificadas de protección o componentes tóxicos para los patógenos. Por el contrario, nuestro ensayo parece indicar que algunos compuestos, como los TC, podrían incluso servir de sustrato para el crecimiento del hongo, ya que este se ve favorecido en aquellos tejidos que presentan un mayor contenido en esta familia de compuestos. A través del ensayo de gestión, el incremento significativo de estos fenoles solo se produce en corteza (**Figura 5.6**) y por tanto su efecto lo vemos sólo en este tejido (**Figura 5.7**). Para corroborar la posible relación entre ambos factores se realizaron ensayos con aplicación de extractos fenólicos al cultivo de hongo *in vitro* y al cultivo de castaño en condiciones controladas, así como un ensayo *ex situ* sobre ramas de los árboles tratados.

5.3.2 Efecto de la aplicación exógena de extractos fenólicos en el crecimiento de *Cryphonectria parasitica*

En este apartado se valorar el efecto de distintos tratamientos con extractos fenólicos de *C. sativa*, EFC y EFM, en el crecimiento *in vitro* de *C. parasitica* y en la infección de esta especie por el citado hongo. Para ello, al medio de cultivo del hongo se añadieron los extractos fenólicos y las plantas juveniles de castaño en invernadero fueron tratadas mediante pulverización o riego con ambos extractos, antes de la inoculación *in situ* en el tronco y *ex situ* en las ramas con este hongo. Previo a la realización del ensayo, se cuantificó el nivel de fenoles que aportaba cada uno de los extractos a través de diferentes análisis y se analizaron también las familias de compuestos ya mencionadas, de forma que dispusiésemos de un valor estándar, como parámetro para normalizar las aplicaciones de estos compuestos, y de los valores en concentración de las distintas familias, como parámetros comparativos a efectos de valorar su potencial efecto.

5.3.2.1 Caracterización de los extractos fenólicos

En la **Tabla 5.4** se muestra la caracterización de los extractos fenólicos, EFC y EFM, utilizados en los tratamientos aplicados a los castaños juveniles en el invernadero. Como era de esperar, las diferencias son significativas en la mayoría de los parámetros analizados, a excepción de los Ets, y presentando valores superiores el EFC, destacando la gran diferencia existente en los TC. Este mayor contenido fenólico en el EFC concuerda con el perfil fenólico obtenido para la corteza y madera del tronco de *C. sativa* (Tabla 3.8) y ramas (**Figura 5.5**).

Los índices más habituales para estandarizar las aplicaciones exógenas de estos compuestos son RS, IFT₂₈₀ y FT, que diferencian ambos extractos en la misma dirección (EFC > EFM) y en proporción similar (56 %, 54 % y 73 %, respectivamente),

siendo los FT cuantificados mediante el ensayo Folin-Ciocalteu los más discriminantes, por lo que es la opción elegida para establecer los tratamientos, que se fijaron en dosis de 5 mg EAG mL⁻¹, en base a los ensayos realizados *in vitro* que se describen a continuación.

Tabla 5.4. Caracterización de los extractos fenólicos de corteza (EFC) y madera (EFM) de *Castanea sativa*. RS: Residuo Sólido. IFT₂₈₀: Índice de Fenoles Totales medido a 280 nm. FT: Fenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco). TC: Taninos Condensados (mg equivalentes de (+)-catequina/g de peso seco). Gts: Galotaninos (mg de galato de metilo/g de peso seco). Ets: Elagitaninos (mg de ácido elágico/g de peso seco). * Diferencias significativas entre extractos (ANOVA, comparación de medias, p<0.05, n=3).

Extracto	pH	RS (mg mL ⁻¹)	IFT ₂₈₀	FT (mg EAG mL ⁻¹)	TC (mg EC mL ⁻¹)	Gts (mg GM mL ⁻¹)	Ets (mg AE mL ⁻¹)
EFC	3.64* ±0.02	17.66* ±0.34	322* ±4.4	12.06* ±0.32	0.1988* ±0.0096	0.218* ±0.013	0.411 ±0.0086
EFM	3.42* ±0.13	9.94* ±0.0088	175* ±24	8.87* ±0.10	0.0031* ±0.00011	0.079* ±0.0026	0.391 ±0.018

5.3.2.2 Crecimiento *in vitro* de *Cryphonectria parasitica* en presencia de extractos fenólicos de corteza y madera de *Castanea sativa*

En la **Figura 5.8** se muestra el crecimiento *in vitro* de *C. parasitica* en medios de cultivo enriquecidos con EFC y EFM de *C. sativa* a distintas concentraciones calculadas en base a la cuantificación de FT mediante el ensayo Folin-Ciocalteu. Todos los medios de cultivo con EFC o EFM mostraron un menor crecimiento significativo de *C. parasitica* con respecto al control, sin extracto fenólico, lo que indica un efecto inhibitorio de estos extractos en el crecimiento de este hongo. Destacar de forma especial la gran diferencia que el EFC a 0.5 mg EAG L⁻¹ presenta tanto respecto al control como al resto de medios de cultivo, lo que confiere a este medio un importante efecto antifúngico frente a *C. parasitica*.

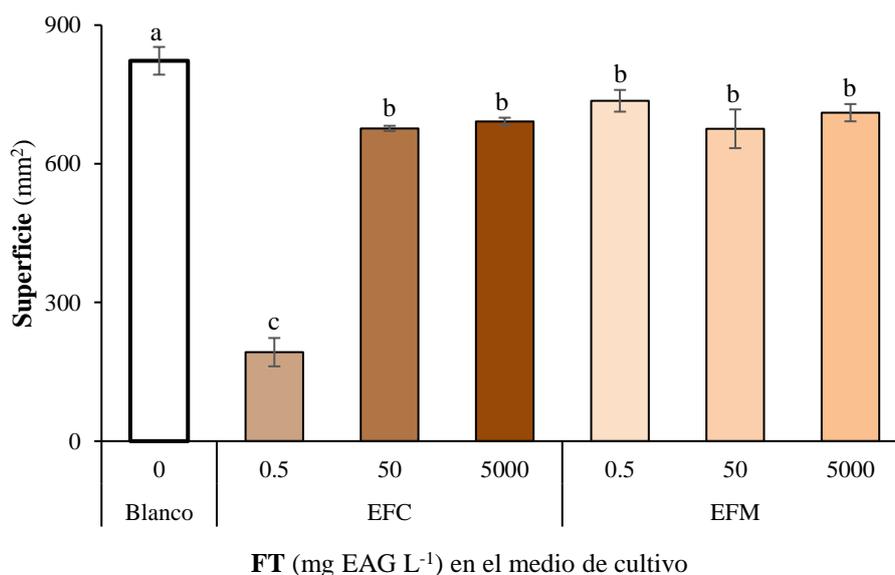


Figura 5.8. Crecimiento medio *in vitro* en superficie (mm²) de *Cryphonectria parasitica* al 4º día de su inoculación en medios de cultivo con extractos fenólicos de corteza (EFC) y madera (EFM) de *Castanea sativa*. FT: Fenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/L). Las diferencias significativas entre medios de cultivo se muestran con diferentes letras. ANOVA, *post hoc* DMS, p ≤ 0.05, n = 4. Las barras verticales sobre las columnas representan el EE.

El mayor efecto inhibitor se consigue con EFC a una dosis de 0.5 mg EAG L⁻¹, sin embargo para EFM la inhibición conseguida con esta concentración es la menor de las ensayadas, por ello, tratando de uniformizar las dosis de forma que no llegásemos a perder la mejora en EFC, mejorando la de EFM, se optó por la situación intermedia de 5 mg EAG L⁻¹ para los ensayos *in vivo*, teniendo en cuenta, además, que en la aplicación exógena la cantidad de principio activo que llega a los tejidos es menor que la que se consigue en placa donde el contacto es continuo.

La aplicación de extracto fenólico puede tener un efecto directo sobre el crecimiento del hongo que vemos *in vitro* (**Figura 5.8**) pero su efecto *in vivo* va a depender, entre otros factores, de que se consiga modificar el perfil fenólico de los tejidos del árbol, ya que la accesibilidad directa al hongo en condiciones naturales va a ser limitada dado que este se desarrolla de forma interna. En este sentido se realizó el análisis del contenido fenólico en la corteza y madera de la planta tratada con EFC, EFM y control.

5.3.2.3 Composición fenólica del tronco de *Castanea sativa* tras la aplicación de los extractos fenólicos

En la **Figura 5.9** se muestran los resultados de los análisis fenólicos (FT, TC, Gts y Ets) realizados a la corteza y madera del tronco de las plantas juveniles de *C. sativa* tratadas en invernadero con EFC y EFM por pulverización o riego a la dosis de 5 mg EAG mL⁻¹. El tratamiento control, además de la fertirrigación realizada a todas las plantas por igual y el tensoactivo humectante, solo contenía agua (Pa), y es el tratamiento referencia para comparar la variación fenólica producida en el resto de las plantas con los tratamientos aplicados. Resulta llamativo que el incremento en FT se produjo en el tejido contrario al extracto aplicado. Esta fracción aumenta significativamente en la corteza de los castaños tratados por pulverización y riego con EFM (Pm y Rm, **Figura 5.9**) y, por el contrario, en la madera las diferencias fueron significativas para el incremento de los FT de aquellos castaños tratados con EFC, tanto por pulverización como por riego, si bien también se observó una reducción significativa de esta fracción en la madera tras la aplicación de EFM, tanto por vía radical como en pulverización. En cuanto a los TC, se observan reducciones significativas en la corteza para los tratamientos con extracto del mismo tejido, Pc y Rc, y en la madera para todos los tratamientos a excepción de Rc. Tanto en Gts como Ets no muestran diferencias significativas en ningún caso.

Que el incremento en FT no se refleje en el contenido en TC y TH (Gts y Ets), podría estar indicando la modificación de la fracción de fenoles simples de bajo peso molecular que se separa en el fraccionamiento y no se analiza en este trabajo, pero cuya significación fisiológica está claramente establecida (Ockels *et al.*, 2007). El que el EFC incremente los FT en la madera, y que el EFM haga lo mismo en la corteza, puede ser debido a que ambos tejidos complementen su composición fenólica con fenoles presentes en los extractos del tejido complementario bien por absorción o asimilación

directa o a través de la activación de mecanismos fisiológicos capaces de producir estos compuestos.

Si los resultados en los FT son llamativos, los obtenidos para los TC no lo son menos, ya que este tipo de compuestos se reducen significativamente en el mismo tejido del extracto fenólico aplicado. Así, los TC disminuyen en corteza y madera tras la aplicación del EFC y EFM, respectivamente, tanto por pulverización como por riego. Esta reducción podría deberse a una respuesta de la planta por mantener la cantidad de este tipo de compuestos, activando mecanismos de transformación, degradación, de TC.

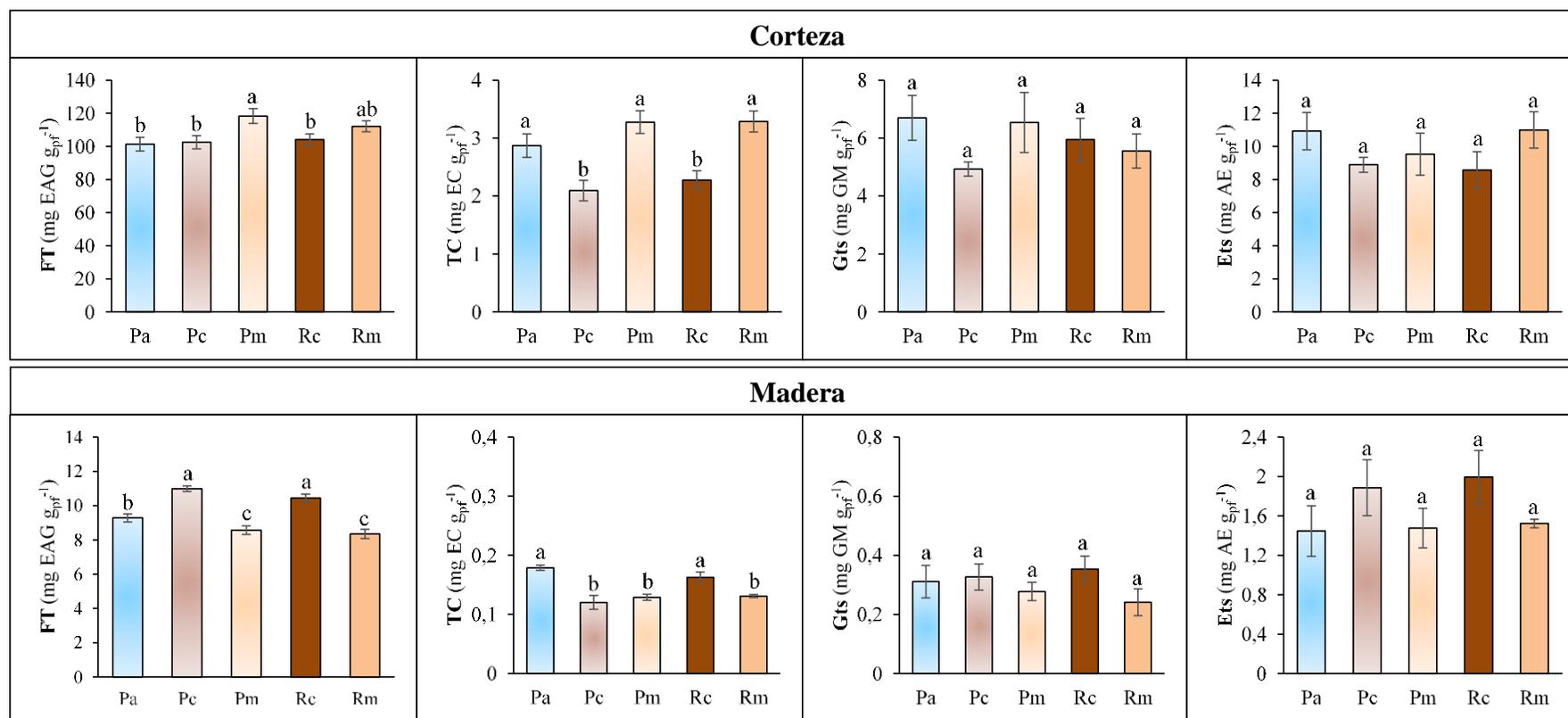


Figura 5.9. Valores medios del contenido de Fenoles Totales (FT, mg equivalentes de ácido gálico/g de peso fresco), Taninos Condensados (TC, mg equivalentes de (+)-catequina/g de peso fresco) y Taninos Hidrolizables: Galotaninos (Gts, mg de galato de metilo/g de peso fresco) y Elagitaninos (Ets, mg de ácido elágico/g de peso fresco) en la corteza y madera del tronco de *Castanea sativa* juvenil en invernadero para los tratamientos con extractos fenólicos de corteza (EFC) y madera (EFM) de *Castanea sativa*. Pa: pulverización con agua (tratamiento control). Pc: pulverización con EFC. Pm: pulverización con EFM. Rc: riego con EFC. Rm: riego con EFM. Las diferencias significativas entre tratamientos se muestran con diferentes letras. ANOVA, *post hoc* DMS, $p \leq 0.05$, $n = 9$ para FT y TC, y $n = 3$ para Gts y Ets. Las barras verticales sobre las columnas representan el EE.

5.3.2.4 Inoculación *in vivo* de *Cryphonectria parasitica* en tronco *in situ*

La inoculación de *C. parasitica* en el tronco de los castaños juveniles tratados con el EFC o EFM mostró dos síntomas claramente visibles sobre las plantas, un notable engrosamiento del tronco en la zona de la inoculación y una coloración marrón oscuro elipsoidal a lo largo del tronco, también entorno a esta zona (**Figura 5.10**).

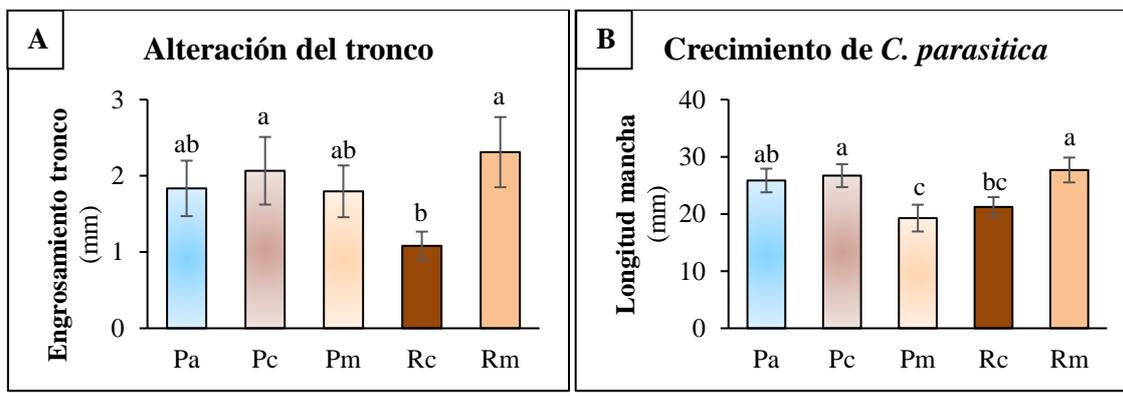


Figura 5.10. Engrosamiento medio del tronco (A) y longitud de la mancha producida por el crecimiento de *Cryphonectria parasitica* (B) en *Castanea sativa* juvenil tratada con extractos fenólicos de corteza (EFC) y madera (EFM) de la misma especie y en la planta control sin tratamiento, tras la inoculación de *Cryphonectria parasitica*. Pa: pulverización con agua (tratamiento control). Pc: pulverización con EFC. Pm: pulverización con EFM. Rc: riego con EFC. Rm: riego con EFM. Las diferencias significativas entre tratamientos se muestran con diferentes letras. ANOVA, *post hoc* DMS, $p \leq 0.05$, $n=22-26$. Las barras verticales sobre las columnas representan el EE.

Los castaños empleados como control para cada tratamiento, es decir, aquellas plantas tratadas con los extractos fenólicos, además de los controles propiamente dichos tratados con agua, que fueron inoculados con el medio de cultivo de *C. parasitica*, sin presencia del hongo, no mostraron cambios en el tronco, engrosamientos y estrechamientos, y tampoco desarrollaron la mancha característica del crecimiento de *C. parasitica*, por lo que dichas alteraciones se confirman como síntomas de la actividad frente al hongo.

El engrosamiento originado en el tronco por encima de la zona inoculada se produce por el anillamiento (estrechamiento) en el lugar de aplicación del hongo, lo que causa un estrangulamiento parcial a la planta, permitiendo el flujo xilemático, pero impidiendo el del floema y se observa de forma generalizada en todas las plantas independientemente del tratamiento al que fueron sometidas previamente. Ninguno de los tratamientos con los extractos fenólicos mostró diferencias significativas con respecto al control tratado con agua.

Respecto a la longitud de la mancha formada en la expansión de *C. parasitica* sobre la corteza del tronco, el único tratamiento que presentó diferencias significativas respecto a Pa fue Pm, indicando que este tratamiento reduce el desarrollo del hongo. El

mayor contenido en FT lo muestra la corteza del tronco tratada mediante Pm, cuyo tratamiento también muestra el menor contenido en FT en la madera del tronco. (**Figura 5.9**), al igual que para TC, aunque no siempre de forma significativa con respecto a Pa, y con tendencia similar, pero no significativa, para TH. Sin embargo, no se podría asociar este perfil a la respuesta observada, dado que se consigue con otros tratamientos, como puede ser Rm, sin que se pueda apreciar el efecto sobre el crecimiento del hongo e incluso podría considerarse opuesto (**Figura 5.10**).

5.3.2.5 Crecimiento *in vivo* de *Cryphonectria parasitica* en ramas *ex situ*

Los resultados del crecimiento del hongo sobre los tejidos de las ramas *ex situ* muestran que en la corteza (**Figura 5.11**) todos los pretratamientos indujeron un mayor desarrollo del hongo con respecto al tratamiento control, Pa. Por el contrario, sobre la madera no se observaron efectos significativos en ningún caso. Dado que los tratamientos efectuados dieron lugar a perfiles fenólicos diferentes que no mostraron un reflejo en la respuesta del hongo, ni *in situ* o *ex situ*, no es posible corroborar el presumible efecto favorable de los TC en el crecimiento del chancro deducido del ensayo *ex situ* de las ramas de parcelas gestionadas, ni tampoco se puede constatar el efecto inhibitor que se deduce de los ensayos *in vitro* del hongo con aplicación de extractos fenólicos.

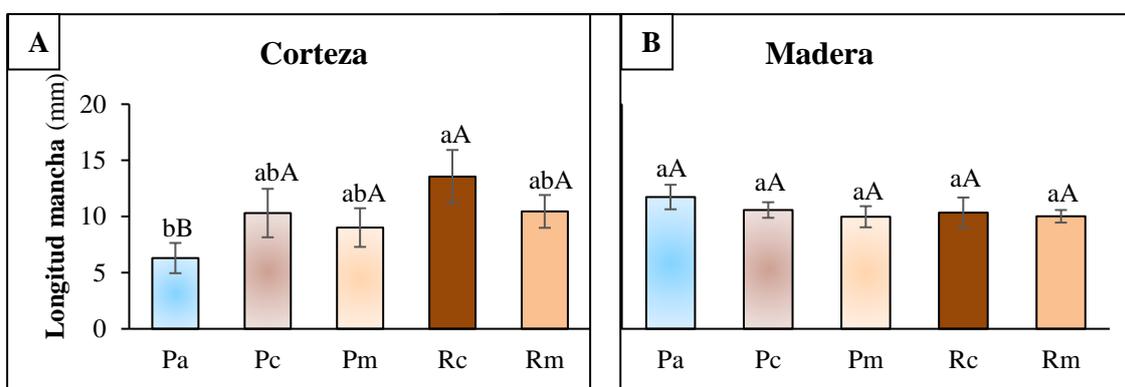


Figura 5.11. Longitud media (mm) de la mancha producida por el crecimiento de *Cryphonectria parasitica* en la corteza (A) y madera (B) de las ramas de *Castanea sativa* juvenil de las plantas tratadas con los extractos fenólicos de corteza (EFC) y madera (EFM) de *Castanea sativa*. Pa: pulverización con agua (tratamiento control). Pc: pulverización con EFC. Pm: pulverización con EFM. Rc: riego con EFC. Rm: riego con EFM. Las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tejido se muestran con diferentes letras minúsculas, y entre tejidos para un mismo tratamiento con mayúsculas. ANOVA, *post hoc* DMS, $p \leq 0.05$, $n = 6$. Las barras verticales sobre las columnas representan el EE.

5.3.2.6 Evolución de *Castanea sativa* juvenil tras la inoculación de *Cryphonectria parasitica*

A las plantas juveniles de castaño tratadas con los extractos fenólicos de *C. sativa* adulta e inoculadas posteriormente con *C. parasitica* en el tronco en invernadero se les hizo un seguimiento durante 9 meses para ver su respuesta y evolución al chancro. Al mes de la inoculación se cuantificó la formación de brotes adventicios. Este tipo de brotes se desarrollan ocasionalmente en el tallo principalmente por efecto de alguna situación de estrés en la planta, como en este caso es la inoculación de *C. parasitica* o en menor medida por la herida realizada para colocar el inóculo. En la **Figura 5.12** se representa el incremento del porcentaje de plantas que presentaron estos brotes, respecto a las inoculadas con el medio de cultivo (sin hongo), y que indica una clara relación entre la infección por el hongo y el desarrollo de brotes adventicios, tal y como describe González (2009). Destaca el elevado porcentaje de plantas control (Pa), ausencia de fenoles en el tratamiento, que han generado este tipo de brotes. Situación que también se observa en las plantas tratadas con los extractos fenólicos, pero en bastante menor medida, mostrando un efecto claro en el desarrollo de brotes adventicios. Este resultado nos sugiere que *C. parasitica* es menos efectivo en las plantas tratadas, ya que los brotes se generan en respuesta a la afección del sistema vascular, y, por tanto, se podría decir que todos estos tratamientos muestran un efecto positivo en las defensas de los árboles, aunque, quizá, con una intensidad no suficiente como para poder ponerlas de manifiesto a corto plazo en ensayos que favorezcan fundamentalmente el desarrollo del hongo.

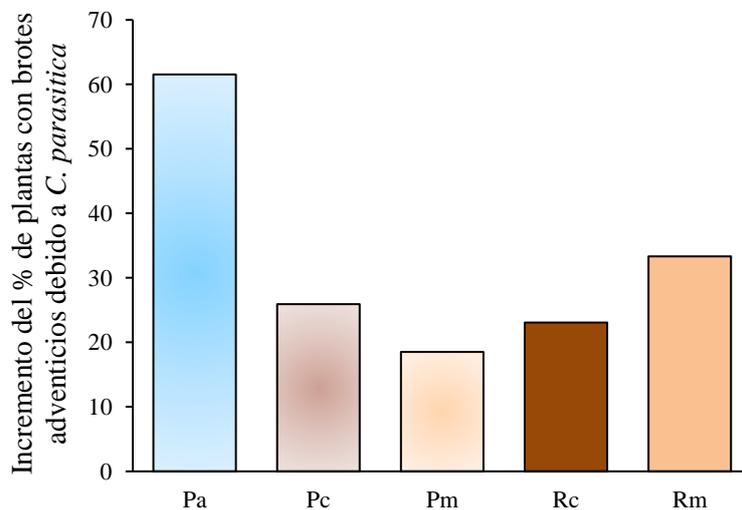


Figura 5.12. Incremento del porcentaje de plantas tratadas con los extractos fenólicos de corteza (EFC) y madera (EFM) de *Castanea sativa* que desarrollaron brotes adventicios tras 1 mes de la inoculación de *Cryphonectria parasitica* en el tronco de *Castanea sativa* juvenil en invernadero respecto a las inoculadas sólo con medio de cultivo (sin hongo). Pa: pulverización con agua (tratamiento control). Pc: pulverización con EFC. Pm: pulverización con EFM. Rc: riego con EFC. Rm: riego con EFM.

A los 9 meses de la inoculación el porcentaje de mortandad del tallo principal de las plantas fue cercano al 100 % en todas las inoculadas con *C. parasitica* (**Figura 5.13**), alcanzando este porcentaje para el tratamiento control, Pa, y manteniendo la graduación observada en la formación de los brotes adventicios, destacando los tratamientos con EFC en cuanto a reducción del porcentaje de mortandad del tallo principal (16.7 % menos de mortandad). Las plantas control para cada tratamiento, inoculadas sólo con el medio de cultivo del hongo, mostraron un 0 % de mortandad del tallo principal descartando por tanto que el efecto se deba a la herida y constatando un efecto del anillamiento del tallo por parte del hongo.

Los resultados obtenidos, aunque limitados quizá por la forma tan agresiva de hacer el ensayo, son halagüeños en tanto en cuanto se consigue que la planta juvenil, muy sensible a esta enfermedad, consiga un cierto porcentaje de mejora solo con la aplicación de un extracto crudo de madera o corteza. No obstante, se necesitaría profundizar en los distintos componentes que incluyen estos extractos, ya que es posible que la no eficiencia a corto plazo tan solo se deba al hecho de que en la solución se incluyan componentes que estimulen el desarrollo del hongo, factor que también explicaría el efecto dosis dependiente de los ensayos *in vitro*.

En conclusión, se podría decir que el extracto fenólico obtenido a partir de la corteza de castaño tiene un efecto positivo en la respuesta al chancro a largo plazo, si bien su efecto no lo hemos podido adscribir directamente a una modificación concreta del perfil fenólico de los tejidos, y su alcance es limitado, de forma que no es posible ponerlo de manifiesto a través de las valoraciones a corto plazo, ya que la reducción de síntomas no llega a ser significativa. En cuanto al tratamiento, analizando todos los datos en conjunto, las diferencias más favorables serían para Rc. El ensayo *in vitro* sería el que permitiría arrojar más luz en el potencial inhibidor de este extracto, si bien, como vemos en la **Figura 5.8**, se trata de un efecto dosis dependiente, lo que justificaría el efecto contrario observado para los TC tras la gestión, ya que son el principal componente diferencial de estos tejidos. Además, este efecto diferencial según concentración, presumiblemente, conducirá a que su aplicación sobre el desarrollo de otros hongos no pueda derivarse directamente de los datos obtenidos del cultivo *in vitro* de *C. parasitica*.

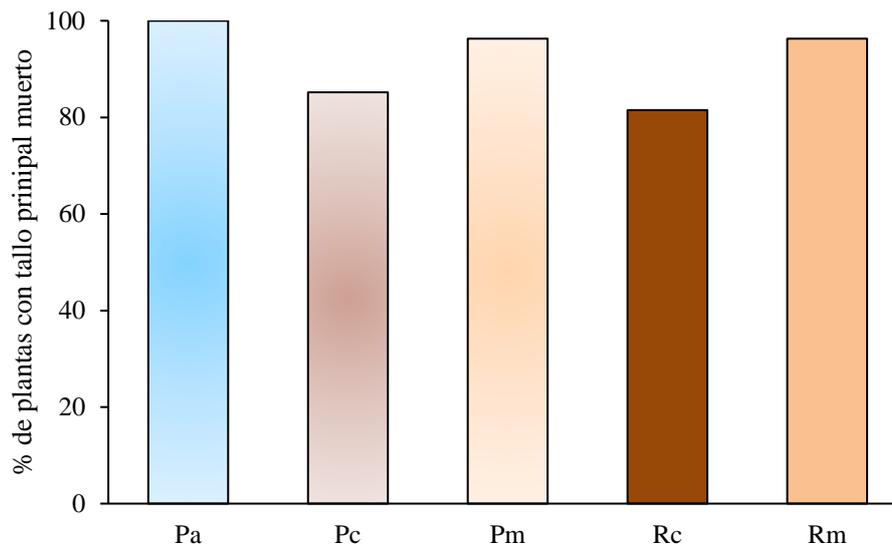


Figura 5.13. Porcentaje de plantas tratadas con los extractos fenólicos de corteza (EFC) y madera (EFM) de *Castanea sativa* cuyo tallo principal se murió tras 9 mes de la inoculación de *Cryphonectria parasitica* en el tronco de *Castanea sativa* juvenil en invernadero. Pa: pulverización con agua (tratamiento control). Pc: pulverización con EFC. Pm: pulverización con EFM. Rc: riego con EFC. Rm: riego con EFM.

indust nivel
bre 4
hongos de pudrición de interés para la industria, dos de ellos ya evaluados en el Capítulo 3 en cuanto a su crecimiento sobre madera de castaño.

5.3.3 Aplicación de extractos fenólicos de *Castanea sativa* como tratamiento antifúngico protector de la madera

En los apartados anteriores se trató de ver la relación entre el contenido fenólico de *C. sativa* y la incidencia de *C. parasitica* de forma natural en campo, o mediante la inoculación en invernadero o en laboratorio. Además, se valoró *in vitro* el potencial como inhibidor del crecimiento de *C. parasitica* de los extractos fenólicos obtenidos de corteza y madera de castaño. En este apartado se muestra el potencial antifúngico *in vitro* de estos extractos frente a hongos de pudrición de la madera (*Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, *Poria placenta* y *Trametes versicolor*).

En la **Figura 5.14** se muestra el crecimiento *in vitro* de estos 4 hongos en medios de cultivo enriquecidos con EFC y EFM de *C. sativa* a distintas concentraciones en base al índice de FT. Estos resultados, junto con los obtenidos para *C. parasitica* (**Figura 5.8**), muestran la gran variabilidad existente en las respuestas fúngicas. A excepción de *C. puteana*, único hongo para el que ninguno de los tratamientos utilizados fue eficaz, mostrando incluso incrementos significativos con los medios de cultivo con EFC a 50 y 5000 mg EAG L⁻¹ y EFM a 0.5 y 5000 mg EAG L⁻¹. El resto de los hongos presentan crecimientos significativamente menores con alguno/s de los extractos fenólicos empleados, destacando la respuesta obtenida en *P. placenta* y *T. versicolor*, y, en menor medida, en *G. trabeum* con EFC a 0.5 mg EAG L⁻¹, semejante a la observada en *C. parasitica* para ese mismo tratamiento (**Figuras 5.14** y **5.8**). Con el

EFC a 5 000 mg EAG L⁻¹ también se consiguieron buenos resultados, siendo el segundo extracto con el que se obtiene una mayor inhibición del crecimiento de los hongos *G. trabeum*, *P. placenta* y *T. versicolor*. Por último, el EFM a 5000 mg EAG L⁻¹ sería otro extracto a tener en cuenta, obteniendo el menor crecimiento para *G. trabeum* y buenos resultados para *P. placenta* y *T. versicolor*.

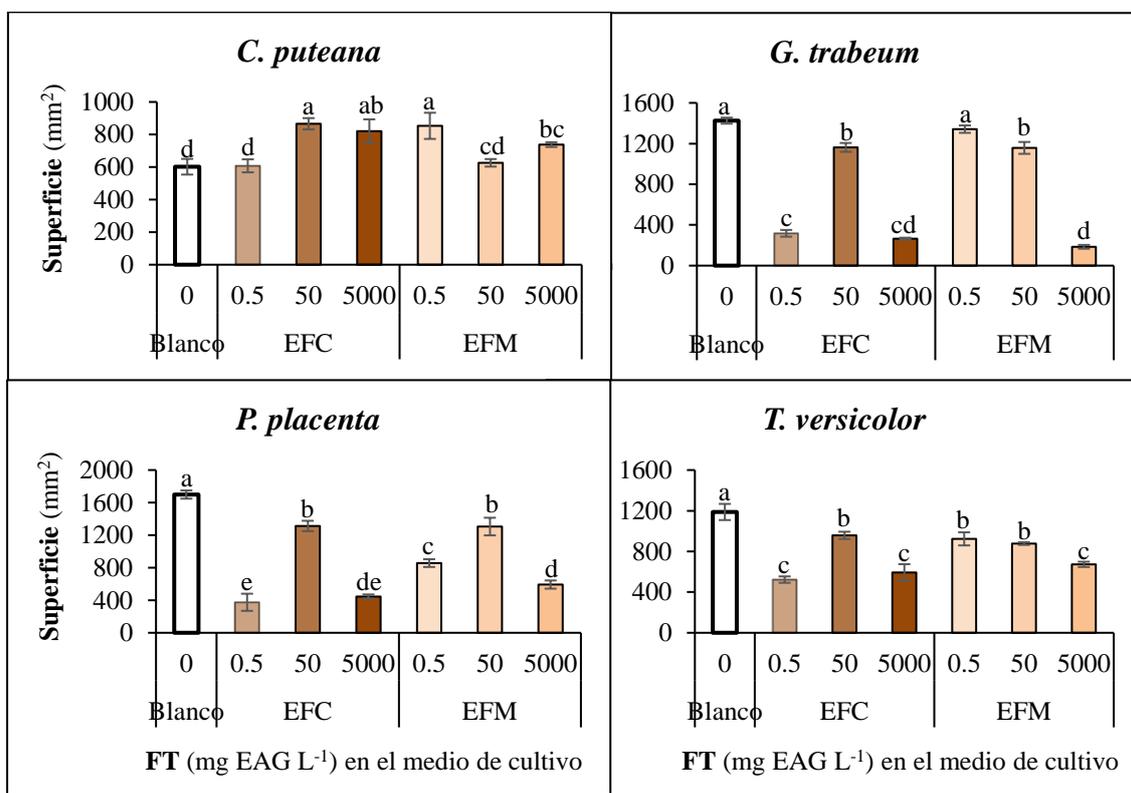


Figura 5.14. Crecimiento medio *in vitro* en superficie (mm²) de hongos de pudrición en medios de cultivo con extractos fenólicos de corteza (EFC) y madera (EFM) de *Castanea sativa*. FT: Fenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/L). Las diferencias significativas entre medios de cultivo se muestran con diferentes letras. ANOVA, *post hoc* DMS, $p \leq 0.05$, $n = 4$. Las barras verticales sobre las columnas representan el EE.

Los resultados obtenidos parecen indicar que una baja concentración de estos extractos puede llegar a ser más favorable que una dosis elevada, lo cual se explicaría, en base a la mezcla compleja que los constituyen, que, como ya dijimos, probablemente este aportando sustancias promotoras e inhibidoras, siendo, además, estas actividades diferentes según el hongo en estudio. Los extractos a base de corteza tienen un comportamiento bastante uniforme e independiente del hongo diana, lo que quizá sea debido a su composición favorable a los TC y nos hace pensar que estos compuestos serán probablemente los que jueguen el papel más importante en las defensas. En todas las dosis, y en ambos tipos de extractos, queda confirmada su actividad antifúngica *in vitro* y por tanto su potencial uso como tal, si bien su aplicación industrial requeriría de una purificación y un ajuste del tratamiento.

Como conclusión general, se constata la eficacia de la gestión como herramienta para la mejora del estado sanitario de las masas de castaño, si bien, este efecto se debe a corto plazo a la eliminación de las zonas dañadas y de los inóculos, y no a una mejora de las defensas del árbol mediada por el metabolismo fenólico o por el estado nutricional. El perfil fenólico de los tejidos no se ve alterado de forma significativa por la actuación realizada en la parcela, aunque es posible definir una tendencia intra-anual al concentrarse estos compuestos durante el mes de julio, aspecto que otros autores como Rodríguez & Colinas (1999), relacionaron con una mayor capacidad de reacción frente a la infección por *C. parasitica*. La gestión sí parece haber afectado a la acumulación de sustancias fenólicas en hoja, que en el momento de la caída presentan una proporción diferente, pero su efecto sobre la degradación de la hojarasca no es significativo y su acumulación en el mantillo no alcanzó los niveles adecuados para diferenciar la degradación. Se constata el efecto significativo de estos compuestos en el crecimiento de *C. parasitica in vitro*, pero no se alcanzó un efecto similar *in vivo*.

5.4 BIBLIOGRAFÍA

Aerts, R. & Chapin III, F. S. (1999). The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Advances in ecological research*, 30: 1-67.

Afif-Khoury, E.; Álvarez-Álvarez, P.; Fernández-López, M. J.; Oliveira-Prendes, J. A. & Cámara-Obregón, A. (2011). Influence of climate, edaphic factors and tree nutrition on site index of chestnut coppice stands in north-west Spain. *Forestry*, 84 (4): 385-396.

AIEF (Área de Inventario y Estadísticas Forestales) (2012). Cuarto Inventario Forestal Nacional: Principado de Asturias. Ed. Dirección General de Desarrollo Rural y Política Forestal del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (España). 58 pp.

Amorini, E.; Manetti, M. C.; Turchetti, T.; Sansotta, A. & Villani, F. (2001). Impact of silvicultural system on *Cryphonectria parasitica* incidence and on genetic variability in a chestnut coppice in Central Italy. *Forest Ecology and Management*, 142 (1-3): 19-31.

Anagnostakis, S. L. (1987). Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia*, 79 (1): 23-37.

Arrobas, M.; Afonso, S.; Ferreira, I. Q.; Moutinho-Pereira, J.; Correia, C. M. & Rodrigues, M. Â. (2017). Liming and application of nitrogen, phosphorus, potassium, and boron on a young plantation of chestnut. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41 (6): 441-451.

Arrobas, M.; Afonso, S. & Rodrigues, M. Â. (2018). Diagnosing the nutritional condition of chestnut groves by soil and leaf analyses. *Scientia Horticulturae*, 228: 113-121.

Barceló, J.; Nicolás, G.; Sabater, B. & Sánchez, R. (1987). Nutrición mineral. En *Fisiología vegetal*, Pirámide (edit.), Madrid, 4ª ed. actualizada: 193-214.

Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57 (3): 101-110.

Bernardo, U.; Iodice, L.; Sasso, R.; Tutore, V. A.; Cascone, P. & Guerrieri, E. (2013). Biology and monitoring of *Dryocosmus kuriphilus* on *Castanea sativa* in Southern Italy. *Agricultural and forest entomology*, 15 (1): 65-76.

Bolvanský, M.; Adamčíková, K. & Kobza, M. (2014). Screening resistance to chestnut blight in young chestnut trees derived from *Castanea sativa* × *C. crenata* hybrids. *Folia Oecologica*, 41 (1): 1-7.

Capuz, R. (2005). Materiales orgánicos. Maderas. Ed. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia (España). 279 pp.

Carnevale, N. J. & Lewis, J. P. (2009). Leaf litter quality and litter decomposition of woody species in a seasonal subtropical forest (Argentina). *ECOTROPICA*, 15, 23-33.

Castellanos-Barliza, J. & León, J. D. (2011). Descomposición de hojarasca y liberación de nutrientes en plantaciones de *Acacia mangium* (Mimosaceae) establecidas en suelos degradados de Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 59 (1): 113-128.

Cerasa, G. & Massa, B. (2016). Tettigoniidae (Orthoptera) ovipositing in old galls of *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae). *European Journal of Entomology*, 113: 397-402.

Chung, H. J.; Kwon, B. R.; Kim, J. M.; Park, S. M.; Park, J. K.; Cha, B. J.; Yang, M. S. & Kim, D. H. (2008). A tannic acid-inducible and hypoviral-regulated laccase3 contributes to the virulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21 (12): 1582-1590.

Conedera, M.; Manetti, M. C.; Giudici, F. & Amorini, E. (2004). Distribution and economic potential of the Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Europe. *Ecologia Mediterranea*, 30 (2): 179-193.

Cutini, A. (2001). New management options in chestnut coppices: an evaluation on ecological bases. *Forest Ecology and Management*, 141 (3), 165-174.

Deflorio, G.; Johnson, C.; Fink, S. & Schwarze, F. W. M. R. (2008). Decay development in living sapwood of coniferous and deciduous trees inoculated with six wood decay fungi. *Forest Ecology and Management*, 255 (7): 2373-2383.

Dinis, L.-T.; Peixoto, F.; Zhang, C.; Martins, L., Costa, R. & Gomes-Laranjo, J. (2011). Physiological and biochemical changes in resistant and sensitive chestnut (*Castanea*) plantlets after inoculation with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75 (4): 146-156.

García, A. (2011). Inventarios florísticos en masas de monte bajo de *Castanea sativa* Miller en Asturias. Proyecto Fin de Grado de la Escuela Politécnica de Mieres, Universidad de Oviedo (España).

García-Palacios, P.; Maestre, F.T.; Kattge, J. & Wall, D.H. (2013) Climate and litter quality differently modulate the effects of soil fauna on litter decomposition across biomes. *Ecology Letters*, 16 (8): 1045–1053.

Global Invasive Species Database (2018). Species profile: *Cryphonectria parasitica*. <http://www.iucngisd.org/gisd/speciesname/Cryphonectria+parasitica> (22/06/2018).

Gondard, H.; Santa Regina, I.; Salazar, S.; Peix, A. & Romane, F. (2007). Effect of forest management on plant species diversity in *Castanea sativa* stands in Salamanca (Spain) and the Cvennes (France). *Scientific Research and Essays*, 2 (2): 062-070.

- González, G. (2009). El chancro del castaño en el Principado de Asturias. Incidencia, epidemiología y control. Tesis Doctoral. Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria, Universidad de León (España).
- Helm, R. F.; Ranatunga, T. D. & Chandra, M. (1997). Lignin-hydrolyzable tannin interactions in wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3100-3106.
- Huber, D. M. & Jones, J. B. (2013). The role of magnesium in plant disease. *Plant and Soil*, 368 (1-2): 73-85.
- Lee, S. H.; Park, J. Y.; Kim, K. H. & Lee, J. K. (2004). Characteristics of hypovirulent strains of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* isolated in Korea. III International Chestnut Congress, ISHS Acta Horticulturae 693: 611-616.
- Leonardi, S.; Santa Regina, I.; Rapp, M.; Gallego, H. A. & Rico, M. (1996). Biomass, litterfall and nutrient content in *Castanea sativa* coppice stands of southern Europe. *Annales des Sciences Forestières*, 53 (6): 1071-1081.
- López, A. J. (2005). Manual de edafología. Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química. Universidad de Sevilla (España). 144 pp.
- Lorenz, K.; Preston, C. M.; Raspe, S.; Morrison, I. K. & Feger, K. H. (2000). Litter decomposition and humus characteristics in Canadian and German spruce ecosystems: information from tannin analysis and ¹³C CPMAS NMR. *Soil Biology and Biochemistry*, 32 (6): 779-792.
- Lushaj, B. M. & Tabaku, V. (2009). Rejuvenation of over-matured sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) forests in Tropoja, Albania. I European Congress on Chestnut-*Castanea*, 866: 551-559.
- Manetti, M. C.; Amorini¹, E.; Becagli, C.; Pelleri¹, F.; Fratini, R. & Marone, E. (2010a). Enhancing chestnut coppices: silvicultural management and socio-economic context. *Annals of Silvicultural Research*, 36: 97-108.
- Manetti, M. C.; Amorini¹, E.; Becagli, C.; Pelleri¹, F.; Pividori, M.; Schleppe, P.; Zingg, A. & Conedera, M. (2010b). Quality wood production from chestnut (*Castanea sativa* Mill.) coppice forests-Comparison between different silvicultural approaches. I European Congress on Chestnut-Castanea 2009, Acta Horticulturae 866, ISHS 2010: 683-692.
- Martínez-Yrizar, A.; Nuñez, S. & Búrquez, A. (2007). Leaf litter decomposition in a southern Sonoran Desert ecosystem, northwestern Mexico: Effects of habitat and litter quality. *Acta Oecologica*, 32: 291-300.
- Mila, I.; Scalbert, A.; & Expert, D. (1996). Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry*, 42 (6): 1551-1555.

- Miranda-Fontaina, M. E.; Fernández-López, J.; Vettrano, A. M. & Vannini, A. (2007). Resistance of *Castanea* clones to *Phytophthora cinnamomi*: testing and genetic control. *Silvae Genetica*, 56 (1-6): 11-21.
- Moriya, S.; Shiga, M. & Adachi, I. (2003). Classical biological control of the chestnut gall wasp in Japan. En Proceedings 1st International Symposium on biological control of arthropods, USDA Forest Service, Washington (EUA): 407-415.
- Nienstaedt, H. (1953). Tannin as a factor in the resistance of chestnut, *Castanea* spp., to the chestnut blight fungus, *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, 43: 32-38.
- Oßwald, W.; Fleischmann, F.; Rigling, D.; Coelho, A. C.; Cravador, A.; Diez, J.; Dalio, R. J.; Horta Jung, M.; Pfanz, H., Robin, C.; Sipos, G.; Solla, A.; Cech, T.; Chambery, A.; Diamandis, S.; Hansen, E.; Jung, T.; Orlikowski, L. B.; Parke, J.; Prospero, S. & Werres, S. (2014). Strategies of attack and defence in woody plant–*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology*, 44 (3): 169–190.
- Ockels, F. S.; Eyles, A.; McPherson, B. A.; Wood, D. L. & Bonello, P. (2007). Phenolic chemistry of coast live oak response to *Phytophthora ramorum* infection. *Journal of Chemical Ecology*, 33 (9): 1721-1732.
- Panjehkeh, N.; Backhouse, D. & Taji, A. (2010). Role of proanthocyanidins in resistance of the legume *Swainsona formosa* to *Phytophthora cinnamomi*. *Journal of Phytopathology*, 158 (5): 365-371.
- Papaioannou, A. (2013). Assessment of the Empirical Management Method of Coppice Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Forests Practiced by the Monks and its Effect on the Availability of Forest Soil Resources in Mount Athos, Greece. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41 (1): 317.
- Peraza, F. (2001). Protección preventiva de la madera. Asociación de Investigación Técnica de las Industrias de la Madera. 437 pp.
- Philp, R. W.; Bruce, A. & Munro, A. G. (1995). The effect of water soluble Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.] heartwood and sapwood extracts on the growth of selected *Trichoderma* species. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 35 (4): 355-367.
- Pividori, M.; Armando, F. & Conedera, M. (2005). Post cultural dynamics in a mixed chestnut coppice at its ecological border. III International Chestnut Congress, ISHS Acta Horticulturae 693: 219-224.
- Portela, E.; Ferreira-Cardoso, J.; Louzada, J. & Gomes-Laranjo, J. (2015). Assessment of boron application in chestnuts: Nut yield and quality. *Journal of plant nutrition*, 38 (7): 973-987.

- Portela, E. & Louzada, J. (2005). Nutrient status of chestnut orchards. I. Relationship with incidence of blight. III International Chestnut Congress, ISHS Acta Horticulturae 693: 557-564.
- Portela, E.; Pires, C. C. & Louzada, J. (2010). Magnesium deficiency in chestnut groves: the influence of soil manganese. Journal of plant nutrition, 33 (3): 452-460.
- Portela, E.; Roboredo, M. & Louzada, J. (2003). Assessment and description of magnesium deficiencies in chestnut groves. Journal of plant nutrition, 26 (3): 503-523.
- Raimundo, F.; Martins, A. & Madeira, M. (2008). Decomposition of chestnut litterfall and eight-year soil chemical changes under a no-tillage management system in Northern Portugal. Annals of forest science, 65: 408p1-11.
- Robin, C. & Heiniger, U. (2001). Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. Forest Snow and Landscape Research, 76 (3): 361-367.
- Rodríguez, J. & Colinas, C. (1999). Resistance test for chestnut against *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. Acta Horticulturae 494 (II International Symposium on Chestnut): 369-376.
- Sanidad Vegetal (2014). Avispilla del castaño *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu) (Hymenoptera, Cynipidae). Ficha Técnica 27/2014, Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos, Gobierno del Principado de Asturias (España). 2 pp.
- Santa Regina, I. (2000). Organic matter distribution and nutrient fluxes within a sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) stand of the Sierra de Gata, Spain. Annals of Forest Science, 57 (7): 691-700.
- Schwarze, F. W.; Jauss, F.; Spencer, C.; Hallam, C. & Schubert, M. (2012). Evaluation of an antagonistic *Trichoderma* strain for reducing the rate of wood decomposition by the white rot fungus *Phellinus noxius*. Biological Control, 61 (2): 160-168.
- Somers, T. C.; Evans, M. E. (1977). Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "chemical age". Journal of the Science of Food and Agriculture, 28 (3): 279-287.
- Speilman, L. (2003). The role of fungal competition and tannin chemistry in chestnut and oak resistance to *Cryphonectria parasitica*. Tesis de Honor, Department of Biology, Sweet Briar College, Virginia (EUA).
- Toprak, S. & Seferoğlu, S. (2013). The seasonal changes of nutritional elements of chestnut (*Castanea sativa*) plant and determination of leaf sampling times. American Journal of Research Communication, 1 (5): 1-8.
- Trapiello, E. (2017). Chancro en castaño: hongos implicados en la enfermedad y estrategias de control de *Cryphonectria parasitica*. Tesis Doctoral, Departamento de

Ingeniería y Ciencias Agrarias, Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria, Universidad de León (España).

Valdezate, C.; Alzugaray, R.; Landeras, E.; Braña, M. (2001). Situación actual de *Cryphonectria parasitica* (Murril) Anderson, cancro cortical, en los castaños asturianos. Boletín de Sanidad Vegetal, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (España), 27: 401-410.

Wang, J.; Shi, L.; He, X.; Lu, L.; Li, X. & Chen, B. (2016). Comparative secretome analysis reveals perturbation of host secretion pathways by a hypovirus. Scientific Reports, 6 (34308): 1-12.

Yen, T. B.; Chang, H. T.; Hsieh, C. C. & Chang, S. T. (2008). Antifungal properties of ethanolic extract and its active compounds from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* (Florin) heartwood. Bioresource Technology, 99 (11): 4871-4877.

Zlatanov, T.; Schleppi, P.; Velichkov, I.; Hinkov, G.; Georgieva, M.; Eggertsson, O.; Zlatanova, M. & Vacik, H. (2013). Structural diversity of abandoned chestnut (*Castanea sativa* Mill.) dominated forests: Implications for forest management. Forest Ecology and Management, 291: 326-335.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Para órganos y tejidos con una alta actividad metabólica, las temperaturas de conservación y molienda influyen de forma significativa en los resultados obtenidos para fenoles totales, taninos condensados y, al menos cualitativamente, para los taninos hidrolizables. La conservación de las muestras a -80 °C y la molienda en nitrógeno líquido ($T^a \leq -195.8\text{ °C}$), aumenta el rendimiento tanto por una mejor conservación como por una probable mayor eficiencia extractiva al disminuir y uniformizar el tamaño de partícula.
2. La presencia de agua en los solventes de los estándares y muestras utilizados en la valoración de los taninos condensados mediante el método de la vainillina reduce significativamente la sensibilidad del método.
3. La eficiencia de la metanólisis utilizando metanol/ácido sulfúrico (MeOH/H₂SO₄, 10:1, v/v) en atmósfera de N₂ a 85 °C durante 180 min es superior a la que ofrecen el metanol/ácido clorhídrico 6 M (MeOH/HCl, 9:1, v/v) a 120 °C durante 160 min y la que se consigue con disolución anhidra de HCl en metanol (190 μL cloruro de acetilo/mL MeOH) a 100 °C durante 60 min.
4. La mejor calidad de estación se asociada a una orientación que favorezca la insolación, una menor oscilación térmica, menor pluviometría y mayor ventosidad, todo ello en términos relativos a las condiciones de Asturias donde el agua no es un factor limitante y las temperaturas no son extremas.
5. La presencia de arcilla y un pH más ácido son los factores que caracterizan desde el punto de vista del suelo la mala calidad de estación, y que condicionarán el estado nutricional del árbol modificando fundamentalmente el equilibrio N/P de la hoja. Estas diferencias foliares no se correspondieron con los parámetros edáficos para estos nutrientes, aunque si se pueden relacionar con las condiciones desfavorables en cuanto a temperatura y pH.
6. En el tronco, el K y el Mg son los elementos más contrastantes entre calidades de estación, mostrando comportamientos contrarios. El K es favorable a la mejor calidad de estación y menos variable, y el Mg es contrario en ambos aspectos. El Ca destaca en cuanto a correspondencia con los anillos de crecimiento.
7. Los compuestos de naturaleza fenólica muestran balance favorable a la buena calidad de estación en tejidos permanentes como la madera o corteza interna, siendo superior su concentración en los tejidos/órganos más influenciados por el

- ambiente, como las hojas, amentos o corteza externa, cuando la calidad de estación es inferior.
8. Se ha podido demostrar la participación de los fenoles en la menor incidencia del ataque del hongo *Cryphonectria parasitica* en la zona de mejor calidad de estación a través de los ensayos *ex situ* en ramas, de la inhibición del crecimiento de este y otros hongos de pudrición de la madera en ensayos *in vitro* mediante aplicación de extractos fenólicos procedentes de madera y corteza de *Castanea sativa* y de la relación entre la durabilidad, y por tanto la resistencia al ataque de hongos, y la presencia de estos compuestos.
 9. La gestión no modifica a corto plazo el perfil fenólico de los tejidos de las ramas y tampoco la susceptibilidad a *C. parasitica* en ensayos *ex situ*, apoyando de forma indirecta la relación entre ambos factores y constatando que el efecto de la gestión sobre la enfermedad causada por este hongo se debe fundamentalmente a la eliminación del inóculo y la mejora en las condiciones ambientales y, *a priori*, no a un aumento de la tolerancia a la enfermedad.
 10. El entorno del árbol está influenciado por su presencia de forma que retroalimenta sus buenas o malas cualidades, al menos desde el punto de vista de los fenoles. La peor calidad de estación implica una mayor concentración fenólica en los órganos/tejidos que más afectan al entorno, los dehiscentes y los que pueden caer por diferentes razones, que provocaran una concentración más alta de estos compuestos en el suelo potenciando sus efectos desfavorables en la actividad microbiana, degradación de la materia orgánica, humificación y reciclado de los nutrientes.
 11. Las diferencias en la composición faunística del suelo no se asocian al resto de parámetros que parecen condicionar la calidad de estación y la gestión no afecta al suelo, al menos en el plazo estudiado en relación con los parámetros que condicionarían la evolución de la materia orgánica y el reciclado de nutrientes.

