



**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

---

**Contribución al estudio de las funciones  
ecológicas que pueden desempeñar los  
compuestos derivados del metabolismo  
secundario en *Cistus ladanifer* L.**

---

Memoria que presenta la licenciada. D<sup>ña</sup> **Teresa Sosa Díaz** para optar al  
Grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la  
Universidad de Extremadura.  
Badajoz, Noviembre 2003.

Dra. Natividad Chaves Lobón, Profesora Titular del Área de Ecología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura y D. José Carlos Escudero García, Catedrático del mismo área,

CERTIFICAN:

Que la memoria descrita en este trabajo con el título “**Contribución al estudio de las funciones ecológicas que pueden desempeñar los compuestos derivados del metabolismo secundario en *Cistus ladanifer* L.**”, ha sido realizado bajo su dirección por **Teresa Sosa Díaz**, en el Dpto. de Física (Área de Ecología) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura, y que, salvo mejor criterio del tribunal que ha de juzgarlo, reúne todas las condiciones para poder optar al **Grado de Doctor en Ciencias Biológicas**.

Y para que así conste, firma la presente a 26 de Febrero de 2004.

Fdo.: Natividad Chaves Lobón.

Fdo.: José Carlos Escudero García.



Vivir es estar en la Tierra,  
para que al andar  
puedas tus huellas dejar.

Puedes vivir en las nubes,  
y no dejar nada a tu paso  
al final todos te olvidarán.

Vivir es la juventud de un bosque floreado.  
Vivir es la vejez de una mente plasmada.  
Vivir es la soledad, cuando nunca estás solo.

Al final todos esperamos el tren,  
unos lo cogen antes y otros después  
pero nadie, nadie lo va a perder.

Antonio Martín.

A Antonio

A mis padres

## AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que han contribuido, en mayor o menor medida, a la realización de esta memoria, deseo expresarles mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar a mis directores Dra. Natividad Chaves y Dr. José Carlos Escudero, por que a ellos debo mi formación, tanto personal como profesional, durante estos años, y en una labor tan complicada como es la investigación. Sin ellos esto no hubiera sido posible. Y a Nati en especial, por afianzar mi autoestima y apoyarme siempre.

Al Dr. Carlos Gutiérrez-Merino, porque gracias a su tesón y percepción investigadora, se nos abren nuevos caminos en el estudio de *Cistus ladanifer*. Al Dr. Fernando Henao por su cordialidad en ayudarme a entender la complicada actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa. Y a los dos por su disponibilidad y entusiasmo por este trabajo.

A D<sup>o</sup> José del Moral por su gentileza en aportarnos todo lo necesario para realizar los experimentos que acaban este trabajo, pero que a la vez serán el comienzo de otros nuevos.

A Dr. Jesús Beltrán por su amabilidad en dejarnos utilizar el rotavapor siempre que me fue necesario y aclarar nuestras dudas en química.

Al Dr. José Martín, por su gentileza y disponibilidad para resolver mis dudas y problemas informáticos, y por ayudarme con esas, tan complicadas, primeras clases. Que Dios, y alguien más, te lo pague el día de la habilitación.

Al Dr. José Cabezas, a la Dra. Teresa Buyolo, a la Dra. Encarna García y a la Dra. María Pérez por resolver todas las dudas y cuestiones que se me plantearon en la realización de esta tesis, a Paquita por ayudarme con toda la burocracia que este trabajo conlleva, y a todos ellos por su apoyo emocional en aquellos momentos difíciles.

A Juan Carlos Alías, por su disponibilidad para ayudarme siempre que lo necesité, parte de este trabajo es tuyo. A las que han sido mis *compis* de faena durante este último año: Javier, Jaime, Ascensión, Yolanda, Elvira, Laly, Sonia y Belén, por ayudarme a desenvolverme en el orden del laboratorio del Departamento de Bioquímica.

A todas mis amigas por aportar la cara alegre de este trabajo y por que aunque el camino de la vida nos separe, la amistad siempre nos unirá. Gracias por estar ahí.

A toda mi familia: abuela, padres, hermanas, sobrinos, tíos, primos, cuñados, familia Martín, y a los que ya no se encuentran entre nosotros, por su apoyo, compañía, ánimos y cariño recibido. Agradeciendo principalmente este trabajo, a mis abuelos y a mis padres, por su lucha personal para que sus hijos tuvieran una vida mejor que la que a ellos les tocó vivir, y porque con su esfuerzo y con el de muchos más, construyeron un país en él que ahora sus nietos podemos recoger el fruto de lo sembrado. A mis hermanas por su cariño y a mi sobrino Roberto por alegrar esa casa nueva que tan silenciosa se ha quedado.

Por último, quiero recordar todo lo bueno que me ha pasado en el transcurso de este trabajo, como la de comenzar una vida nueva al lado de la persona a la que quiero y la de saber que una nueva persona (D.m.) nos acompañará. A Antonio, por ser el culpable de todo esto, y sobretodo, por ser mi punto de apoyo y aguantarme en aquellos momentos difíciles en los que todo el camino recorrido de esta joven carrera de investigación parecía llegar a su fin, menos precisamente..., esta tesis.

- "¿No es también una consecuencia de la teoría de la evolución de Darwin que formamos parte de algo grande y que cada minúscula forma de vida tiene importancia para el gran contexto? inosotros somos el planeta vivo, Sofía! somos el gran barco que navega alrededor de un sol ardiente en el universo. pero cada uno de nosotros también es un barco que navega por la vida cargado de genes. si logramos llevar esta carga al próximo puerto, entonces no habremos vivido en vano. Bjornstjerne Bjornson expresó la misma idea en el poema psalmii:

*iHonremos la primavera eterna de la vida  
que todo lo creó;  
hasta lo minúsculo tiene su creación merecida,  
sólo la forma se perdió.  
De estirpes nacen estirpes  
que alcanzan mayor perfección;  
de especies nacen especies,  
millones de años de resurrección.*

*iAlégrate tú que tuviste la suerte de participar  
como flor en su primer abril  
y, en honor a lo eterno, el día disfrutar  
como ser humano  
y de poner tu grano  
en la tarea de la eternidad;  
pequeño y débil inhalarás  
un único soplo  
del día que no acaba jamás!"*

Jostein Gaarder (El mundo de Sofía. 1991).

# ÍNDICE

<b>I.- INTRODUCCION .....</b>	<b>16</b>
I.1.- Descripción morfológica, fenológica y ecológica de <i>C. ladanifer</i> .....	17
I.2.- Exudado de <i>C. ladanifer</i> : Antecedentes bibliográficos .....	20
I.3.- Aspectos generales del metabolismo secundario en plantas .....	21
I.4.- Funciones ecológicas de los compuestos del metabolismo secundario.....	26
I.4.1.- Función alelopática.....	27
I.4.2.- Función antiherbívoro .....	30
I.5.-Ca <sup>2+</sup> -ATPasa del retículo sarcoplásmico .....	35
I.5.1.-Datos estructurales de la Ca <sup>2+</sup> -ATPasa del retículo sarcoplásmico.....	35
I.5.2.-Mecanismo catalítico de la Ca <sup>2+</sup> -ATPasa del retículo sarcoplásmico .....	39
I.5.3.-Modulación de la actividad Ca <sup>2+</sup> -ATPasa por flavonoides .....	41
<b>II.- OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
<b>III.- MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
III.1.- Separación cromatográfica .....	46
III.1.1.- Recogida de muestras .....	46
III.1.2.- Extracción del exudado.....	46
III.1.3.- Separación cromatográfica .....	47

III.2.- Extracción, purificación y cuantificación de flavonoides contenidos en el exudado de las hojas de <i>C. ladanifer</i> .....	49
III.2.1.- Extracción y purificación .....	50
III.2.2.- Cuantificación .....	50
III.3.- Identificación de compuestos presentes en la Fracción 2 del exudado de las hojas de <i>C. ladanifer</i> .....	54
III.4.- Ensayo de germinación .....	55
III.4.1.- Selección de semillas .....	55
III.4.2.- Índices medidos para cuantificar el efecto alelopático .....	55
III.4.3.- Ensayo de la actividad alelopática de flavonoides.....	56
III.4.4.- Ensayo de la actividad alelopática con los compuestos identificados en la Fracción 2.....	58
III.5.- Estudio del potencial alelopático de suelos asociados a <i>C. ladanifer</i> ....	61
III.5.1.- Selección de puntos de muestreo .....	61
III.5.2.- Recogida de muestras .....	61
III.5.3.- Análisis químico de las muestras.....	62
III.5.4.- Extracción de fenoles totales de suelos asociados a <i>C. ladanifer</i> .....	63
III.5.5.- Extracción e identificación de compuestos presentes en el suelo .....	65
III.5.6.- Ensayo de germinación en suelos .....	65
III.6.- Test de germinación .....	67

III.7.- Estudio de la función antiherbívoro de flavonoides contenidos en el exudado de <i>C. ladanifer</i> .....	68
III.7.1.- Modulación de la actividad $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa por flavonoides contenidos en el exudado de <i>Cistus ladanifer</i> .....	68
III.7.1.1- Preparación de vesículas de retículo sarcoplásmico ....	68
III.7.1.2- Medida de actividad $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.....	69
III.7.1.3- Preparación de disoluciones de concentración de $\text{Ca}^{2+}$ libre fija con tampones de $\text{Ca}^{2+}$ /EGTA .....	71
III.7.1.4.- Medida de nivel de $\text{Ca}^{2+}$ acumulado por RS con arsenazoIII .....	72
III.7.1.5.-Medidas de fluorescencia.....	76
III.7.1.6.-Análisis de los resultados .....	78
III.7.2.- Bioensayo con <i>Galleria mellonella</i> .....	79
<b>IV.- RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
IV.1.- Identificación y separación de los compuestos que constituyen el exudado de <i>C. ladanifer</i> .....	82
IV.1.1.- Separación por HPLC .....	82
IV.1.2.- Separación e identificación por Cromatografía de Gases- Espectroscopía de Masas .....	88
IV.2.- Efecto alelopático del exudado de <i>C. ladanifer</i> en la germinación de <i>Rumex crispus</i> .....	92
IV.2.1.- Efecto de los flavonoides sobre <i>Rumex crispus</i> . Ensayo sobre papel.....	92

IV.2.1.1.- Efecto de los flavonoides en la germinación, nacimiento de cotiledones y desarrollo de plántulas de <i>R. crispus</i> .	92
IV.2.1.2.- Efecto de los flavonoides en la velocidad de germinación y nacimiento de cotiledones de plántulas de <i>R. crispus</i>	98
IV.2.2.- Efecto de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre <i>R. crispus</i> . Ensayo sobre papel.....	101
IV.2.2.1.- Efecto de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y desarrollo de las plántulas de <i>R. crispus</i> .....	101
IV.2.2.2.- Efecto de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la velocidad de germinación y nacimiento de cotiledones de las plántulas de <i>R. crispus</i> .....	108
IV.2.2.3.- Efecto de la interacción de los compuestos identificados sobre la Fracción 2 sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y desarrollo de las plántulas de <i>R. crispus</i> .....	112
IV.2.2.4.- Efecto de la interacción de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la velocidad de germinación y nacimiento de cotiledones de las plántulas de <i>R. crispus</i> .....	117
IV.2.3.- Efecto de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre <i>R. crispus</i> . Ensayo sobre suelo.....	120
IV.2.3.1.- Efecto de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y desarrollo de las plántulas de <i>R. crispus</i> .....	120
IV.2.3.2.- Efecto de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la velocidad de germinación y nacimiento de cotiledones de plántulas de <i>R. crispus</i> .....	121

IV.2.3.3.- Efecto de la interacción de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y desarrollo de las plántulas de <i>R. crispus</i> .....	129
IV.2.3.4.- Efecto de la interacción de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la velocidad de germinación y nacimiento de cotiledones y desarrollo de plántulas de <i>R. crispus</i> .....	135
IV.3.- Ensayo de germinación en suelos asociados a <i>C. ladanifer</i> .....	138
IV.4.- Análisis químico de suelos asociados a <i>C. ladanifer</i> .....	144
IV.5.- Extracción e identificación de compuestos en suelos asociados a <i>C. ladanifer</i> .....	157
IV.5.1.- Distribución de fenoles totales en suelos asociados a <i>C. ladanifer</i> .....	157
IV.5.2.- Identificación y cuantificación por HPLC de compuestos presentes en suelos asociados a <i>C. ladanifer</i> .....	160
IV.6.- Cuantificación del exudado y flavonoides en hojas y tallos fotosintéticos de <i>C. ladanifer</i> .....	184
IV.6.1.- Variación cuantitativa del exudado de <i>C. ladanifer</i> a lo largo del año.....	184
IV.6.2.- Variación cuantitativa de flavonoides en el exudado a lo largo del año .....	187
IV.6.3.- Variación cualitativa y cuantitativa de cada uno de los flavonoides en el exudado a lo largo del año.....	191
IV.6.4.- Estudio individual de apigeninas y kampferoles frente a sus respectivos totales en hojas jóvenes, viejas y tallos .....	201
IV.7.- Efecto antiherbívoro del exudado de <i>C. ladanifer</i> .....	207

IV.7.1- Modulación de la actividad Ca <sup>2+</sup> -ATPasa por flavonoides contenidos en el exudado de <i>C. ladanifer</i> .....	207
IV.7.1.1.- Efecto del exudado sobre la actividad Ca <sup>2+</sup> -ATPasa.....	207
IV.7.1.2.- Efecto de mezcla de flavonoides sobre la actividad Ca <sup>2+</sup> -ATPasa .....	212
IV.7.1.3.- Efecto de la concentración de cada flavonoide sobre la actividad Ca <sup>2+</sup> -ATPasa.....	218
IV.7.1.3.1.- Modulación por apigenina y derivados metilados .....	218
IV.7.1.3.2.- Modulación por 3- <i>O</i> -metilkampferol, 3,4'-di- <i>O</i> -metilkampferol y 3,7-di- <i>O</i> -metilkampferol.....	221
IV.7.1.4.- Efecto de los flavonoides sobre los niveles de Ca <sup>2+</sup> en vesículas de RS en condiciones de estado estacionario .....	224
IV.7.1.5.- Estabilidad de la actividad Ca <sup>2+</sup> -ATPasa en vesículas de RS tratadas con flavonoides .....	226
IV.7.1.6.- Efecto de apigenina, 3- <i>O</i> -metilkampferol y 3,4'-di- <i>O</i> -metilkampferol sobre la dependencia de Ca <sup>2+</sup> de la actividad Ca <sup>2+</sup> -ATPasa .....	228
IV.7.1.7.- Interacción de los flavonoides con la Ca <sup>2+</sup> -ATPasa de RS.....	230
IV.7.1.7.1.- Efecto de los flavonoides sobre la fluorescencia intrínseca de las membranas de RS .....	232
IV.7.1.7.2.- Efecto de los flavonoides sobre la fluorescencia de liposomas .....	234

IV.7.1.7.3.- Efecto de los flavonoides sobre la fluorescencia de L-Trp.....	237
IV.7.1.8- Efecto de la concentración de RS sobre la inhibición de la actividad Ca <sup>2+</sup> -ATPasa por los flavonoides estudiados.....	239
IV.7.2.- Estudios preliminares de la actividad insecticida de los flavonoides de <i>C. ladanifer</i> . Bioensayo sobre <i>Galeria mellonella</i> .....	241
<b>V.- DISCUSIÓN</b> .....	242
<b>VI.- CONCLUSIONES</b> .....	264
<b>VII.- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	268

## **ABREVIATURAS:**

**Å:** Amstrong.

**Ap:** Apigenina.

**Ap-4':** 4'-*O*-metilApigenina.

**Ap-7:** 7-*O*-metilApigenina.

**DMSO:** Dimetil sulfóxido.

**IVC:** Índice de vigor de cotiledones.

**IVG:** Índice de vigor de germinación.

**K:** Kampferol.

**K-3,4':** 3,4'-di-*O*-metilKampferol.

**K-3,7:** 3,7-di-*O*-metilKampferol.

**K-3:** 3-*O*-metilKampferol.

**KDa:** Kilodalton.

**LDH:** Lactato deshidrogenasa.

**LVB:** Luz ultravioleta B

**Octil-Trp:** Octil-triptófano.

**PK:** Piruvato kinasa.

**RS:** Retículo sarcoplásmico.

**β-MeOH:** β-Mercaptoetanol.

# INTRODUCCIÓN

---

## **I.1.- DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA, FENOLÓGICA Y ECOLÓGICA DE *Cistus ladanifer*.**

*Cistus ladanifer* es un arbusto de 1 a 2,5m de altura, muy aromático, erecto (Bolaños y Guinea, 1949) con hojas coriáceas, glabras en la parte superior y tomentosas en la inferior, con 3 nerviaduras en el tercio proximal, sub-sésiles. Las flores son grandes y vistosas de 5 a 8cm de diámetro, distinguiéndose dos variedades según el tipo de flor, variedad albiflorus con flores cuyos pétalos son completamente blancos, y variedad maculatus, con flores de diámetro idéntico y con una mancha oscura encima de la uña de cada pétalo (Franco, 1971).

Presentan fruto en cápsula oval-oblonda o suboblonda escamosa-vellosa, con válvulas en número básico de 10, pero frecuentemente con 9 e incluso 8 por abortos carpelares. La dehiscencia es loculicida valvar dejando al descubierto numerosas semillas (250 por carpelo), diminutas (en torno a 0,5-1mm), poliédricas, lisas o muy ligeramente rugosas (Krollmann y Gülz, 1983).

Braun-Blanquet y col. (1941) afirman que la especie de *C. ladanifer* es originaria del suroeste de la Península Ibérica y zona septentrional de Marruecos. En España, abunda en Andalucía Occidental, Extremadura y las zonas Occidentales de Madrid, Castilla La Mancha y Castilla León, tornándose más rara en el norte de Galicia, Asturias, País Vasco, Aragón, Murcia, Valencia y Cataluña.

Las jaras son especies colonizadoras, típicamente xerófilas, sin especificidad para tipos de suelos (Rivas-Goday y Rivas-Martínez, 1967; Goes, 1968). El análisis morfológico sitúa a la jara como una planta típica del grupo I dentro de los síndromes de vegetación descrito por Herrera (1984). Es pues, una planta pionera, que coloniza suelos generalmente muy degradados asociados a etapas tempranas de la sucesión y que se adapta perfectamente a condiciones de baja fertilidad y otras situaciones extremas periódicas (Nuñez, 1989).

Su forma de crecimiento es típica de especies estrategas de la “r”, tras una perturbación fuerte se produce una rápida germinación de las semillas y el crecimiento rápido de las plántulas que tienden a ocupar el mayor espacio disponible. Después, las plántulas compiten entre ellas eliminándose gran cantidad de individuos, de esta manera se originan huecos que provocan la aparición de invasores, entre ellos, nuevas jaras que ayudan a perdurar el sistema (Nuñez, 1989).

Posee una importante estrategia de supervivencia que se da en especies que crecen bajo condiciones ambientales imprevisibles, y que consiste en que semillas de diferentes plantas de una población muestran variación en dormancia y germinación (Guterman, 1994a,b,c; Bewley y Black, 1994; Francisco-Ortega y col., 1994). El pretratamiento con altas temperaturas de estas semillas incrementa significativamente el porcentaje de germinación (García-Marquez y Escudero, 1991). Esto explica que se produce una masiva recolonización por plántulas de *C. ladanifer* en áreas quemadas, debido a que las altas temperaturas que se producen durante un fuego rompen el estado de dormancia de las semillas (Pérez-García, 1997).

Se desarrolla en ambientes climáticos muy diversos, siendo capaz de soportar desde estrés de frío hasta sequedad y altas temperaturas, durante periodos más o menos largos del año. Todos estos factores en sus valores extremos, son factores de estrés que tienden a limitar el crecimiento de la planta y frente a los cuales ha desarrollado diferentes mecanismos adaptativos (Nuñez, 1989).

Se implantan sobre cuarcita, pizarra y arenisca, en suelos ácidos con valores de pH comprendido entre 3,5 y 6 que corresponden a suelos pobres en nutrientes y con una mineralización bastante baja.

El estudio del ciclo vegetativo y reproductivo a lo largo del año, aporta una importante información acerca de la duración de diversas fases de desarrollo vegetativo frente a la variación de factores ambientales (Larcher, 1977). En *C. ladanifer* los distintos estados fenológicos son los siguientes:

- La producción foliar se inicia cuando empiezan las primeras lluvias, reduciéndose durante el periodo de sequía. La formación de yemas auxiliares

tiene su inicio de modo general en la segunda quincena de Enero hasta Mayo, periodo que coincide con la mayor abundancia de agua en el suelo (Lopes Borges, 1988).

- La floración ocurre entre mediados de Febrero y Mayo, dependiendo de las localidades (Lopes-Borges, 1988). En Extremadura se produce hasta Junio y esporádicamente se encuentran individuos floridos en Noviembre.
- La caída de hojarasca tiene lugar dos veces al año, la primera y más pronunciada, ocurre durante la segunda quincena de Mayo y la primera quincena de Junio, y la segunda entre Agosto y Octubre. Este periodo debe estar controlado por mecanismos fisiológicos, que a su vez están condicionados por diversos factores como temperatura, humedad, etc. El desarrollo de nuevas hojas y flores debe ser el factor desencadenante del desprendimiento de las antiguas (Nuñez, 1989). Además, que la caída sea justo antes de verano favorece la retención del agua, puesto que disminuye la evapotranspiración de la planta, ya que la superficie foliar de las nuevas hojas resulta bastante inferior a las de las viejas (Nuñez, 1989).

## **I.2.- EXUDADO DE *Cistus ladanifer*: ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.**

La gomorresina de *C. ladanifer*, denominada ládano, ha sido objeto de estudios por diferentes autores, principalmente debido a su interés industrial en perfumería. Este ládano se produce en las hojas y es secretado por unas estructuras denominadas tricomas. Estos tricomas secretores de oleorresina se encuentran en la parte adaxial y abaxial de la hoja, mayoritariamente en hojas jóvenes en pleno desarrollo (Lopes Borges, 1988). La densidad de tricomas varía entre las poblaciones de *Cistus ladanifer*, lo que sugiere que los factores ambientales y bióticos afectan a la producción de exudado (Levin, 1973).

Unos de los primeros análisis de la gomorresina de *C. ladanifer* fue realizado por García-Martín y García-Vallejo (1969), que identificaron compuestos como  $\alpha$ -pineno, fendrona, linalol, canfeno,  $\beta$ -cimeno, bornilo, borneol, acetato de linalilo, neral y geraniol. Otros compuestos como timol, carvanol, felandreno, furfural, benzaldehído y metilheptilacetona constituyen un porcentaje inferior.

Pascual y col. (1972, 1974 y 1977) identificaron los siguientes compuestos: ácido labdanólico, ácido ladánico, ácido catívico y ácido labd-8-en-15-oico. Aislaron e identificaron los siguientes flavonoides: 7-*O*-metilapigenina, 3,7,4'-tri-*O*-metilkampferol, 7,4'-di-*O*-metilapigenina y 3,7-di-*O*-metilkampferol y los terpenoides monohidroxilados: 15-nor-8-labdanol, viridiflorol, ledol, labd-8(17)-en-15-ol o ladenol y 15-hidroxi-labd-7-en-6-ona u oxocativol.

Proksch y col. (1980), caracterizaron 6 compuestos oxigenados: bencil benzoato, cis-ocimenona, 2-hidroxi-6-metil acetofenona, pinocarvona, aldehído canfoleno y tagetona.

Proksch y Gülz (1984), caracterizaron 4 flavonoides agliconas: 3-*O*-metilkampferol, apigenina, 4'-*O*-metilapigenina y 3,4'-di-*O*-metilkampferol.

### **I.3.- ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN PLANTAS.**

Además de los compuestos derivados del metabolismo primario, compuestos esenciales para la vida como aquellos que son intermediarios de las rutas bioquímicas, compuestos estructurales de membranas, pigmentos captadores de luz, etc.; las plantas contienen una amplia variedad de metabolitos secundarios. El término de “metabolismo secundario” fue introducido en 1891 por Kossel (citado en Baas, 1989) “*Mientras que los metabolitos primarios están presentes en cada célula de la planta que es capaz de reproducirse, los metabolitos secundarios están presentes solo accidentalmente y no son imprescindibles para la vida.*” En este sentido, se ha propuesto denominar a los compuestos primarios sustancias fisiológicamente eficaces, frente a los compuestos secundarios que serían ecológicamente eficaces (Strasburger y col., 1994).

Al igual que la fisiología y la morfología, la bioquímica está sujeta a la presión selectiva ejercida por el ambiente. Durante el curso de la evolución, muchos productos secundarios han sido sintetizados por diferentes especies de plantas y cuando la presencia de un producto particular ha conferido alguna ventaja selectiva, ésta se mantiene, originando aumento en las probabilidades de supervivencia de la especie y del producto en concreto. La síntesis de nuevos productos al azar, han proporcionado a los vegetales gran variedad, y esto constituye un prerrequisito necesario para la operación de selección natural y la evolución de todos los organismos vivos (Bell, 1980).

Algunos de los compuestos sintetizados como metabolitos secundarios en plantas, según Harborne (1985), se muestran en la Tabla 1.

Las condiciones ambientales, tales como la falta de nutrientes y déficit de agua, pueden restringir el crecimiento de las plantas y reducir la velocidad fotosintética. En tales condiciones, carbohidratos no estructurales tienden a ser acumulados y pueden explicar el aumento de síntesis de sustancias de defensas basadas en carbono pertenecientes al metabolismo secundario. La confirmación de este balance

carbono/nutrientes se ha encontrado en especies que se desarrollan en medios con baja disponibilidad de nutrientes o de agua, en las que se produce un aumento en la concentración de taninos condensados, lignina, fenoles totales y/o glucósidos de fenoles (Bryant y col., 1983; Gershenzon, 1984; Waring y col., 1985; Nicolai, 1988). Últimas investigaciones muestran que estos metabolitos secundarios se pueden encontrar incluso en plantas acuáticas como *Ceratophyllum demersum* donde se han encontrado flavonoides glucósidos (Bankova y col., 1995).

**Tabla 1:** Compuestos sintetizados como metabolitos secundarios en plantas, según Harborne, 1985.

<b>TIPO</b>	<b>DISTRIBUCIÓN</b>	<b>Nº APROXIMADO DE ESTRUCTURAS</b>
Compuestos nitrogenados		
Alcaloides	Angiospermas especialmente en hojas y fruto.	5.500
Aminas	Angiospermas, especialmente en flores.	100
Aminoácidos(no proteicos)	En semillas de leguminosas Crucíferas.	400
Glucosinolatos	Crucíferas y otras 10 familias.	75
Glicósidos cianogénicos	Esporádicos en frutos y hojas.	30
<b>Terpenoides</b>		
Monoterpenos	En aceites esenciales.	1000
Lactonas sesquiterpénicas	En compuestas, incrementando en otras angiospermas.	600
Diterpenos	En especial en látex y resinas.	1000
Saponinas	Más de setenta familias.	500
Limonoides	Rutáceas, Meliáceas y Simarubáceas.	100
Cucurbitacinas	Cucurbitáceas.	50
Cardelónidos	Apocináceas, Asclepiadáceas y Escrofuliáceas.	150
Carotenoides	Universales en hojas, frecuentes en flor y fruto.	350
<b>Fenoles</b>		
Fenoles simples	Universales en hojas, frecuentes en otros tejidos.	200
Flavonoides	Universales en angiospermas, gimnospermas y helechos.	4000
Quinonas	Especial en Ramnaceae.	500
<b>Otros:</b>		
Poliacetilenos	En compuestas y umbelíferas	650

La biosíntesis de compuestos fenólicos puede verse estimulada por diferentes condiciones ambientales como son estrés hídrico, temperatura y radiación ultravioleta. En plantas expuestas a luz ultravioleta B (LVB) se produce un aumento del 20% en compuestos fenólicos, sobre todo flavonoides. Las plantas pueden experimentar de manera simultánea diferentes tipos de estrés, pudiendo responder de una forma aditiva, sinérgica o antagonista. Los resultados revelan que la respuesta de la planta a condiciones de estrés múltiples son diferentes a las que se observan cuando el estrés es impuesto por separado. Por ejemplo, el contenido de fenoles aumenta un 19, 58 y 63% en plantas con estrés hídrico, radiación ultravioleta y combinación de los dos respectivamente (Cen y Bornman, 1993; Balakumar y col., 1993). En *C. ladanifer* la inducción de flavonoides agliconas depende de la luz ultravioleta así como del contenido de agua en hojas, siendo la suma de estos factores especialmente relevante en su producción total (Chaves, 1994; Chaves y col., 1997).

Las funciones fisiológicas de estos compuestos son aún objeto de estudio, aunque se ha demostrado que están implicados en la inhibición de enzimas específicas, que actúan como agentes antioxidantes y que pueden ser reguladores del crecimiento y desarrollo de la planta (Brederode y col., 1982; Brederode y Kooten, 1983; Takahama, 1988).

En los últimos años se han realizado estudios sobre la compleja mezcla de compuestos derivados del metabolismo que contienen los diferentes órganos de la mayoría de las especies de plantas. El estudio presenta un patrón característico de fuerte diversidad estructural, organizada sobre una base de funcionamiento de secuencias biogénicas y una fuerte sensibilidad a los efectos selectivos del medio. Esta mezcla puede variar cuantitativamente de un órgano a otro con la edad de la planta, estación y condiciones de crecimiento (Siegelman, 1964; Harbone, 1967).

En *Cistus ladanifer* los ocho flavonoides agliconas identificados por Chaves (1994) muestran variaciones cuantitativas dependientes de la estación, estando la síntesis inducida por factores externos, especialmente durante la estación estival. Este aumento cuantitativo es provocado por el estrés hídrico y la luz ultravioleta, mostrando estos factores un efecto sinérgico en la inducción de los flavonoides constituyentes del exudado (Chaves, 1994; Chaves y col., 1997). Estos flavonoides muestran también variaciones cualitativas, cambiando la contribución de cada uno de ellos desde primavera a verano. Existe una bajada de apigeninas (flavonas) durante el verano, especialmente la apigenina y la 4'-*O*-metilapigenina, potenciándose la síntesis de los kampferoles (flavonoles) que en particular está desplazada hacia el 3,7-di-*O*-metilkampferol. Esta variación cualitativa está inducida, igualmente por factores

climáticos, así el estrés hídrico determina la bajada de apigeninas durante el verano y las altas temperaturas provocan un desplazamiento hacia los flavonoides metilados en la posición 7 y especialmente a 3,7-di-*O*-metilkampferol (Chaves y col., 1997).

En *Cistus ladanifer* una de las funciones que pueden desempeñar los flavonoides del exudado en las hojas es la de actuar como filtro de luz ultravioleta, para evitar los daños celulares que causen esta radiación. Por otra parte, pueden actuar como agentes alelopáticos, inhibiendo la germinación y desarrollo de plántulas herbáceas que compiten con *C. ladanifer* por el mismo espacio, en general suelos pobres en nutrientes, lo que ofrece claras ventajas al facilitar la colonización para esta especie (Chaves, 1994; Chaves y Escudero, 1997).

#### **I.4.- FUNCIONES ECOLÓGICAS DE COMPUESTOS DERIVADOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO.**

Los compuestos derivados del metabolismo secundario pueden ser secretados dentro de las células, en vacuolas, o excretados extracelularmente como resinas o material de la pared celular. Incluyen compuestos venenosos donde la concentración puede reducir la digestibilidad de la planta y la palatabilidad a los herbívoros (Lindroth y Batzli, 1984; Baas, 1989). Los que reducen la digestibilidad son en su mayoría de naturaleza fenólica, predominantemente taninos (Gross, 1981). Las plantas producen un gran número de compuestos que tienen propiedad antimicrobiana y entre estos compuestos se encuentran diferentes flavonoides (Grayer y Harborne, 1994). Además se conoce que semillas de legumbres tratadas con metilisoflavonoides pueden reducir el nivel de infección por *Aspergillus* spp., y que varios tipos de flavonoides tienen actividad fungicida sobre cuatro hongos que infectan grano almacenado (Weidenborner y col., 1990, 1992; Weidenborner y Jha, 1993). Estudios recientes muestran que dos flavonoides de *Artemisia giraldii* presentan actividad antibiótica contra cinco especies de bacterias y dos de hongos (Zheng y col., 1996). También, estos compuestos pueden estar involucrados en la resistencia a virus, por ejemplo metoxiflavonas y metoxiflavonoles confieren a la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) resistencia frente al virus del mosaico (French y col., 1991). Otra función de los flavonoides, es la de actuar como venenos para insectos, larvas de lepidopteros como *Spodoptera littoralis* y *Spodoptera exempta* son sensibles a varios flavonoides y otros metabolitos secundarios (Simmonds y col., 1990; Pandji y col., 1993).

Todos estos estudios demuestran que los compuestos derivados de metabolitos secundarios producidos por plantas pueden ser de una gran importancia para proteger a la planta contra el ataque de microorganismos, animales o aumentar la disponibilidad de una especie para competir con otras en un hábitat dado (Bell, 1980). La función de los flavonoides está indudablemente relacionada con su estructura química, pero la relación estructura-actividad no está muy clara. Se les han asignado funciones ecológicas como

agentes tóxicos para la protección contra herbívoros, la acumulación de flavonoides en la epidermis puede alterar las propiedades ópticas de la hoja y reducir el daño de la luz ultravioleta en funciones fisiológicas actuar, evitar ataque de patógenos y producir inhibición en el crecimiento de otras plantas, actuando como agentes alelopáticos y como agentes antioxidantes. (Chou y Kou, 1986; Harborne, 1988a; Baas, 1989; Panagopoulos y col., 1992; Ziska y col., 1993).

#### **I.4.1- Función alelopática.**

Una definición clásica de alelopatía es la dada por Rice, 1984: “*es la interacción química planta-planta, incluyendo dentro del término planta a microorganismos y dentro del término interacción tanto efecto estimulador como inhibidor*”. más concretamente la alelopatía se considera como un mecanismo de competencia entre plantas, basada en la interacción entre individuos mediante la secreción de compuestos químicos, es decir, la producción de *aleloquímicos* por una planta donadora hacia una planta receptora. se denominan *aleloquímicos* a estos metabolitos secundarios que son secretados por una planta y pueden interaccionar con otra planta y/o con los componentes bióticos y abióticos del sustrato produciendo un efecto negativo o positivo sobre ella. estos compuestos alelopáticos son liberados al medio mediante volatilización, descomposición de residuos o secreción en diferentes partes de la planta como hojas, tallos, raíces y flores (Rice, 1984; Putnam y Tang, 1986; Waller, 1987; Inderjit y Dakshini, 1995).

Los primeros estudios sobre alelopatía se han dirigido a identificar y cuantificar los diferentes compuestos que pueden actuar como agentes alelopáticos. Se ha demostrado que el extracto acuoso obtenido de plantas como *Polygonum orientale*, *Erica vagans*, *Erica australis*, *Calluna vulgaris*, *Daboecia cantabrica*, *Vaccinium myrtillus*, *Pinus densiflora*, *Pilocarpus goudotianus* y *Echinacea angustifolia*, ricos en compuestos fenólicos, inhiben la germinación de semillas y de cotiledones de diferentes

especies de plantas ensayadas (Carballeira, 1980; Datta y Chatterjee, 1980; Ballester y col., 1982; Jäderlund y col., 1996; Viles y Reese, 1996).

Se ha llegado a aislar e identificar diferentes *aleloquímicos* como bergapteno, xantotosin y xantiletin de *Pilocarpus goudotianus* (Macías y col., 1993), 2- clorofenol y salicilaldehído de *Typha domingensis* (Gallardo y col., 1998), los ácidos benzoico, salicílico, cínamico, p-hidroxibenzoico, gentísico, protocatechuico, siríngico, p-cumárico, gálico, felúrico, cafeico y vanílico de *Pinus densiflora* (Kil y Yim, 1983) y apigenina-7-O-glucósido de la planta acuática *Ceratophyllum demersum* (Bankova y col., 1995).

En los diferentes ensayos realizados para cuantificar el poder alelopático de estos compuestos se ha encontrado que los compuestos con mayor capacidad de inhibición de la germinación son furanocumarinas, cumarinas simples, piranocumarinas, ácido cinámico y sus derivados, catecol, hidroxiacetofenonas, flavonoles y proantocianidinas (Datta y Chatterjee, 1980; Ballester y col., 1982; Kil y Yim, 1983; Odén y col., 1992; Nilsson y col., 1993; Pellisier, 1993; Macías y col., 1993; Li y col., 1993; Viles y Reese, 1996).

Aunque el modo de acción de los compuestos fenólicos en el mecanismo de alelopatía no se conoce, sí se ha demostrado que los flavonoides pueden interferir en la formación del adenosín trifosfato (ATP) en la mitocondria (Stenlid, 1970, 1976) y pueden inhibir o interaccionar con el modo de acción de las hormonas de otras plantas como las auxinas (Jacobs y Rubery, 1988; Brunn y col., 1992). los compuestos fenólicos pueden bajar la disponibilidad de ciertos nutrientes e influir en las características del suelo como pH y materia orgánica (Rice, 1984; Appel, 1993; Inderjit, 1996). la adición de compuestos fenólicos como los ácidos protocateico, p-cumárico, p-hidroxibenzoico y felúrico tienen efectos como son la reducción del contenido de nitrógeno, fosfato y materia orgánica . esto podría deberse a diferentes procesos como absorción, alteración microbiana de compuestos fenólicos y mineralización microbiana (Inderjit y Mallik, 1997). estas condiciones alteradas de los suelos pueden afectar negativamente el crecimiento de las plantas (Black, 1973).

Actualmente es necesario profundizar en el conocimiento de la alelopatía. No es suficiente que los diferentes órganos de una planta presenten compuestos con actividad alelopática, sino que éstos tienen que pasar al suelo y estar presentes en él. El estudio de la permanencia en este medio es de vital importancia.

Aunque los compuestos fenólicos pueden variar cuantitativa y cualitativamente en los órganos de las plantas que los secretan dependiendo de la estación, se podría pensar que estos compuestos se van acumulando en el suelo; y sin embargo se ha demostrado que la concentración, de estos, en el suelo varía también a lo largo del año. Esta variación podría ser debido a degradación química, retención en el suelo o absorción por las semillas y raíces (Dao, 1987; Cheng, 1995). Un ejemplo de ello es *Pulchea lanceolata*, en esta especie la mayor cantidad de compuestos fenólicos en los suelos asociados a esta especie, se produce durante el mes de Julio coincidiendo con la mayor concentración en sus hojas (Inderjit, 1998).

Estos *aleloquímicos* pueden influir sobre los componentes bióticos y abióticos del suelo y estos componentes a su vez son los responsables de su degradación y transformación en el suelo. Dalton y col. (1983), Inderjit y Daskshini (1994) muestran que los minerales del suelo y otros factores pueden influir cuantitativa y cualitativamente en la disponibilidad de los compuestos alelopáticos. En estudios realizados con suelos asociados a *Pluchea lanceolata*, se han aislado e identificado tres potentes *aleloquímicos*: formononetina-7-*O*-glucósido, hesperitina-7-rutinosido y taxifolina-3-arabinosa. Estos suelos asociados son salinos-alcálicos y el formononetina-7-*O*-glucósido cuando se encuentra en este medio con estas características no se degrada (Inderjit y Dakshini, 1991). Por el contrario, en suelos asociados al trébol (*Trifolium polyphyllum*), que también secreta este compuesto alelopático, solo se observaban varios ácidos fenólicos que son productos de degradación de este flavonoide (Dewick, 1988).

Por ello es necesario profundizar en el conocimiento de la biodisponibilidad de estos compuestos en el medio natural, y para ello es esencial conocer y profundizar, en aspectos como los siguientes:

- Cómo los compuestos que se identifican como *aleloquímicos* se incorporan al suelo y permanecen en él.
- Si su inalterabilidad depende de las características del suelo.
- Su modo de acción en este medio.
- Qué factores ambientales pueden afectar la actividad de estos compuestos.
- Y si los efectos alelopáticos observados se deben a su efecto directo, a sus productos de degradación y/o a la alteración de las condiciones del suelo.

#### **I.4.2- Función Antiherbívoro.**

A lo largo de la evolución, en las plantas se han desarrollado toda suerte de defensas para tratar de mantener el equilibrio en la interacción planta-herbívoro. hay evidencia de que numerosos rasgos de las plantas reduce el crecimiento y supervivencia de herbívoros. estos rasgos pueden ser considerados como *resistencia* cuando representan un rasgo exclusivamente ecológico, y como *defensa* cuando implica una respuesta evolutiva. una posible clasificación de resistencia a los herbívoros es dividirla en mecanismos de tolerancia y evitarlos. el primero se refiere a la capacidad de las plantas para recuperarse después del ataque del herbívoro; y evitarlos puede dividirse, a su vez, en tres mecanismos: probabilidad de ser comida, barreras físicas y calidad de la planta como alimento (Zamora y col., 1999).

Como primer paso del herbivorismo, la planta debe ser localizada por el herbívoro. hay algunos rasgos que reducen la probabilidad de la planta a ser descubierta, por ejemplo, quedando imperceptible dentro de un hábitat dado, en términos morfológicos y de abundancia, ocupando sitios libres de enemigos, imitando otra planta

bien defendida, careciendo totalmente de atracción química, no coincidiendo los ciclos de vida de planta y herbívoro; las plantas producen tejidos comestibles en el periodo con menos probabilidad de coincidir con la presencia o alimentación del herbívoro.

Una vez encontrada la planta, los herbívoros deben superar otras barreras. las plantas tienen innumerables estructuras para repeler al herbívoro. esto incluye escamas, púas y espinas, que son particularmente efectivos frente a mamíferos (Cooper y Owen-Smith, 1986; Grubb, 1992) y tricomas, hojas peludas y estructuras similares para disuadir a los invertebrados (Bernays y Chapman, 1994). en la misma dirección, algunas plantas tienen glándulas que secretan un adhesivo para atrapar pequeños insectos (Turner, 1994).

En la mayoría de los hábitats las plantas son abundantes, por lo que en principio la comida no supone un problema para los herbívoros. pero la pared celular de la mayoría de las plantas está constituida principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, y la mayoría de los animales herbívoros no pueden usar directamente este recurso. los herbívoros son así limitados, no por la energía disponible, sino por la calidad nutricional de los tejidos vegetales (White, 1993). además la materia vegetal, comparada con la animal, presenta un contenido alto en carbono y bajo en otros elementos esenciales como n, p y s (Sterners y Hessen, 1994), constituyendo una limitación importante en la calidad del alimento. otros compuestos que reducen la calidad de los alimentos vegetales son las toxinas. estos compuestos, esgrimen su influencia con su mera presencia, actúan inmediatamente y a menudo conlleva a la muerte del herbívoro.

Estos últimos compuestos representan otro mecanismo contra los herbívoros como son las defensas químicas. estas defensas químicas es uno de los mecanismos más importantes y extendido para evitar el ataque de los herbívoros (Berenbaum, 1995). son derivados del metabolismo secundario y actúan como compuestos tóxicos, tales como alcaloides, cumarinas, glucosinolatos, glucósidos, terpenos, etc. y como compuestos que repelen y disminuyen la digestibilidad como los taninos.

La actividad alimenticia comienza con el primer bocado, seguido de tragar y continua con la digestión. esto sugiere que se denomine como supresores a aquellos compuestos que impiden la actividad de morder, y disuasorios a aquellos que impiden que el herbívoro vuelva a comer. como frecuentemente es desconocida qué fase de la alimentación es interrumpida, algunos autores usan antialimentación y disuasorios de alimentación sinónimamente para sustancias que cuando contacta con el herbívoro impide o interrumpe la actividad alimenticia (Arinafril y Suwandi, 2001).

Como compuestos disuasorios de comensales pueden aparecer estructuras tales como los terpenoides, alcaloides y fenoles. dentro de estos últimos se encuentra la barrera más importante que tienen las angiospermas contra su ingestión por herbívoros. estas sustancias son los taninos, que aparecen en concentraciones altas en hojas de plantas leñosas. los taninos se unen a proteínas, frecuentemente de forma irreversible, impidiendo que las proteínas sean atacadas por la tripsina y otras enzimas digestivas, provocando la pérdida de valor nutritivo de las hojas (Feeny, 1970).

En las plantas existe una enorme diversidad bioquímica de compuestos secundarios, fruto, tal vez, de su imposibilidad de huida frente a las agresiones (Harborne, 1993; Cheeke, 1995). ahora bien, debido al elevado coste energético que implica su síntesis, las plantas encauzan su metabolismo hacia un tipo u otro de compuesto secundario dependiendo de los recursos disponibles (Bryant y col., 1992). en general, frente a condiciones adversas y limitantes, como las que se dan en ecosistemas mediterráneos, las plantas tienden a aumentar sus defensas, sobre todo de tipo cualitativo (alcaloides, glucósidos cianogénicos, etc.), ya que, en estos casos, les resulta mucho más difícil regenerar los tejidos dañados por los herbívoros (Rhoades, 1979; Jhonson y col., 1985; Lundberg y Palo, 1993). lo que implica que estos compuestos actúen como tóxicos.

Una característica importante en la estrategia de defensa de las plantas es la distribución variable de los compuestos secundarios en los diferentes tejidos vegetales, así como su redistribución según avanza el desarrollo fenológico (Price y col., 1979; Johnson y col., 1985; Makkar y col., 1988, 1991). las yemas en crecimiento de arbustos, las hojas jóvenes, los órganos reproductores y de dispersión y, en general, todas las

partes en crecimiento anual, muestran una mayor concentración de compuestos secundarios, o reactividad de éstos, que los tejidos viejos (Rhoades, 1979).

Cientos de miles de fenoles, alcaloides, terpenoides, iridoides, esteroides y otros compuestos químicos de plantas han sido el objetivo de considerables estudios (Rosenthal y Berenbaum, 1991). algunos se han aislado, y de éstos, muchos son claramente tóxicos en general y sirven como defensa para la planta frente a herbívoros. pero estos compuestos no afectan por igual a todos los herbívoros. un ejemplo de ello, son los glucósidos cianogénicos, que aunque no presentan una eficacia universal y no todas las plantas cianogénicas liberan la suficiente cantidad para ser consideradas tóxicas, éstos compuestos forman parte del amplio espectro de compuestos tóxicos y desagradables para los herbívoros (Roslyn e Ian, 2002).

Aunque, como sustancias verdaderamente tóxicas están caracterizados los alcaloides como la nicotina, piretrinas y rotenoides (Harborne, 1985; Krischik y col., 1991), también se ha mostrado que flavonoides, principalmente glucósidos de flavonoles que incluyen la rutina, quercitrina, isoquercitrina y quercetina, resultan tóxicos o inhiben el crecimiento de determinados insectos (Shaver y Lukefahr, 1969; Isman y Duffey, 1982; Abon-Zaid y col., 1993; Simmonds, 2003). siendo una de las funciones ecológicas establecidas para los flavonoides la protección de la hoja ante los herbívoros (Rhoades y Cates, 1976; Elliger y col., 1980; Abou-Zaid y col., 1993; Harborne y Grayer, 1994; Simmonds, 2001).

Cuando los insectos se posan o caminan sobre las hojas, podrían encontrar flavonoides agliconas que se acumulan sobre la superficie. una de las funciones de estos flavonoides agliconas sería proteger a las hojas frente a los herbívoros. por ejemplo, la resina de las hojas del matorral *mimulus aurantiacus* cortis constituye un 30% del peso seco de la hoja (Hare, 2002). esta resina contiene flavonoides que resultan tóxicos para *euphdryas chalcona* (lepidoptera, nymphalidae) uno de los principales herbívoros de este matorral (Lincoln, 1985; Lincoln y Walla, 1986).

Por otro lado, un grupo importante de compuestos flavonoides en las plantas son los estrógenos vegetales o fitoestrógenos, que se encuentran en forma de glucósidos, y

cuya capacidad de modificar los procesos reproductivos proviene de su semejanza con el núcleo esteroídico de las hormonas femeninas (Liener, 1980). una prolongada exposición a pastos estrogénicos puede conducir a infertilidad (Adams, 1995).

## **I.5.- Ca<sup>2+</sup>-ATPasa DEL RETICULO SARCOPLÁSMICO.**

El retículo sarcoplásmico (RS) es el orgánulo subcelular encargado de controlar la concentración del calcio en el citosol de la célula muscular, y está directamente implicado en el control de la relajación y contracción muscular, ya que mantiene bajos los niveles de calcio durante el reposo y restablece la concentración de Ca<sup>2+</sup> a niveles basales tras la excitación, mediante la transformación de energía química en osmótica, por lo que presenta un papel preeminente en la relajación muscular (Hasselbach y Oetliker, 1983).

A principios de los años sesenta, Hasselbach y Makinose (1961) y Ebashi y Lipmann (1962), mostraron que el retículo endoplasmático de músculo esquelético de conejo podía acumular calcio. Para ello describieron un protocolo para la preparación de vesículas de retículo sarcoplásmico (RS), identificando a la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa como la proteína responsable del transporte de Ca<sup>2+</sup>.

### **1.5.1.- Datos estructurales de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa del retículo sarcoplásmico.**

La estructura primaria de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de RS ha sido puesta de manifiesto a partir de la secuenciación del ADN que codifica a la proteína (MacLennan y col., 1985) presentando numerosas analogías con otras ATPasa de la clase P (Serrano y col., 1986). La Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de RS, consta de una única cadena polipeptídica de 1001 aminoácidos. Basándose en la hidrofobidad de los aminoácidos, se predice la existencia de diez hélices transmembranales, que podrían atravesar la membrana como 5 horquillas, quedando tanto el extremo amino terminal, como el carboxilo terminal en la cara citosólica de la membrana (Brandl y col., 1986), (Figura 1).



La obtención de información estructural directa de la proteína se ha visto dificultada por el hecho de que los cristales obtenidos de la misma son utilizables sólo para microscopía electrónica. Del estudio de estos cristales está claro que la proteína está constituida por varios dominios: una cabeza globular citoplasmática conectada a una región transmembranal con 10  $\alpha$ -hélices por un corto segmento denominado región “stalk”.

En estudios recientes se ha obtenido la estructura tridimensional de la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa con una resolución de 2,6Å (Toyoshima y col., 2000), (Figura 2), lo que prácticamente resuelve las dudas en cuanto a la estructura de la proteína. Los autores han sido capaces de identificar 994 residuos aminoacídicos en los mapas de densidad electrónica obtenidos.

Así en el dominio citoplasmático se pueden diferenciar tres dominios bien diferenciados, a los que se les denomina:

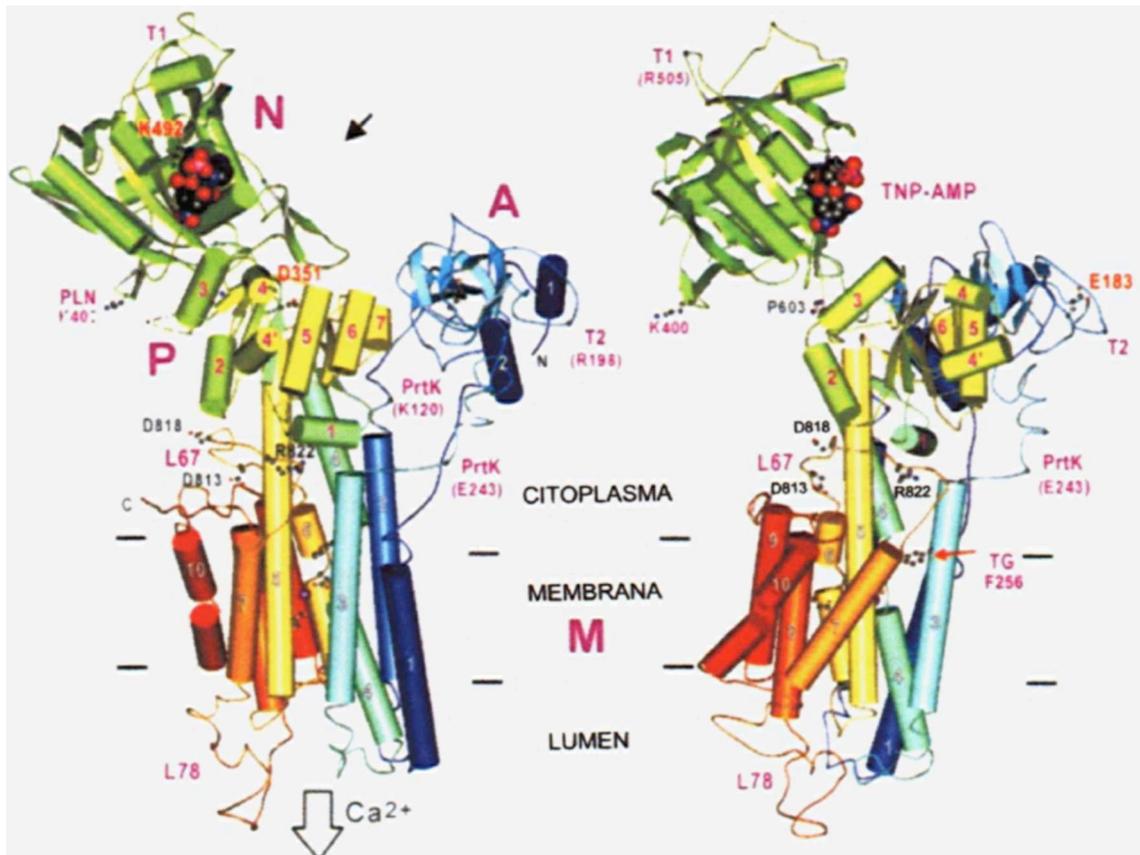
-**P** o dominio de fosforilación donde se encuentra el residuo de ácido aspártico que se desfosforila ( $\text{Asp}^{351}$ ). Este dominio se encuentra formado por dos partes ampliamente separadas en la secuencias. Está formado por siete láminas  $\beta$  paralelas asociadas a ocho hélices  $\alpha$  cortas.

-**N** o dominio de unión de nucleótidos que constituye el sitio catalítico. Es el de mayor tamaño (27kDa aproximadamente).

-**A** o dominio impulsor o de transducción, conocido como dominio  $\beta$ . Está involucrado en la transmisión de cambios conformacionales importantes. Se conecta a la región transmembranal por grandes bucles.

Según este modelo los dos sitios de unión al calcio están próximos a las cuatro hélices  $\alpha$  transmembranales de la región “stalk”. Así, las alteraciones en dichas hélices podrían desencadenar modificaciones en los sitios de unión de calcio y las alteraciones en los movimientos de iones desde el citosol al espacio luminal. Ese estudio clarifica la cuestión de cómo el sitio de unión de calcio (en el dominio membranar) y el de fosforilación del residuo de ácido aspártico (en el dominio citosólico) interaccionan a

esas largas distancias (40-50Å de separación entre ellos) (Aravind y col., 1998). Ese interrogante se responde por la presencia de estas hélices transmembranales, llamadas “stalk”, capaces de transmitir los pequeños cambio conformacionales que se producen tras la autofosforilación de la enzima (MacLennan y Green, 2000).



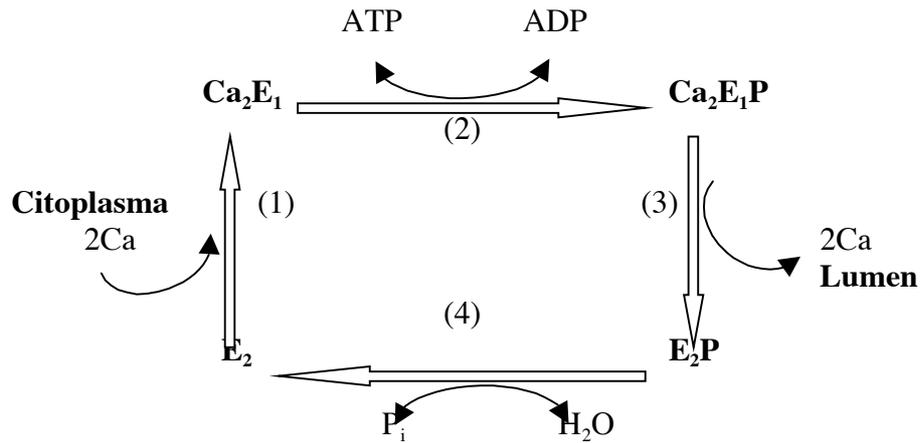
**Figura 2:** Estructura tridimensional de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa con una resolución de 2,6Å (Toyoshima y col., 2000).

### **1.5.2.-Mecanismo catalítico de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo sarcoplásmico de músculo esquelético.**

La hidrólisis de ATP por vesículas de RS permite el transporte activo de dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  por molécula de ATP hidrolizada (Hasselbach, 1964). El  $\text{Ca}^{2+}$  se acumula en el interior de las vesículas hasta alcanzar una concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$  libre lo suficientemente elevada como para inhibir a la enzima (Scarpa y col., 1972), entonces la ATPasa actúa a una velocidad estacionaria igual a la velocidad de salida pasiva de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana.

Una propiedad característica de esta enzima es que en condiciones fisiológicas forma un derivado fosforilado covalente por reacción con el ATP cuando el fosfato terminal del ATP reacciona con un aspártico de la enzima (Makinose, 1969). Esta clase de proteína entra dentro de la categoría de ATPasa de tipo P, según la clasificación sugerida por Pedersen y Carafoli (1987).

En cuanto al mecanismo catalítico de la enzima se han propuesto varios modelos, de los cuales el propuesto por De Meis y Vianna (1979) describe cuatro intermediarios. Según este modelo, (Figura 3), la unión de dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  sobre los sitios de alta afinidad situados sobre la parte externa de la enzima (lado citoplasmático) conlleva a la saturación de estos sitios y a la activación de la ATPasa. La unión de ATP y la transferencia del fosfato terminal a la enzima, conduce a la formación de un derivado fosforilado covalente, el ADP es entonces liberado en el citoplasma. En esta etapa los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son “ocluidos”, es decir inaccesibles desde los dos lados de la proteína, (Klemens y col., 1986). La translocación de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  hacia los sitios internos de baja afinidad conduce a la liberación de estos iones al interior del retículo. El derivado fosforilado es entonces hidrolizado y el fosfato liberado en el citoplasma.



**Figura 3:** Mecanismo catalítico simplificado de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de retículo sarcoplásmico.

Existe una fuerte interdependencia entre los sitios de unión de Ca<sup>2+</sup> y el sitio catalítico. En particular, la ocupación de los sitios de Ca<sup>2+</sup> de alta afinidad (etapa 1) permite la fosforilación por el ATP, mientras que la no ocupación de estos sitios permite la fosforilación por el fosfato inorgánico (etapa 4), primera etapa en el funcionamiento inverso del sistema. Por otra parte, la fosforilación por el ATP (etapa 2) produce la oclusión del Ca<sup>2+</sup>. Se habla de dos estados conformacionales principales de la ATPasa E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>. Estos dos estados conformacionales presentan reactividad diferente hacia el sustrato. La forma E<sub>2</sub> puede unir ATP pero no origina derivados fosforilado covalentes (Henaó y col., 1991). El cambio conformacional entre E<sub>1</sub>-P y E<sub>2</sub>-P podría, en esta hipótesis conformacional, traducirse en una menor afinidad de los sitios de transporte hacia el ion calcio, provocando la salida del mismo (etapa 3).

El esquema anterior es el más simple para describir el transporte de Ca<sup>2+</sup>. En el esquema no se pone de manifiesto el papel de los cationes, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> y H<sup>+</sup> los cuales intervienen en el funcionamiento de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, como se ha puesto de manifiesto en numerosas pruebas experimentales, en particular ha sido mostrado que el K<sup>+</sup> estimula la actividad ATPasa y la acumulación de Ca<sup>2+</sup> (Shighekawa y Pearl, 1976).

Igualmente la presencia mayoritaria de cationes divalentes como Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup>, modifica completamente el funcionamiento del ciclo, llegando hasta la inhibición. Los diferentes complejos formados por ATP (Mg<sup>2+</sup>-ATP, Ca<sup>2+</sup>-ATP, Co<sup>2+</sup>-ATP y Mn<sup>2+</sup>-ATP) inducen velocidades de formación del derivado fosforilado

covalente y de actividad ATPasa que son muy diferentes (Yamada e Ikemoto, 1980; Mintz y col., 1990; Cuenda y col., 1990).

### **I.5.3.-Modulación de la actividad $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo sarcoplásmico por flavonoides.**

Solo hay un trabajo publicado sobre el mecanismo molecular de acción de los flavonoides sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico. Shoshan y MacLennan (1981), muestran que quercetina en vesículas de RS o en la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa purificada inhibe las reacciones hacia adelante y reversa del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  incluyendo transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP, síntesis de ATP acoplado al eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y el intercambio ATP- $\text{P}_i$ . Además, quercetina inhibía la velocidad de intercambio ATP-ADP y la formación del estado  $\text{E}_2\text{-P}$ .

Estos autores en sus ensayos para descubrir el mecanismo por el que este flavonoide inhibe el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , observaron que quercetina inhibía de una forma no competitiva la unión de nucleótidos. Así, la unión de ATP no es bloqueada completamente por quercetina puesto que no inhibía la formación de  $\text{E}_1\text{-P}$ , e incluso aumentaba su concentración mientras el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  era casi completamente inhibido al igual que la formación de  $\text{E}_2\text{-P}$ . Este hecho puede ser explicado de dos formas; que quercetina estabilice la conformación de la enzima  $\text{E}_1\text{-P}$  sin que ésta sea capaz de aceptar grupos fosforilados del ATP y en consecuencia disminuye el nivel de los otros estados conformacionales, o que se forme un nuevo estado intermediario  $\text{E}_Q\text{-P}$  y este grupo fosforilado no pueda ser liberado.

Estos autores concluyen, por tanto, que el mayor efecto de quercetina es estabilizar la conformación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -Enzima que es capaz de aceptar un grupo fosforil del ATP, pero éste no puede energizar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de las vesículas ni puede ser donado de nuevo al ADP.

## **OBJETIVOS**

---

En estudios previos realizados en el Área de Ecología de la Uex sobre *Cistus ladanifer* se ha demostrado que en esta especie, las hojas y tallos fotosintéticos segregan un exudado muy abundante, sobre todo, durante la estación estival. Este exudado presenta actividad alelopática sobre especies como *Cynodon dactylon* y *Rumex crispus*, cuya germinación es claramente inhibida, y en especies como *Medicago polymorpha* y *Lolium rigidum*, que retrasa la germinación e inhibe el tamaño de raíces y cotiledones (Chaves y Escudero, 1997). También se ha demostrado que este exudado es rico en ácidos fenólicos, compuestos derivados del metabolismo secundario, siendo los compuestos mayoritarios los siguientes flavonoides: apigenina, 3-*O*-metilkampferol, 4'-*O*-metilapigenina, 7-*O*-metilapigenina, 3,4'-di-*O*-metilkampferol y 3,7-di-*O*-metilkampferol. Es de destacar que estos flavonoides presentan una variación cualitativa y cuantitativa en hojas y tallos a lo largo del año (Chaves, 1994; Chaves y col., 1993; 1997).

El objetivo principal de este estudio es contribuir al conocimiento de las funciones que pueden desempeñar los compuestos derivados del metabolismo secundario y en concreto estudiar las posibles funciones ecológicas de estos compuestos en *Cistus ladanifer*. De las múltiples funciones atribuidas a estos compuestos nos hemos centrado en la contribución de los mismos en la interacción planta-planta y planta-animal, o lo que es lo mismo profundizar en la actividad alelopática de *C. ladanifer* y conocer si los flavonoides que constituyen el exudado de esta especie presentan actividad frente a los herbívoros.

Para ello, se han planteado los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Estudio del potencial alelopático de *Cistus ladanifer*:
  - 1.1.- Determinar qué flavonoides de los pertenecientes al exudado de *C. ladanifer* presentan actividad alelopática.
  - 1.2.- Identificación de otros compuestos que constituyen el exudado de *C. ladanifer*.
    - 1.2.1.- Determinación de la actividad alelopática de cada uno ellos.

1.2.2.- Cuantificación de la actividad alelopática derivada de la interacción de estos compuestos.

1.3.- Determinar la actividad alelopática de los suelos asociados a *C. ladanifer*.

1.3.1.- Cuantificar la actividad alelopática en este medio.

1.3.2.- Comprobar si los *aleloquímicos* identificados en el exudado pasan al suelo.

2.- Estudiar la función antiherbívoro de flavonoides contenidos en el exudado de *Cistus ladanifer* mediante la posible modulación de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del RS de músculo esquelético de conejo por su interacción con los flavonoides contenidos en el exudado de *C. ladanifer* y su efecto sobre la capacidad máxima de acumulación del ion  $\text{Ca}^{2+}$  por el RS.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### **III.1.- SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.**

Previamente a la separación cromatográfica, se extrajo el exudado de las muestras recogidas como se indica a continuación.

#### **III.1.1- Recogida de muestras.**

Se recogieron muestras de jaras situadas cercanas a Badajoz, en la finca “El Hatillo” en Cheles. Se recolectaron hojas jóvenes por su mayor contenido de exudado, en primavera y verano. Estas dos estaciones fueron elegidas por la relación cualitativa estacional que presenta la secreción de flavonoides. Durante primavera aumenta la síntesis de apigeninas y durante el verano se potencia la de kampferoles (Chaves y col., 1993).

#### **III.1.2.- Extracción del exudado.**

Las hojas recogidas fueron introducidas varias veces en cloroformo (1g hojas/2ml cloroformo) para asegurar la completa extracción de estos compuestos. El cloroformo se evapora y el extracto resultante se resuspende en metanol.

Se congela a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 12h para que precipiten las ceras que se retiraran mediante centrifugación (4500 x g durante 5 minutos).

### III.1.3.- Separación cromatográfica.

Una vez eliminadas las ceras, se evapora el metanol. El extracto resultante se hace pasar por una columna de 25cm y 1,5cm de diámetro con 12,5g de Sephadex LH-20 hidratado con metanol durante 24 horas. Utilizando metanol como eluyente, se recoge el eluido en diferentes fracciones. Con este procedimiento se consigue separar los flavonoides del resto de compuestos que componen el extracto (Markham, 1982; Vogth y Gülz, 1991).

La composición de cada una de las fracciones recogidas se analiza por HPLC. Con esta técnica se consigue un alto nivel de resolución y sensibilidad para analizar los flavonoides de una mezcla, aunque es el aspecto cuantitativo del análisis lo que establece la mayor diferencia con otros métodos cromatográficos (Markham, 1982; Hostettmann y col., 1984; Vogt y Gülz, 1991).

Para cromatografiar compuestos como flavonas, flavonoles, dihidroflavonoides, catequinas, antocianidinas, glicósidos de flavonoides, etc., los tipos de columnas más utilizadas son los de fases reversas C-8 y C-18, con solventes tales como agua/metanol, agua/metanol/ácido acético, agua/acetonitrilo, en varias proporciones.

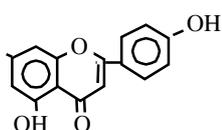
Se utilizó una columna analítica de fase reversa C-18 Spherisorb 4,6x150mm y una fase móvil de agua/metanol/tetrahidrofurano (56:16:28) a una velocidad de flujo de 0,75ml/min. Con estas condiciones se obtiene un cromatograma con una resolución óptima para la identificación de los ocho flavonoides presentes en el exudado de *C. ladanifer* (Chaves, 1994; Chaves y col., 1993, 1997).

Se inyectaron 20µl de solución del extracto disuelto en metanol de cada una de las fracciones separadas por columna de Sephadex. El extracto se separó en tres fracciones diferentes:

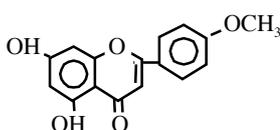
- Fracción 1 corresponde a un grupo de compuestos que no absorben en el rango ultravioleta-visible, no son detectados por HPLC. Según Vogth y Gülz, (1991) puede corresponder a terpenos e hidrocarburos.
- Fracción 2 a un grupo de compuestos con longitud de onda comprendidas entre 230-290nm.
- Fracción 3 corresponde a los flavonoides.

### III.2.- EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES CONTENIDOS EN EL LÁDANO DE LAS HOJAS DE *Cistus ladanifer*.

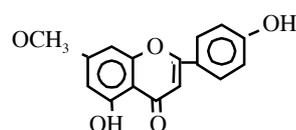
Los flavonoides estudiados presentan las siguientes fórmulas químicas:



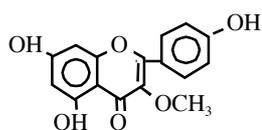
**Apigenina**



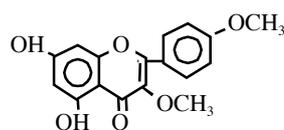
**4'-O-Metilapigenina**



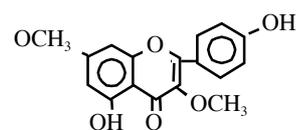
**7-O-Metilapigenina**



**3-O-Metilkampferol**



**3,4'-Di-O-metilkampferol**



**3,7-Di-O-metilkampferol**

### **III.2.1.- Extracción y purificación.**

Debido a que los flavonoides identificados en el exudado de *C. ladanifer*, no están disponibles comercialmente, para comprobar o estudiar la actividad de éstos, fue necesario extraerlos y purificarlos directamente del exudado de las hojas.

Una vez detectada por HPLC la fracción en la que han eluido los flavonoides, se toma la 3<sup>a</sup> de ellas, se evapora el metanol y el precipitado se resuspende en tetrahidrofurano. La extracción de cada uno de los flavonoides agliconas que componen el exudado se realizó por HPLC, utilizando una columna semipreparativa C-18 (10x250mm) y un solvente de agua/metanol/tetrahidrofurano en una proporción de 40:30:30 a una velocidad de flujo de 1,75ml/min. Se recogen manualmente diferentes fracciones, constituidas cada una de ellas por un flavonoide.

Esta técnica se repite hasta obtener la cantidad necesaria de cada uno de los flavonoides para realizar los ensayos.

### **III.2.2.- Cuantificación.**

Para cuantificar los flavonoides se analizaron muestras de hojas jóvenes (hojas nacidas en el año estudiado), hojas viejas (hojas que llevan más de un año en la planta) y tallos jóvenes fotosintéticos (zona más apical del tallo que ha crecido en el año de estudio) de un diámetro comprendido entre 1,15 y 2,25mm.

Con el fin de estudiar las diferencias en la síntesis de estos compuestos entre jarales sometidos a diferentes T<sup>a</sup> y estrés hídrico, se seleccionaron 8 jarales desde el suroeste al noreste de la provincia de Badajoz (Figura 4). Estos puntos de muestreo presentaban condiciones climáticas diferentes (temperatura y precipitación). Las precipitaciones y temperaturas de cuatro de estas localidades (Cornalvo, Quintana de la Serena, Valle de la Serena y Hornachos) son de 450-550 l/m<sup>2</sup> de precipitación media

anual y 16,8°C de temperatura media anual, a este conjunto de localidades se le ha denominado Grupo I. Las otras localidades (Valle de Santa Ana, Jerez de los Caballeros, Higuera la Real y Cabeza la Vaca) poseen 15°C de temperatura media anual, 650-750 l/m<sup>2</sup> de precipitación media anual y se le ha denominado Grupo II. Estos datos son los valores medios obtenidos de analizar series de 30 años (Cabezas y Escudero, 1989). Concretamente, la Tabla 2 muestra los valores de precipitación y temperatura de cada uno de los grupos en el año de estudio.

Se pesó 1g de hojas jóvenes, de hojas viejas y de tallos. El exudado se extrajo con cloroformo, se evaporó y el precipitado se resuspendió en 4ml de metanol. Se mantuvo durante 12h a 0°C para precipitar las ceras. Las muestras se analizaron mediante HPLC con las condiciones descritas en el apartado III.1.3 de Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos se expresaron referidos al peso seco de hoja o tallo y al peso seco de exudado total.



**Figura 4:** Distribución de las poblaciones de *Cistus ladanifer* estudiadas.

- **Grupo I**
- **Grupo II**

**Tabla 2:** Precipitación total y temperaturas medias máximas y mínimas registradas en cada uno de los grupos, en el año en que fueron recogidas las muestras.

	<b>Grupo I</b>			<b>Grupo II</b>		
	<b>P. Total(mm)</b>	<b>T<sup>a</sup> máx.(°C)</b>	<b>T<sup>a</sup> mín.(°C)</b>	<b>P. Total(mm)</b>	<b>T<sup>a</sup> máx.(°C)</b>	<b>T<sup>a</sup> mín.(°C)</b>
<b>Septiembre (2001)</b>	61,1	30,2	17,3	76,8	27,8	13,8
<b>Octubre</b>	124,8	22,8	14,1	124,8	21,9	12,1
<b>Noviembre</b>	57,2	15,3	6,4	47,3	13,8	5,6
<b>Diciembre</b>	31,0	12,6	4,5	67,0	12,8	3,5
<b>Enero (2002)</b>	44,4	13,8	5,7	67,8	14,7	5,7
<b>Febrero</b>	6,4	17,1	5,8	11,8	16,0	5,5
<b>Marzo</b>	70,1	18,8	8,0	150,8	17,4	7,6
<b>Abril</b>	58,3	21,1	9,3	99,5	19,5	8,4
<b>Mayo</b>	27,6	24,9	11,1	30,3	22,4	9,7
<b>Junio</b>	5,7	32,4	16,4	6,0	30,3	14,5
<b>Julio</b>	0,0	35,3	18,6	0,0	32,6	16,8
<b>Agosto</b>	3,3	35,3	19,4	1,8	31,4	15,7

P. Total: precipitación total

T<sup>a</sup> máx.: temperatura media máxima

T<sup>a</sup> mín.: temperatura media mínima

### **III.3.- IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN 2 DEL EXUDADO DE LAS HOJAS DE *Cistus ladanifer*.**

Los compuestos pertenecientes a la segunda fracción se recogieron y se analizaron por Cromatografía de Gases en combinación con una Espectrometría de Masas en el Instituto de la Grasa de Sevilla. Esta combinación es muy eficaz para la identificación de los componentes de una mezcla. La única condición limitante, viene dada por la necesidad de que los compuestos sean lo suficientemente volátiles como para ser eluidos a través de la columna cromatográfica, bien en su forma original o mediante previa derivatización para conferirles la volatilidad necesaria (Schels y col., 1977, 1978).

Con esta técnica se llegaron a identificar once compuestos: ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido butírico, metilpropionato, ácido 3-hidroxi-butírico, ácido hidroxicinámico, ácido p-anísico, ácido cinámico, azuleno, ácido 4-hidroxi-benzoico y ácido ferúlico.

### **III.4.- ENSAYO DE GERMINACIÓN.**

Para comprobar si los compuestos que constituyen el exudado de *C. ladanifer*, tanto flavonoides como otros compuestos identificados, poseen actividad alelopática, se realizó el siguiente ensayo de germinación sobre semillas de *R. crispus*.

#### **III.4.1.- Selección de semillas.**

La especie seleccionada para realizar los ensayos de germinación fue *Rumex crispus*. Esta especie se estimó la más apropiada para este estudio por las siguientes razones (Chaves, 1994; Chaves y Escudero, 1997):

- No está presente en jarales.
- En laboratorio alcanzan un porcentaje de germinación superior al 50%.
- Se trata de una especie muy sensible a los tratamientos con el exudado de *C. ladanifer* tanto a nivel de germinación como en el desarrollo de sus plántulas.

#### **III.4.2.- Índices medidos para cuantificar el efecto alelopático.**

Generalmente hay dos tipos de procedimientos para calcular la actividad biológica de los compuestos alelopáticos:

- Midiendo la actividad biológica específica (inhibición de fotosíntesis).

- Midiendo algunos aspectos del crecimiento (germinación(%), cotiledones(%), tamaño de raíz, tamaño de cotiledones, velocidad de germinación, velocidad de emergencia de cotiledones).

La medida más comúnmente usada son los porcentajes de germinación y los que miden el desarrollo de las plántulas.

El parámetro más sensible es la longitud de la raíz, aunque no sea tan fácil de medir como la germinación. También la velocidad de germinación puede ser un indicador muy sensible de los efectos alelopáticos (Wardle y col., 1991), debido a que los *aleloquímicos*, no pueden afectar al porcentaje final de germinación, pero sí pueden producir un retraso en la misma.

Por ello, se realizaron las siguientes actividades:

- Contar diariamente las semillas germinadas.
- Contar diariamente los cotiledones emergidos.
- Medir (al final de la experiencia) la longitud de raíces y cotiledones (de 10 plántulas).
- Calcular la velocidad de germinación y nacimiento de cotiledones mediante un índice que se ha denominado “índice de vigor”.

#### **III.4.3.- Ensayo de la actividad alelopática de los flavonoides.**

Tras la purificación de los flavonoides se prepararon diferentes soluciones en agua Milli-Q de cada uno de los compuestos. También se realizaron ensayos con la mezcla a concentraciones equimolares de los kampferoles mayoritarios en el exudado (K-3 y K-3,7) para comprobar si la interacción de estos compuestos pueden actuar de forma aditiva o inhibiendo la acción de cada uno de ellos.

Se ensayaron diferentes concentraciones que partieron de 1mM, concentración máxima recomendada en los bioensayos alelopáticos (Rice, 1984; Macías y col., 1993) y se fueron preparando diversas diluciones hasta 0,01mM.

- Apigenina (Ap): 1; 0,5; 0,1; 0,05 y 0,01mM.
- 3-*O*-Metilkampferol (K-3): 1; 0,5; 0,1; 0,05 y 0,01mM.
- 4'-*O*-Metilapigenina (Ap-4'): 1; 0,5; 0,1 y 0,05mM.
- 7-*O*-Metilapigenina (Ap-7): 1; 0,5; 0,1 y 0,05mM.
- 3,4'-*Di-O*-metilkampferol (K-3,4'): 1; 0,5 y 0,01mM.
- 3,7-*Di-O*-metilkampferol (K-3,7): 1; 0,5; 0,1; 0,05 y 0,01M.
- Mezcla de K-3 y K-3,7': 1 y 0,5mM.

Se tomaron 50 semillas de *Rumex crispus* (cuatro réplicas con un total de 200 semillas) las cuales fueron colocadas en placas Petri de 9cm de diámetro sobre papel Whatman nº118. En cada placa se añadió 5ml de cada solución. Las placas controles fueron regadas con agua Milli-Q.

Estas placas se colocaron en una cámara de cultivo con luz y temperatura controlada (fase de luz: 16 horas y fase de oscuridad: 8h, a una temperatura constante de 25°C). Cada dos días se suministró 1ml de la concentración del flavonoide/s correspondiente o bien el agua Milli-Q para el control. Las semillas germinadas y cotiledones nacidos se contaban todos los días (considerando que la germinación se había producido cuando se daba la ruptura de abrigo de la semilla y por consiguiente salida de la radícula). El experimento se mantuvo durante 10 días. Al final de la experiencia se midieron el tamaño de los cotiledones y de las raíces, utilizándose para ello 10 plántulas elegidas al azar de cada placa (Jaderlund y col., 1996).

#### **III.4.4.- Ensayo de la actividad alelopática de los compuestos identificados en la Fracción-2.**

Una vez identificados, se obtuvieron comercialmente en Aldrich-Chemical y se hicieron diferentes soluciones con agua Milli-Q de cada uno de los compuestos por separado y con diferentes mezclas de ellos. Se ensayaron diferentes concentraciones: desde 1mM, concentración máxima recomendada en los bioensayos alelopáticos (Rice, 1984; Macías y col., 1993), hasta la concentración en la que no aparece efecto negativo en ninguno de los parámetros medidos.

- Ácido Oxálico (ácido orgánico): 1 y 0,5mM.
- Ácido Metilmalónico (ácido orgánico): 1 y 0,5mM.
- Ácido Butírico (ácido graso): 1; 0,5; 0,1; 0,01; 0,001 y 0,0001mM.
- Metilpropionato (ácido graso): 1; 0,5; 0,1; 0,01; 0,001 y 0,0001mM.
- Ácido 3-Hidroxibutírico (ácido graso): 1 y 0,5mM.
- Ácido Hidroxicinámico (ácido fenólico): 1; 0,5 y 0,01mM.
- Ácido p-Anísico (ácido fenólico): 1 y 0,5mM.
- Ácido Cinámico (ácido fenólico): 1; 0,5; 0,1 y 0,01mM.
- Azuleno (hidrocarburo): 1 y 0,1mM.
- Ácido 4-Hidroxibenzoico (ácido fenólico): 1; 0,5 y 0,1mM.
- Ácido Ferúlico (ácido fenólico): 1 y 0,5mM.

En la naturaleza estos compuestos no se encuentran aislados, sino constituyendo mezclas que pasan al suelo en diferentes proporciones. Por lo tanto, para conocer los posibles efectos sinérgicos de dichas moléculas cuando actúan conjuntamente, también

se cuantificó el efecto derivado de la interacción de dichos compuestos. Para hacer las mezclas se tuvo en cuenta la acción que ejercían por separado cada uno de ellos, mezclando los que afectaban negativamente a la germinación, al nacimiento de los cotiledones, al tamaño de la raíz y al tamaño de cotiledones, así como la mezcla de todos los compuestos a la vez. En ninguna de estas mezclas se añadió ácido butírico ni metilpropionato ya que el efecto de estos compuestos es tan potente a las concentraciones ensayadas en las mezclas, que camuflaría el efecto de los demás.

La composición de las mezclas fueron las siguientes:

- *Mezcla 1:* Mezcla de compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con cada uno de ellos por separado (ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno)
- *Mezcla 2:* Compuestos de la *Mezcla 1* más ácido hidroxicinámico, uno de los compuestos que inhiben la germinación y nacimiento de cotiledones.
- *Mezcla 3:* Compuestos de la *Mezcla 1* más ácido cinámico, otro compuesto fenólico que inhibe la germinación y nacimiento de cotiledones.
- *Mezcla 4:* Compuestos de la *Mezcla 1* más ácido hidroxicinámico y ácido cinámico.
- *Mezcla 5:* Mezcla de compuestos que inhiben la longitud de cotiledones cuando se ensaya con cada uno de ellos aisladamente (ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico y ácido 3-hidroxi-butírico).
- *Mezcla 6:* Compuestos de la *Mezcla 5* más ácido hidroxicinámico .
- *Mezcla 7:* Compuestos de la *Mezcla 5* más ácido cinámico.
- *Mezcla 8:* Compuestos de la *Mezcla 5* más ácido hidroxicinámico y ácido cinámico.

- *Mezcla 9*: Mezcla de compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación cuando se ensaya con cada uno de ellos por separado (ácido hidroxicinámico y ácido cinámico).
- *Mezcla 10*: Mezcla de todos los compuestos (ácido ferúlico, ácido hidroxicinámico, ácido cinámico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico y ácido 3-hidroxibutírico).

Al igual que para el ensayo con flavonoides, se tomaron 50 semillas de *Rumex crispus* (cuatro réplicas con un total de 200 semillas) que fueron colocadas en placas Petri con papel Whatman nº118. Al inicio de la experiencia se añadió 5ml de solución o agua Milli-Q (control).

Además, el experimento se repitió en las mismas condiciones, pero sembrando 25 semillas de *Rumex crispus* en placas Petri (4 réplicas con un total de 100 semillas) que contenían 25g de suelo del habitat de *Cistus ladanifer*, pero sin la presencia de esta especie, y se regaron con cada uno de los compuestos a distintas concentraciones (1, 0,5, 0,001 y 0,0001mM) y con las distintas mezclas realizadas a concentraciones de 0,5 y 0,1mM.

Estas placas se colocaron en una cámara de cultivo con luz y temperatura controlada (fase de luz: 16h y fase de oscuridad: 8h, a una temperatura constante de 25°C). El primer día se suministró 5ml de la solución correspondiente para el control en los ensayos sobre papel y 15ml en los ensayos sobre suelo, y agua Milli-Q, para los controles. Cada dos días se regó con 1ml para los ensayos sobre papel y 4ml para los ensayos sobre suelo de las soluciones correspondientes o agua Milli-Q. Las semillas germinadas y cotiledones nacidos se contaban todos los días. El experimento se mantuvo durante 10 días para papel y durante 22 días para suelo, al final de la experiencia se midieron, los tamaños de los cotiledones y de las raíces de 10 plántulas elegidas al azar de cada placa (Jaderlund y col., 1996).

### **III.5.- ESTUDIO DEL POTENCIAL ALELOPÁTICO DE SUELOS ASOCIADOS A *Cistus ladanifer*.**

#### **III.5.1- Selección de puntos de muestreo.**

El jaral elegido está situado en la finca “El Hatillo” en Cheles. A unos 50 kilómetros de la Universidad de Extremadura (Badajoz). Esto facilita las recogidas frecuentes de muestras. Por otro parte, se trata de una finca privada con vigilancia lo que asegura que los utensilios instalados no fueran modificados.

#### **III.5.2- Recogida de muestras.**

Se seleccionaron al azar tres puntos de un jaral y dos puntos adyacentes al jaral pero que carecen de *C. ladanifer* cuya función es actuar de controles.

A principio de cada mes y durante un año se recogieron tres muestras de suelo de cada uno de los puntos seleccionados (en total, nueve de jarales y seis de controles). Las muestras correspondían a la parte superficial del suelo (10cm), con el fin de estudiar el posible efecto en la germinación de herbáceas derivado de compuestos que se encuentran en el suelo, provenientes de *C. ladanifer*.

Posteriormente los suelos son transportados al laboratorio y se dejan secar a temperatura ambiente. Se criban con un tamiz de 2mm y se mantienen en oscuridad para evitar que sean afectados por la actividad microbiana hasta su posterior análisis.

### III.5.3.- Análisis químico de las muestras.

En cada una de las muestras se analizaron los siguientes elementos:

- Porcentaje de arena, limo y arcilla: El análisis granulométrico para determinar el porcentaje de arena, limo y arcilla se realizó por el método de Boyouco. El procedimiento realizado ha consistido en lo siguiente: Se pesan 50g de cada muestra de suelo y se añade 100ml de dispersante (50g de Calgón en un litro de agua destilada), se deja reposar durante 15-20 horas, se pasan a probetas de 1 litro. Después de agitar, se utiliza un hidrómetro para determinar su densidad. Las mediciones se realizaron a los 4 minutos y a las 2 horas.
- pH: Se midió en una suspensión de KCl 1N (Reed y Cummings, 1945). Se tomaron 10g de suelo y se agitaron con 25ml de KCl 1N. La solución resultante se midió con un pHmetro.
- Porcentaje de materia orgánica: Se aplicó el método de oxidación por vía húmeda con dicromato potásico y ácido sulfúrico (Walkley y Black, 1934). Para ello, se toman 0,5g, al cual se añade 10ml de dicromato potásico 1N y 20ml de ácido sulfúrico, y se deja en reposo durante 30 minutos. Posteriormente se añade 200ml de agua destilada, 10ml de ácido ortofosfórico y 1ml de difenilamina. Esta solución se valora con Sal de Mhor (0,5N)
- Iones Sodio y Potasio: 5g de suelo se extraen con 50ml de acetato amónico 1N mediante agitación. La solución resultante se mide por Emisión de Llama (Welcher, 1966).
- Iones Calcio y Magnesio: 5g de suelo, se extraen con 50ml de acetato amónico 1N mediante agitación. La solución resultante se mide por Absorción Atómica (Welcher, 1966).

- Iones Hierro y Zinc: 10g de suelo se extraen con 50ml de EDTA amónico 0,05M a 20°C mediante agitación. La solución resultante se mide por Absorción Atómica (Welcher, 1966).
- Fósforo: Se determinó estimando los ortofosfatos mediante el desarrollo del azul de molibdeno (Allen, 1989). Mediante agitación, 2g de suelo se extraen con ácido acético. Se mide la absorbancia de la solución resultante mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 700nm.
- Nitrógeno (nitrógeno orgánico total): Este elemento se determinó según el método Kjeldahl. Se realizó la digestión de 5g de suelo junto con 10ml de ácido sulfúrico y 2,5g de catalizador (15g Selenio, 18,45g de Sulfato de cobre y 216,25g de Sulfato potásico) durante 2 horas a altas temperaturas en una campana extractora. Después se añade 100ml de agua, se filtra, se añade 20ml de hidróxido sódico y se valora con ácido sulfúrico 5mN con el indicador Shiro-Tashiro (Soil Conservation Service, 1972).

#### **III.5.4.- Extracción de fenoles totales de suelos asociados a *C. ladanifer*:**

Se han descrito diferentes métodos de extracción de los compuestos fitotóxicos en el suelo.

Bajo condiciones controladas, Dalton y col. (1987); Dalton, (1989) comparan algunos de los procesos de extracción de suelo usados para recoger *aleloquímicos* de sistemas naturales y cultivados. Añadió ácido ferúlico (1000mg/Kg) en diferentes suelos. La eficacia de los diferentes extrayentes en recoger el ácido ferúlico añadido fue comparada manteniendo la solución extrayente con el suelo durante 1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas antes de la extracción y análisis por HPLC. Según el tipo de suelo, la eficiencia de los diferentes extrayentes fue generalmente en este orden: agua=metanol<acetato sódico<EDTA=DTPA<hidróxido sódico. Dalton (1999) concluye que las moléculas de

ácido fenólicos que se extraen con fuertes quelatos e hidróxido sódico podrían probablemente no ser soltadas en condiciones naturales.

Gallet (1994), para extraer estos compuestos fenólicos, agita 30g de muestras de suelo con 250ml de agua destilada durante 20h bajo N<sub>2</sub> y a temperatura ambiente. Inderjit y Dakshini (1993) también realiza la extracción mediante agua destilada (5:1, volumen:peso). Estos autores consideran que los resultados obtenidos con este método, mediante extracción con agua, son significativos por razones ecológicas. En ecosistemas naturales, los fenoles extraídos con agua son importantes donde las precipitaciones son frecuentes pues estos compuestos son liberados al medio por el agua (Del Moral y Muller, 1970). Esto sugiere que el agua puede extraer fenoles del suelo, si bien estos compuestos están débilmente absorbidos a la superficie de las partículas del mismo (Dalton, 1989).

Por esta razón y puesto que según Dalton (1989), el metanol presenta el mismo poder de extracción que el agua, en este estudio se utilizó metanol para facilitar la evaporación que hay que realizar con posterioridad a la extracción.

Se procedió del siguiente modo: 25g de suelo se extraen con 40ml de metanol, agitándose durante dos horas. El extracto resultante se filtra y se evapora hasta un volumen final de 1ml.

Para determinar los fenoles totales se procedió mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Este método resulta, sobre la media, un 30% más de color que otros antiguos métodos (Singleton y Rossi, 1965). Esto fue confirmado por Julkunen-Tiitto, 1985 y Price y col., 1989. En algunos fenoles como ácido salicílico el rendimiento del color es más que doblado que con el método de Folin-Denis. Además este método tiene la ventaja de ser un procedimiento de los que más baja interferencia presenta con compuestos no fenólicos.

El procedimiento consistió en lo siguiente: En un matraz se mezcla 1ml del extracto junto con 60ml de agua destilada, se añade 5ml de solución de Folin-Ciocalteu (10h en reflujo de una solución de 700ml de agua destilada, 10ml de ácido clorhídrico, 50ml de ácido orto fosfórico 85%, 100g de tungstato, y 25g de ácido fosfomolíbico,

posteriormente se añade 150g de sulfato de litio 1-hidrato, bromo y agua destilada hasta 1l) después de un minuto y antes de ocho se añaden 15ml de carbonato amónico hidratado (20g por 100ml) y agua destilada hasta 100ml. Se deja actuar durante 2h y se mide la absorbancia a 760nm en un espectrofotómetro.

La concentración se calcula refiriendo los resultados a una recta patrón que ha sido construida con ácido cinámico. Este método es usado para estudiar la variación en la concentración entre muestras y a lo largo del año de fenoles totales más que para determinar la concentración absoluta (Box, 1983).

### **III.5.5.- Extracción e identificación de compuestos presentes en el suelo.**

Inicialmente, durante dos horas, 25g de suelo se extraen con 40ml de metanol. El extracto resultante se filtra y se evapora hasta un volumen final de 1ml. Este extracto resultante se analiza por HPLC mediante una columna analítica y con un solvente de agua/metanol/tetrahidrofurano en una proporción de 56:16:28 y con una velocidad de 0,75ml/min.

Mediante comparación del espectro y tiempo de retención de cada uno de los picos, con patrones identificados en el exudado de *C. ladanifer* se identificaron algunos de los compuestos presentes en el suelo.

### **III.5.6.- Ensayo de germinación en suelos.**

Estas experiencias se plantearon para estudiar el efecto alelopático de los suelos asociados a *C. ladanifer* en el crecimiento y desarrollo de herbáceas. Para ello se recogieron todos los meses 30g de suelo (de jarales y próximos al jaral pero fuera de la

influencia de *C. ladanifer* para el control) y se colocaron en placas Petri (15cm de diámetro). Cada experimento se realizó por duplicado.

La especie seleccionada para el ensayo de germinación fue *R. crispus*. 50 semillas de *R. crispus* se sembraron en cada uno de los suelos y regados diariamente con agua Milli-Q. Se mantuvieron, durante 20 días en una cámara de cultivo con una temperatura constante de 25°C y un fotoperíodo de 16 horas de fase de luz y 8 horas de fase de oscuridad.

Todos los días se contó el número de semillas germinadas y el número de cotiledones emergidos.

### III.6.- TEST DE GERMINACIÓN.

Los resultados de germinación, de nacimiento de cotiledones, inhibición en el tamaño de la raíz, inhibición en el tamaño de cotiledones, índice de vigor de germinación (IVG), índice de vigor de cotiledones (IVC), se contabilizaron porcentualmente referidos al control.

El cálculo de estos índices se hizo mediante las siguientes fórmulas:

$$\% \text{Germinación} = (\text{n}^\circ \text{ germinadas tratada} / \text{n}^\circ \text{ germinadas control}) \times 100$$

$$\% \text{Cotiledones} = (\text{n}^\circ \text{ cotiledones tratada} / \text{n}^\circ \text{ cotiledones control}) \times 100$$

$$\% \text{Inhibición en el tamaño de la raíz} = (\text{tamaño raíz tratada} / \text{tamaño raíz control}) \times 100$$

$$\% \text{Inhibición en el tamaño de cotiledón} = (\text{tamaño cotiledón tratado} / \text{tamaño raíz control}) \times 100$$

$IV = (n_1/1 + n_2/2 + \dots + n_n/n)$ . Siendo  $n_1 = \%$  de semillas germinadas el primer día,  $n_2 = \%$  de semillas germinadas el segundo día,  $n_n = \%$  de semillas germinadas el último día del experimento y  $n = n^\circ$  de días que dura el experimento (Ahmed y Warled, 1994)

$$\text{IVG respecto al control} = (\text{IVG tratada} / \text{IVG control}) \times 100$$

$$\text{IVC respecto al control} = (\text{IVC tratada} / \text{IVC control}) \times 100$$

IV será 100% si todas las semillas germinan el primer día y será 0% si no germina ninguna al final del experimento.

Para establecer si los valores eran significativamente diferentes al comparar cada uno de los tratamientos con el control se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney U. Se consideran diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

### **III.7.- ESTUDIO DE LA FUNCIÓN ANTIHERBÍVORO DE FLAVONOIDES CONTENIDO EN EL EXUDADO DE *C. ladanifer*.**

#### **III.7.1.- Modulación de la actividad $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa por flavonoides contenidos en el exudado de *Cistus ladanifer*.**

##### ***III.7.1.1.- Preparación de vesículas de retículo sarcoplásmico.***

La preparación de vesículas de retículo sarcoplásmico (RS) a partir de músculo esquelético de conejo se llevó a cabo según el procedimiento descrito por MacLennan (1970) con las modificaciones introducidas en Cuenda y col. (1990) respecto a la composición de tampones, incluyendo PMSF para prevenir la proteólisis durante la preparación y  $\beta$ -MeOH para proteger la oxidación de los grupos tiólicos de las cisteínas. En primer lugar se sacrifica un conejo albino (New Zealand). La muerte se produce por dislocación cervical y desangramiento rápido, evitando así acumulación de sangre en el músculo. Después se elimina la piel y se toma el músculo esquelético de las patas posteriores, colocándolo rápidamente en hielo. Todo el proceso de preparación subsiguiente se realiza entre 0 y 4°C, para evitar proteólisis durante la preparación.

Se pesa el músculo obtenido. Se añade tampón, de composición KCl 0,12M, PMSF 0,1mM,  $\beta$ -MeOH 2mM, Imidazol/HCl 5mM, pH 7,45 a 4°C, en relación 3 ml de tampón por gramo de músculo. Al mismo tiempo que se adiciona el tampón se tritura el músculo, manteniéndolo en hielo, hasta que el preparado es homogéneo.

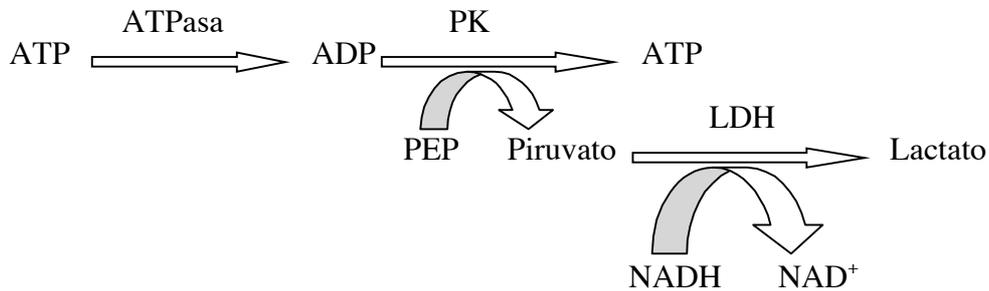
El homogeneizado se centrifuga a 1600 x g durante 15 minutos a 4°C. Se toma el sobrenadante que se filtra a través de gasas estériles humedecidas con agua destilada, ajustando el pH a 7,45 con adición de KOH. Se centrifuga de nuevo a 10000 x g durante 20 minutos a 4°C. Se vuelve a filtrar el sobrenadante y ajustar su pH a 7,45.

El objetivo de estas centrifugaciones a baja velocidad es la eliminación de grasas, células y restos de tejidos no homogeneizados en el proceso de trituración. Se somete el sobrenadante a una centrifugación a 44000 x g a 4°C durante 50 minutos y se desecha el sobrenadante obtenido, eliminando así metabolitos y proteínas solubles. Pueden aparecer en el fondo del tubo contaminantes mitocondriales de color marrón que se pueden desechar en la resuspensión del precipitado en un tampón de alta fuerza iónica que contiene KCl 1M, PMSF 0,1mM,  $\beta$ -MeOH 2mM, Tes/Tris 0,01M, pH 7,45 a 4°C. Se homogeneiza con un homogeneizador mecánico y se ajusta el pH a 7,45, dejando incubar durante 2 horas a 4°C. Se usa la mayor cantidad de volumen posible. La dilución conduce a eliminación de fosforilasa de glucógeno adsorbida a la membrana de RS (Cuenda y col., 1994). Además la alta fuerza iónica elimina proteínas, como la actomiosina, también adsorbidas a la membrana. Por último, se centrifuga a 78000 x g durante 30 minutos a 4°C. Tomándose el precipitado que contiene las membranas de RS purificadas. A continuación se resuspende y se homogeneiza en un tampón que contiene sacarosa 0,25M, KCl 0,1M, Tes/Tris 0,05M, pH 7,45 a 4°C. Se reparte en alícuotas y se congela a -80°C. La concentración de proteínas osciló entre 30 y 50mg/ml. Las membranas de RS son funcionalmente activas durante varios meses.

### ***III.7.1.2.- Medida de Actividad $Ca^{2+}$ -ATPasa.***

La actividad ATPasa puede determinarse acoplando la hidrólisis de ATP a las reacciones catalizadas por la piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH). De esta forma el ATP hidrolizado es regenerado por la piruvato kinasa, que utiliza fosfoenol piruvato (PEP) y adenosina 5'-difosfato (ADP) como sustratos, para producir adenosina 5'-trifosfato (ATP) y piruvato. El piruvato pasa a lactato en presencia de NADH, proceso catalizado por la lactato deshidrogenasa. Teniendo en cuenta que la reacción es estequiométrica, por cada mol de ATP que es hidrolizado por la actividad ATPasa, un mol de NADH es oxidado, lo que conlleva una disminución en la

absorbancia a 340nm, que es el máximo de absorción del NADH. La secuencia de reacciones se representa en el esquema siguiente:



Las unidades internacionales (U.I.) para las actividades determinadas son:

$$\text{U.I.} = \frac{\mu\text{mol de sustrato}}{\text{min} \cdot \text{mg proteína}}$$

Se utilizó un valor de coeficiente de extinción molar para el NADH ( $\epsilon$ ) =  $6220\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a pH 7,4.

Para la medida de actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de vesículas de RS, se utiliza el siguiente medio de ensayo estándar: Tes/Tris 0,1M, pH 7 a 25°C, KCl 0,1M,  $\text{MgCl}_2$  3mM,  $\text{CaCl}_2$  0,1mM, 50 $\mu\text{g}$  de PK (10 UI) 50 $\mu\text{g}$  de LDH (28 UI), NADH 0,25mM y PEP 0,42mM.

La absorción de esa mezcla de reacción con RS a 340nm fue aproximadamente 1,5. Se registra la variación de absorción en función del tiempo, que sin ATP debe ser inapreciable. Se añade el ATP a una concentración final de 2,5mM y se observa una caída rápida de señal debido a la existencia de ADP contaminante en la solución de ATP. Por ser una caída rápida se comprueba que el sistema de enzimas acopladas funciona perfectamente. La concentración de proteína usada fue de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y la temperatura de medida 25°C.

Cuando se mide la actividad ATPasa en vesículas de RS, el  $\text{Ca}^{2+}$  que se acumula dentro de las vesículas inhibe la actividad. El grado de sellamiento de las vesículas se

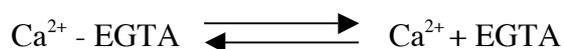
puede conocer haciendo uso de calcimicina (ionóforo selectivo a  $\text{Ca}^{2+}$ ). La actividad ATPasa, en presencia de ionóforo, de vesículas de RS es de 3 a 6 veces superior a la actividad sin ionóforo o vesículas de RS selladas. La cantidad de calcimicina empleada fue del 4% (p/p) con respecto a la cantidad de proteína.

El grado de purificación en  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de las preparaciones se obtiene midiendo la actividad ATPasa independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de EGTA 5mM que actúa como quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### ***III.7.1.3.- Preparación de disoluciones de concentraciones de $\text{Ca}^{2+}$ libre fija con tampones de $\text{Ca}^{2+}$ /EGTA.***

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  contaminante en los tampones usados en nuestros estudios es de  $10\mu\text{M}$  aproximadamente. La  $K_{0.5}$  de activación por  $\text{Ca}^{2+}$  de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de RS es submicromolar en las condiciones estandar de medida de actividad. Cuando se quiere medir actividad en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y con valores de ésta menores a  $10\mu\text{M}$ , hay que hacer uso de EGTA como quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El equilibrio de formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA a un pH determinado presenta una constante aparente de disociación,  $K_d$ :



cuyo valor es:

$$K_d = \frac{[\text{Ca}^{2+}]_1 \cdot [\text{EGTA}]_1}{[\text{Ca}^{2+} - \text{EGTA}]} \quad (1)$$

Las concentraciones de EGTA y  $\text{Ca}^{2+}$  libres se pueden expresar en función de las concentraciones totales:

$$[\text{EGTA}]_1 = [\text{EGTA}]_t - [\text{Ca}^{2+} - \text{EGTA}] \quad (2)$$

$$[\text{Ca}^{2+}]_1 = [\text{Ca}^{2+}]_t - [\text{Ca}^{2+} - \text{EGTA}] \quad (3)$$

La expresión de la constante,  $K_d$ , se puede así escribir de la siguiente manera:

$$K_d = \frac{([Ca^{2+}]_t - [Ca^{2+} - EGTA]) \cdot [EGTA]_t - [Ca^{2+} - EGTA]}{[Ca^{2+} - EGTA]} \quad (4)$$

Operando y reordenando se obtiene la siguiente ecuación de 2º grado:

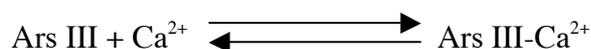
$$[Ca^{2+} - EGTA]^2 - ([Ca^{2+}]_t - [EGTA]_t + K_d) \cdot [Ca^{2+} - EGTA] + [Ca^{2+}]_t \cdot [EGTA]_t = 0 \quad (5)$$

La resolución de esta ecuación da dos posibles soluciones para la concentración del complejo  $Ca^{2+}$ -EGTA, siendo sólo una de ellas la correcta. Así pues, a partir de las concentraciones de EGTA y  $Ca^{2+}$  totales y de la  $K_d$  se puede saber la concentración del complejo  $Ca^{2+}$ -EGTA, a partir de la cual se puede saber la concentración de  $Ca^{2+}$  libre según la ecuación 3.

La  $K_d$  para el complejo  $Ca^{2+}$ -EGTA empleada en este trabajo a pH 7 tiene un valor de  $3,94 \times 10^{-7}M$  (Fabiato y Fabiato, 1979).

#### ***III.7.1.4.- Medida de nivel de $Ca^{2+}$ acumulado por RS con Arsenazo III.***

Los estudios sobre niveles estacionarios de  $Ca^{2+}$  en RS fueron realizados utilizando el indicador de iones metálicos arsenazo III. Este compuesto presenta una alta afinidad por  $Ca^{2+}$  y puede formar complejos con él, estableciéndose un equilibrio:

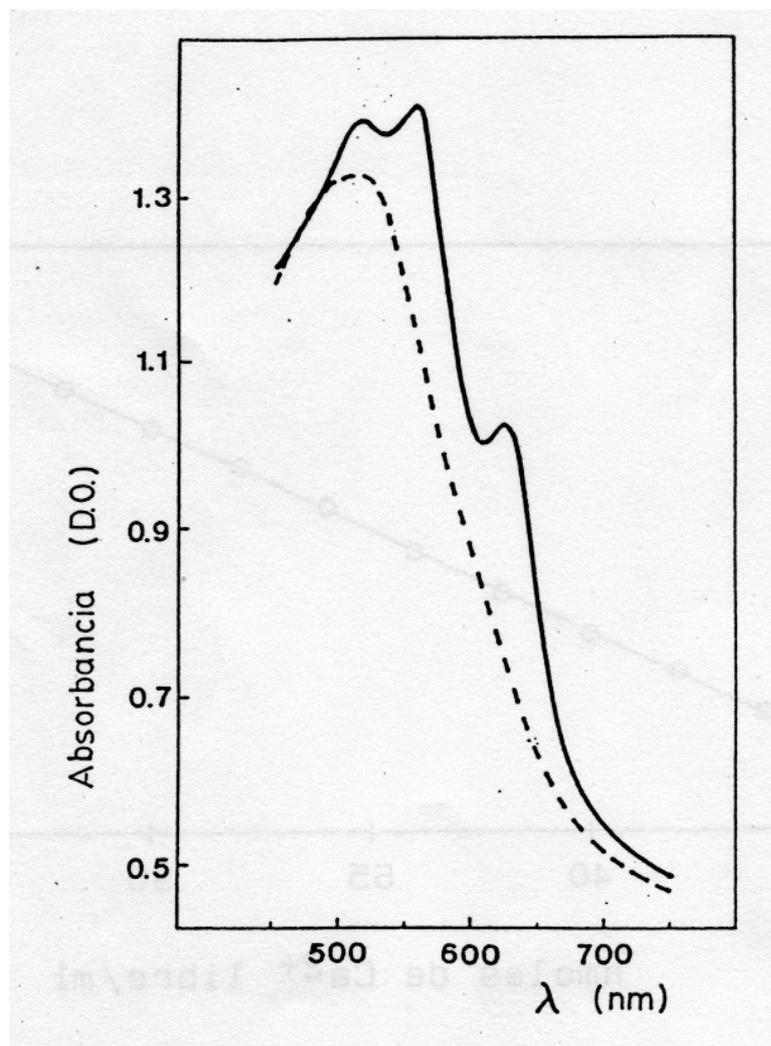


Como se muestra en su espectro de absorción en presencia y ausencia de iones  $Ca^{2+}$  en la Figura 5, la mayor diferencia de absorción entre las dos especies (Ars III libre y Ars III- $Ca^{2+}$ ) tiene lugar aproximadamente a 660nm.

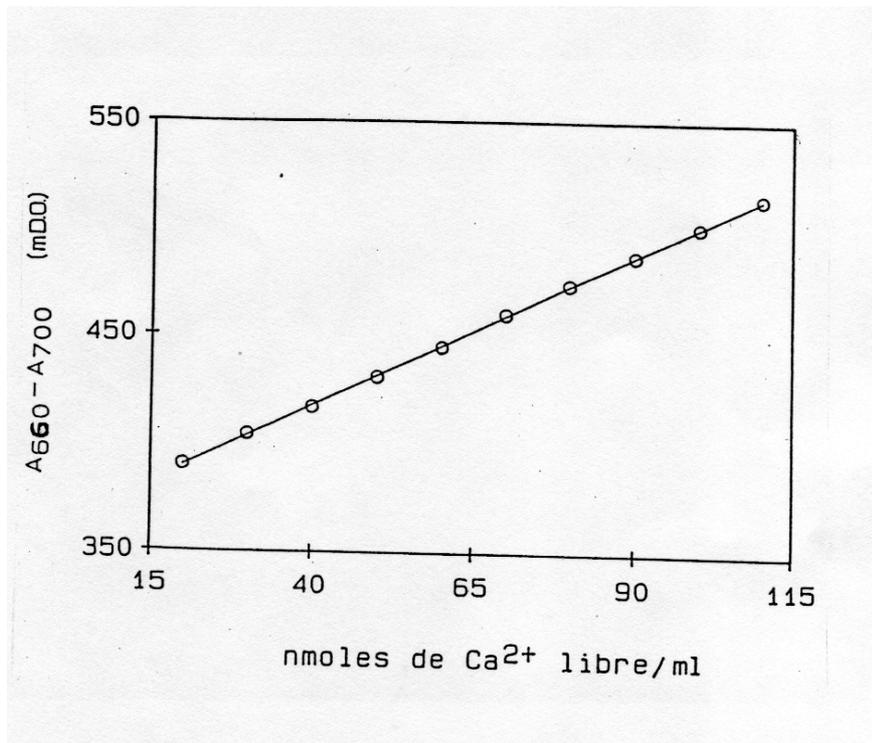
Esto hace que arsenazo III sea adecuado para su utilización en presencia de muchas sustancias cromofóricas, y que se minimicen los problemas de dispersión de luz.

Dicho problema de dispersión de luz se ve agravado por el hecho de que sea una estructura subcelular (vesículas de RS) la encargada de secuestrar  $\text{Ca}^{2+}$ . Este inconveniente se elimina si en lugar de medir la absorbancia a una longitud de onda determinada, se mide el incremento de absorbancia entre dos longitudes de onda suficientemente próximas simultáneamente, fijado una longitud de onda de referencia a la cual la absorción entre  $\text{ArsIII}$  y  $\text{ArsIII-Ca}^{2+}$  sea mínima.

El incremento de absorbancia, que en el presente trabajo corresponde a la diferencia de absorción entre 660 y 700nm, es función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Realizando una titulación de arsenazo III con EGTA, que presenta mayor afinidad hacia  $\text{Ca}^{2+}$  que arsenazo y, por tanto, desplaza el equilibrio hacia arsenazo III libre, puede hallarse la equivalencia entre variación de absorbancia registrada por el espectrofotómetro y disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el medio ( $\text{Ca}^{2+}$  unido a arsenazo) que resultó ser:  $11 \pm 1,6$  nmoles de  $\text{Ca}^{2+}/10\text{mDO}$  (Figura 6). Utilizando esta relación se pueden calcular los nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$  capturados por el RS cuando se dispara el proceso de transporte activo de  $\text{Ca}^{2+}$  por adición de ATP (2,5mM).



**Figura 5:** Espectro de absorción de arsenazoIII y arsenazoIII-Ca, línea discontinua y continua respectivamente.



**Figura 6:** Titulación con EGTA de arsenazoIII-Ca.

Estas medidas de niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron realizadas en un espectrofotómetro Kontron (Uvikon 810) termostatzado a  $25^{\circ}\text{C}$ , con cubetas de cuarzo de 1cm de paso de luz.

El protocolo experimental seguido ha sido: se preparan cubetas de 1ml de volumen total con KCl 0,1M, Tes 0,1 M,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM,  $\text{MgCl}_2$  5mM, Ars III  $30\mu\text{M}$  y aproximadamente  $500\mu\text{g}$  RS/ml, y se dejan incubar durante 10 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ , registrando en estas condiciones la línea base de absorbancia. A continuación se dispara la reacción añadiendo ATP en una concentración lineal de 2,5mM. El descenso de absorbancia registrado por el aparato tras la adición de ATP es consecuencia de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en las vesículas de RS, pero también es debido parcialmente a quelación de  $\text{Ca}^{2+}$  por fosfato inorgánico y ADP, especies resultante de la hidrólisis de ATP, y contaminantes habituales en las preparaciones comerciales de ATP. Por esta razón se añadió a las cubetas de reacción, una vez estabilizado el proceso de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  por el RS, el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{A}_{23187}$  ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ), observándose una reversión parcial del fenómeno de captura de  $\text{Ca}^{2+}$ , y tomándose este dato de variación de absorbancia para determinar los nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$  capturados por las vesículas de RS.

Antes de disparar la reacción con ATP se ha añadido al medio  $60\mu\text{M}$  de cada uno de los flavonoides estudiados, observándose su efecto en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  capturado.

### **III.7.1.5.- Medidas de fluorescencia.**

*-. Fluorescencia intrínseca:*

Los aminoácidos aromáticos (triptófano y tirosina) tienen una fluorescencia que se denomina intrínseca (Lakowicz, 1983). Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo con el espectrofluorímetro Hitachi/Perkin-Elmer, modelo 650-40. Se operó en “ratio mode” y con agitación magnética de las muestras pretermostatzadas a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Para las titulaciones con flavonoides las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 280 y 335nm respectivamente. La señal Raman del tampón fue menor del 2% de la señal de fluorescencia medida con las membranas del retículo sarcoplásmico en ausencia de flavonoide.

Los flavonoides estudiados presentan absorción, tanto a 280 como a 335nm, por lo que la “extinción aparente” de fluorescencia debe ser corregida por el efecto de atenuación de la intensidad de luz (excitación y emisión) a su paso a través de la disolución. Para calcular la atenuación debida a la absorción del flavonoide se ha seguido el método indicado en Lackowicz (1983), que se detalla a continuación de manera sucinta. La intensidad de fluorescencia “corregida por la atenuación por absorción” ( $F_{\text{corr}}$ ) se ha calculado mediante la siguiente ecuación:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{exp}} \cdot 10^{(A_{\text{ex}}+A_{\text{em}})/2}$$

donde:

$F_{\text{exp}}$ , es la intensidad de fluorescencia medida experimentalmente.

$A_{\text{ex}}$ , es la absorción del flavonoide a 280nm (longitud de onda de excitación).

$A_{\text{em}}$ , es la absorción del flavonoide a 335nm (longitud de onda de emisión).

Los coeficientes de excitación de los flavonoides utilizados fueron determinados experimentalmente a partir de soluciones preparadas por dilución en DMSO de una disolución preparada por pesada, en el mismo tampón utilizado para las medidas de la fluorescencia intrínseca (0,1M TES / 0,1M KCl / 3mM  $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7). Los valores de los coeficientes de excitación obtenidos fueron los siguientes:

<b>Coef. Extinción Molar (<math>\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>280nm</b>	<b>335nm</b>
Apigenina	6000	7300
3- <i>O</i> -Metilkampferol	10647	10800
4'- <i>O</i> -Metilapigenina	10647	11243
7- <i>O</i> -Metilapigenina	6482	9805
3,4'-Di- <i>O</i> -metilkampferol	5216	5558
3,7-Di- <i>O</i> -metilkampferol	5000	7400

Por lo tanto, a las concentraciones de estos flavonoides más elevadas utilizadas en las titulaciones de la fluorescencia intrínseca de las membranas de RS (50 $\mu$ g/ml) la “absorción total” ( $A_{ex}+A_{em}$ ) del flavonoide fue inferior a 0,3DO. El error en las correcciones del efecto de atenuación de fluorescencia por absorción ha sido, por tanto, menor del 2% (Birdsall y col., 1983).

*-. Fluorescencia de liposomas:*

Los liposomas de fosfatidilcolina con octilriptofano incorporado a los mismos se prepararon como sigue:

Primeramente se mezclaron disueltos en cloroformo (fosfatidilcolina purificada de huevo + 10% octilTrp). Tras agitación para garantizar una mezcla homogénea, se evaporó el cloroformo en corriente de N<sub>2</sub>. Se formaron los liposomas por resuspensión a temperatura ambiente con agitación vigorosa (vórtex) en el tampón indicado para las medidas de fluorescencia intrínseca.

Con carácter previo a las medidas de fluorescencia se sonicaron durante 2-5 minutos para formar liposomas milamelares.

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un intervalo de 1 hora después de la sonicación.

#### ***III.7.1.6.- Análisis de los resultados.***

Los resultados obtenidos en este apartado de modulación por flavonoides de actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se analizaron mediante ajuste por regresión no lineal y utilizando el programa informático ORIGIN 5.0.

### III.7.2.- Bioensayo con *Galleria mellonella*.

Con el fin de determinar si el exudado de las hojas puede repeler, envenenar o matar insectos, se planteó realizar un bioensayo para observar la actividad biológica del exudado de *Cistus ladanifer* utilizando como insecto de referencia a *Galleria mellonella* L. El objetivo de este ensayo fue evaluar el efecto por ingestión del exudado y de la fracción de flavonoides del mismo de *C. ladanifer* incorporado a la dieta, sobre la mortalidad de larvas de *Galleria mellonella*.

*Galleria mellonella* es un insecto al que se le denomina polilla o gusano de la cera por ser una especie parásita de las colmenas de las abejas, donde sus orugas se alimentan de la miel y el polen almacenados y devoran la cera de los panales. La polilla llega a medir unos 2cm de longitud. Es de color blanquecino y al moverse dejan tras de sí, finos hilos de seda cuya coloración varía según su alimentación. Las larvas pasan por cuatro estadios, pasando después a pupa y mariposa. Las larvas de esta especie se emplea como cebo para la pesca y ocasionalmente para alimento de algunos animales insectívoros.

En nuestro estudio la utilizaremos como ensayo preliminar para determinar si los flavonoides contenidos en el exudado de *C. ladanifer* presentan efecto insecticida. Debido a su facilidad de multiplicación en laboratorio y a su sensibilidad a los insecticidas, nos resultará la especie más adecuada para poner de manifiesto si los flavonoides presentan o no actividad biológica.

- *Cría de Insectos*: Se emplearon larvas de *Galleria mellonella* en tercer estadio procedentes de la multiplicación en insectarios de plástico transparentes y alimentadas con una dieta compuesta por 300g de harina de maíz, 80g de lecitina de soja, 50g de leche en polvo desnatada, 100g de levadura de cerveza, 220g de miel, 150g de glicerina y 100g de polen. Las condiciones de cría fueron 25°C y fotoperíodo de 16:8 horas luz:oscuridad.

- *Diseño experimental*: Los tratamientos utilizados fueron:

1.- Dieta Testigo: Para este fin, se utilizó la dieta de cría mencionada anteriormente.

2.- Dieta Cipermetrin: A los componentes de la dieta testigo se adicionaron 0,0026mg de cipermetrin puro/g de dieta testigo. Cipermetrin es un compuesto específico autorizado para su uso contra plagas de vegetales, constituido por un Piretroide de síntesis con un amplio y potente poder insecticida (Worthing y Walker, 1987; Barberá, 1989; Cluzeau y col., 2000; De Liñán, 2000).

3.- Dieta Exudado: A la dieta testigo se adicionó exudado de *Cistus ladanifer* en una proporción de 2mg/g de dieta testigo.

4.- Dieta Flavonoides: A la dieta testigo se adicionó una mezcla de flavonoides en una proporción de 2mg/g de dieta testigo. Esta mezcla de flavonoides presentaba una proporción de cada uno de ellos igual a la encontrada en las hojas durante la estación estival.

La unidad experimental consistió en una Caja de Petri de 9cm de diámetro con 10g de dieta, renovable cada siete días. En cada caja se colocaron 15 orugas del tercer estadio. Se consideraron 4 repeticiones por tratamiento, por lo que se contó con 60 larvas para cada tipo de dieta. Las unidades experimentales se colocaron completamente al azar dentro de una cámara mantenida en las condiciones ambientales indicadas anteriormente para la cría. Durante el período de ensayo, que fue de dos semanas, se realizaron observaciones diariamente para registrar el número de larvas muertas y retirarlas de la caja.

-. *Análisis de los resultados:*

Para los promedios de las larvas muertas a las dos semanas de iniciado el ensayo, se realizó un cuadro latino de 4 bloques y 4 variables (tratamientos) distribuidas al azar, para realizar un ANOVA con los resultados obtenidos.

## RESULTADOS

---

## **IV.1.- IDENTIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS QUE CONSTITUYEN EL EXUDADO DE *C. ladanifer*.**

### **IV.1.1- Separación por HPLC.**

Con el fin de obtener una idea previa de los compuestos que constituyen el exudado de *C. ladanifer* se analizó por HPLC una muestra completa de exudado sin pasar por Sephadex. El cromatograma obtenido se presenta en la Figura 7.

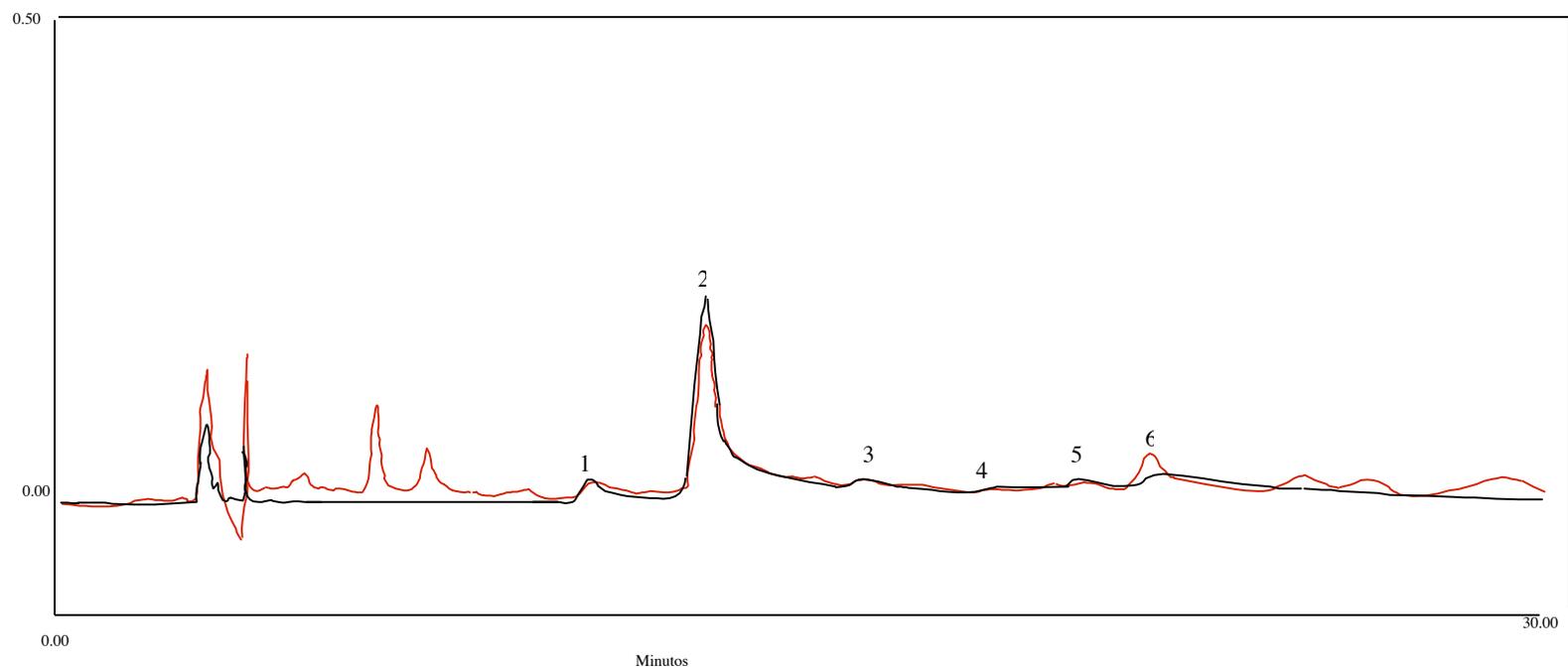
Mediante la separación con Sephadex se separó el extracto en diferentes soluciones que se analizaron posteriormente por HPLC.

De esta manera, se obtuvieron tres fracciones diferentes:

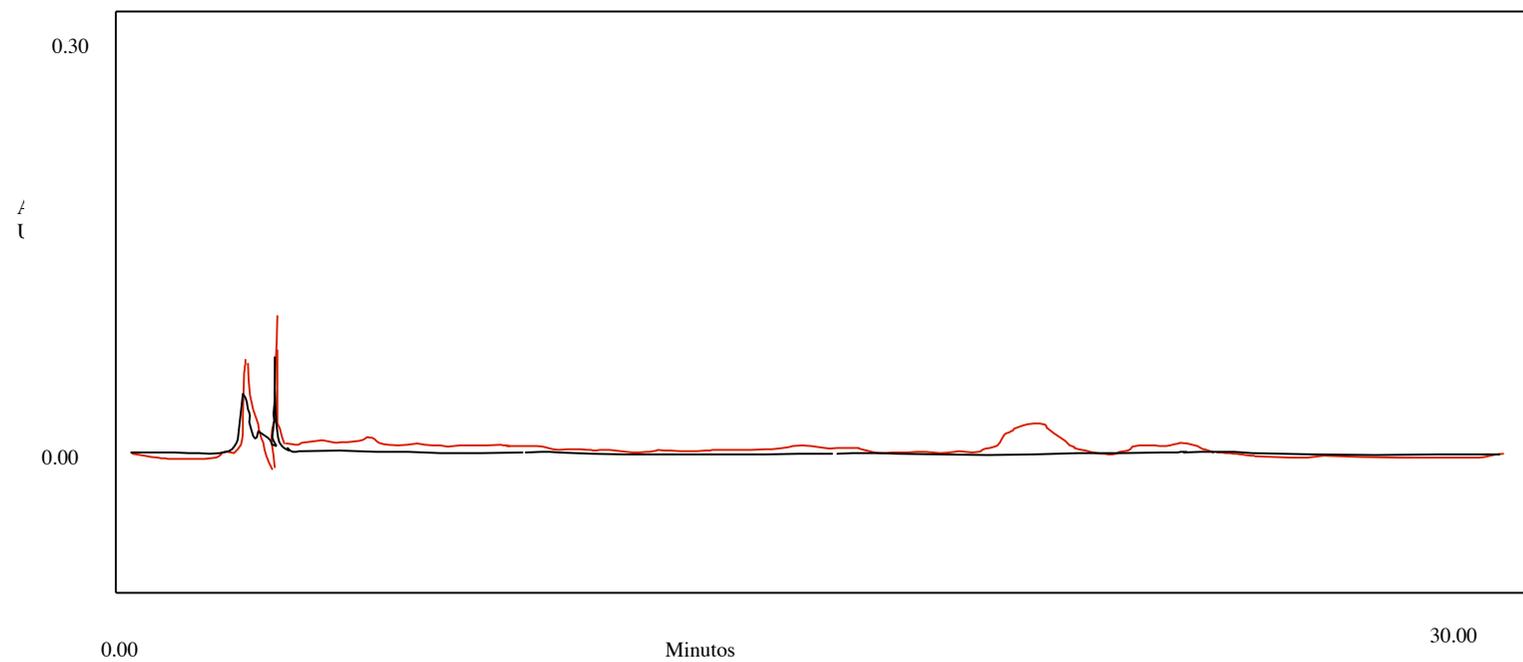
Fracción 1: Constituida por los 10ml primeros eluidos por Sephadex. Es de color marrón oscuro pero sus componentes no absorben en el visible-ultravioleta. Por esta razón no se detectan por HPLC. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 8.

Fracción 2: Compuesta por el extracto recogido posteriormente a la fracción anterior, sus componentes poseen espectros de absorción cuya longitud de onda máxima es inferior a 280nm. Por los ensayos previos realizados, en esta fracción se encuentran los compuestos que tienen mayor actividad alelopática. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 9.

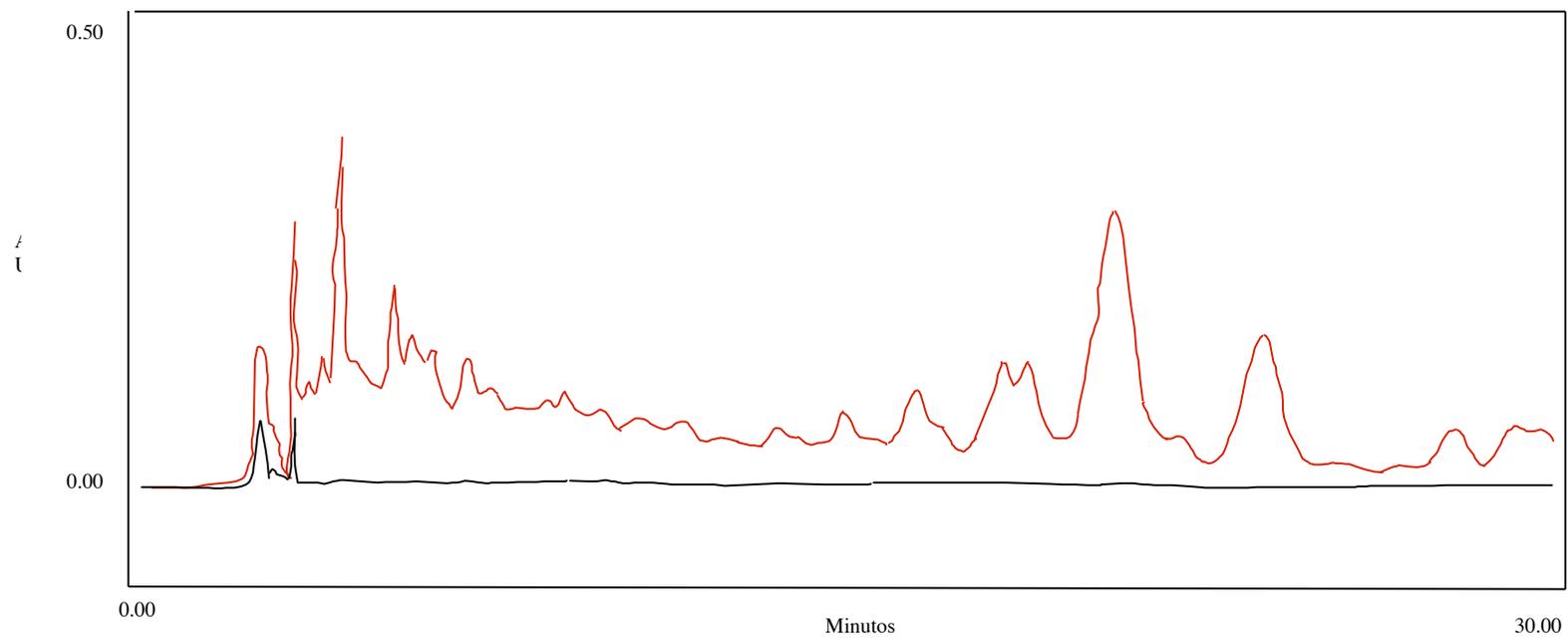
Fracción 3: Compuesta por una solución de color amarillo, sus componentes son flavonoides mezclados con otros compuestos de longitud de onda menor de 280nm. Esta fracción se volvió a pasar por la columna de Sephadex y mediante HPLC se analizó el contenido de los tubos con lo que se pudo separar en otras dos fracciones; fracción 3-A constituida solo por compuestos de longitud de onda menor de 280nm. y fracción 3-B, en la cual se detectaron únicamente los flavonoides. Los cromatogramas obtenidos se muestran en las Figuras 10 y 11.



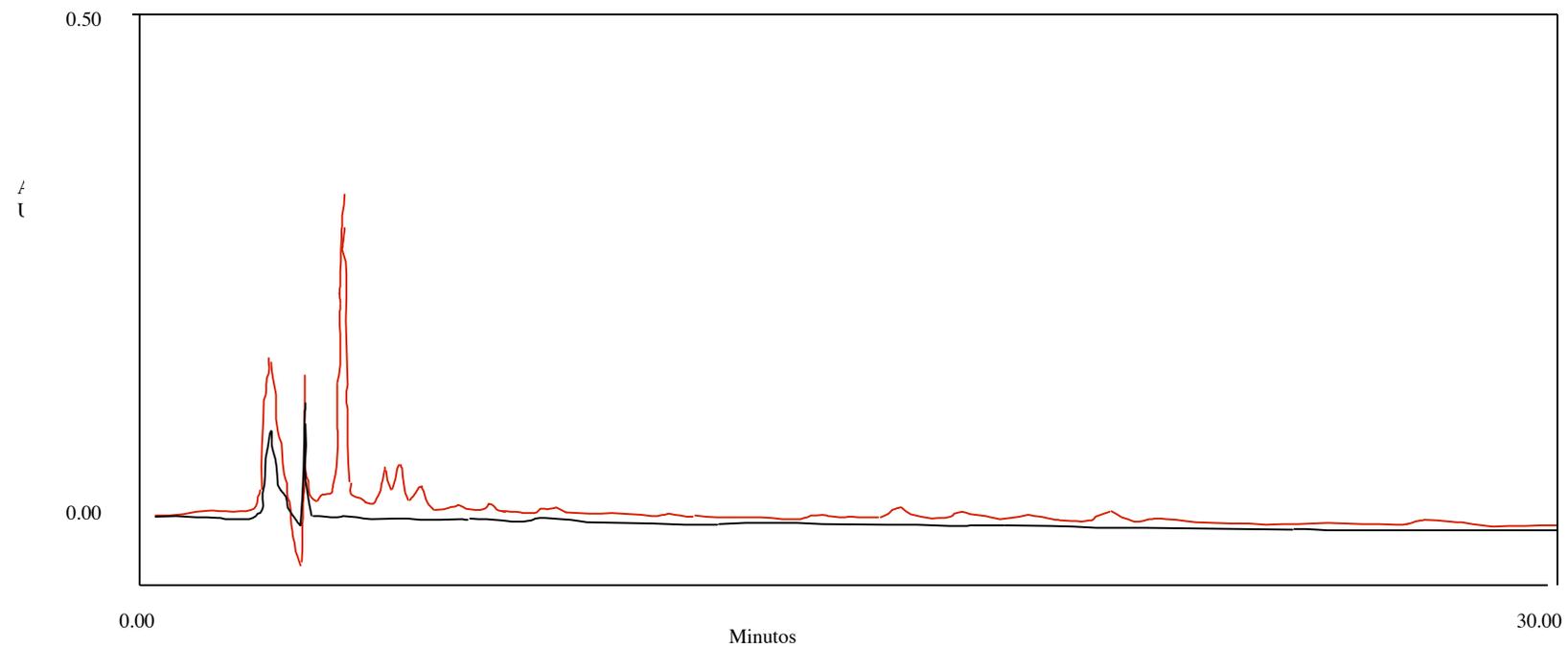
**Figura 7:** Cromatograma obtenido por HPLC de la muestra completa, a 260nm (línea roja) y a 350nm (línea negra). Los picos de 1-6 son flavonoides: (1) Apigenina; (2) 3-*O*-metilKampferol; (3) 4'-*O*-metilApigenina; (4) 7'-*O*-metilApigenina; (5) 3,4'-di-*O*-metilKampferol; (6) 3,7-di-*O*-metilKampferol.



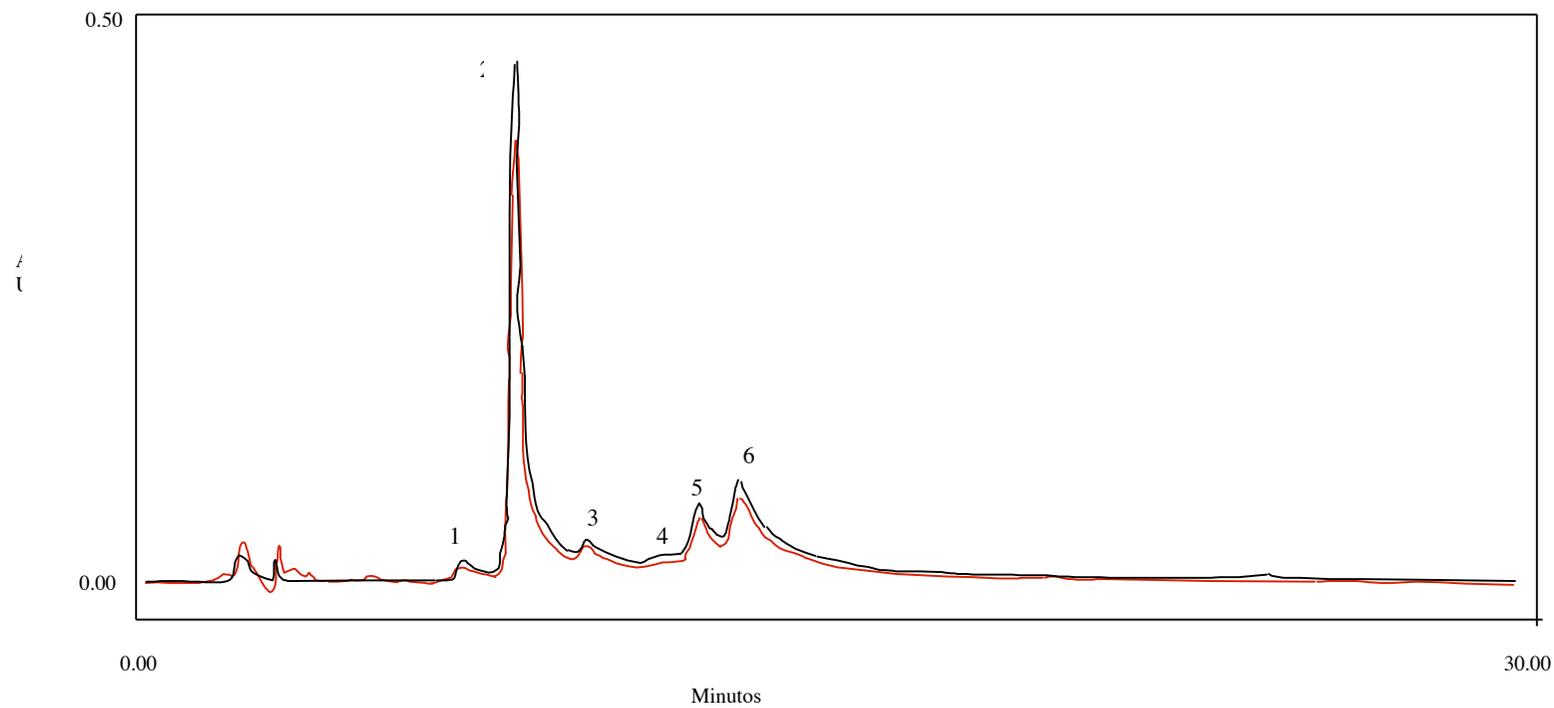
**Figura 8:** Cromatograma obtenido por HPLC de la fracción 1 a 260nm (línea roja) y a 350nm (línea negra). Corresponde a un grupo de compuestos que no absorben en el UV.



**Figura 9:** Cromatograma obtenido por HPLC de la fracción 2 a 260nm (línea roja) y a 350nm (línea negra). Los picos corresponden a un grupo de compuestos con espectro de  $\lambda_{\text{máx.}}$  comprendidas entre 230-290 nm.



**Figura 10:** Cromatograma obtenido por HPLC de la fracción 3A, a 260nm (línea roja) y a 350nm (línea negra).



**Figura 11:** Cromatograma obtenido por HPLC de la fracción 3, a 260nm (línea negra) y a 350nm (línea roja). Los picos de 1-6 son flavonoides: (1) Apigenina; (2) 3-*O*-metilKampferol; (3) 4'-*O*-metilApigenina; (4) 7'-*O*-metilApigenina; (5) 3,4'-di-*O*-metilKampferol; (6) 3,7-di-*O*-metilKampferol.

#### **IV.1.2- Separación e identificación por Cromatografía de Gases-Espectroscopía de Masas.**

El resultado de analizar parte de la Fracción 2 y una muestra completa de la misma por cromatografía de gases fueron los cromatogramas que se observan en las Figuras 12, 13 y 14.

Por espectroscopía de masas se identificaron algunos de los compuestos presentes en esta fracción.

La confirmación de los pesos moleculares viene dada por la presencia en los espectros del ión  $M^+-15$ , característicos de los trimetilsilil derivados por pérdida de un grupo metilo desde el ión  $M^+$ , independiente de la presencia o no del ión molecular, que a veces puede no estar presente.

En el cromatograma correspondiente a la Fracción 2 completa, únicamente se pudo caracterizar uno de los picos, que corresponde al ácido hidroxicinámico. En los otros dos cromatogramas, aparecen dos picos mayoritarios, uno de ellos coincide con el anterior y otro es el ácido 4-hidroxibenzoico.

En los cromatogramas de gases correspondientes a las tres muestras, se caracterizaron los siguientes compuestos:

Pico 1: Ácido Oxálico.

Pico 2: Ácido Metilmalónico.

Pico 3: Este pico no se pudo identificar claramente aunque podría ser Ácido Butírico y/o Metilpropionato, con lo que se decidió ensayar con los dos.

Pico 4: Ácido 3-Hidroxibutírico.

Pico 5: Ácido Hidroxicinámico.

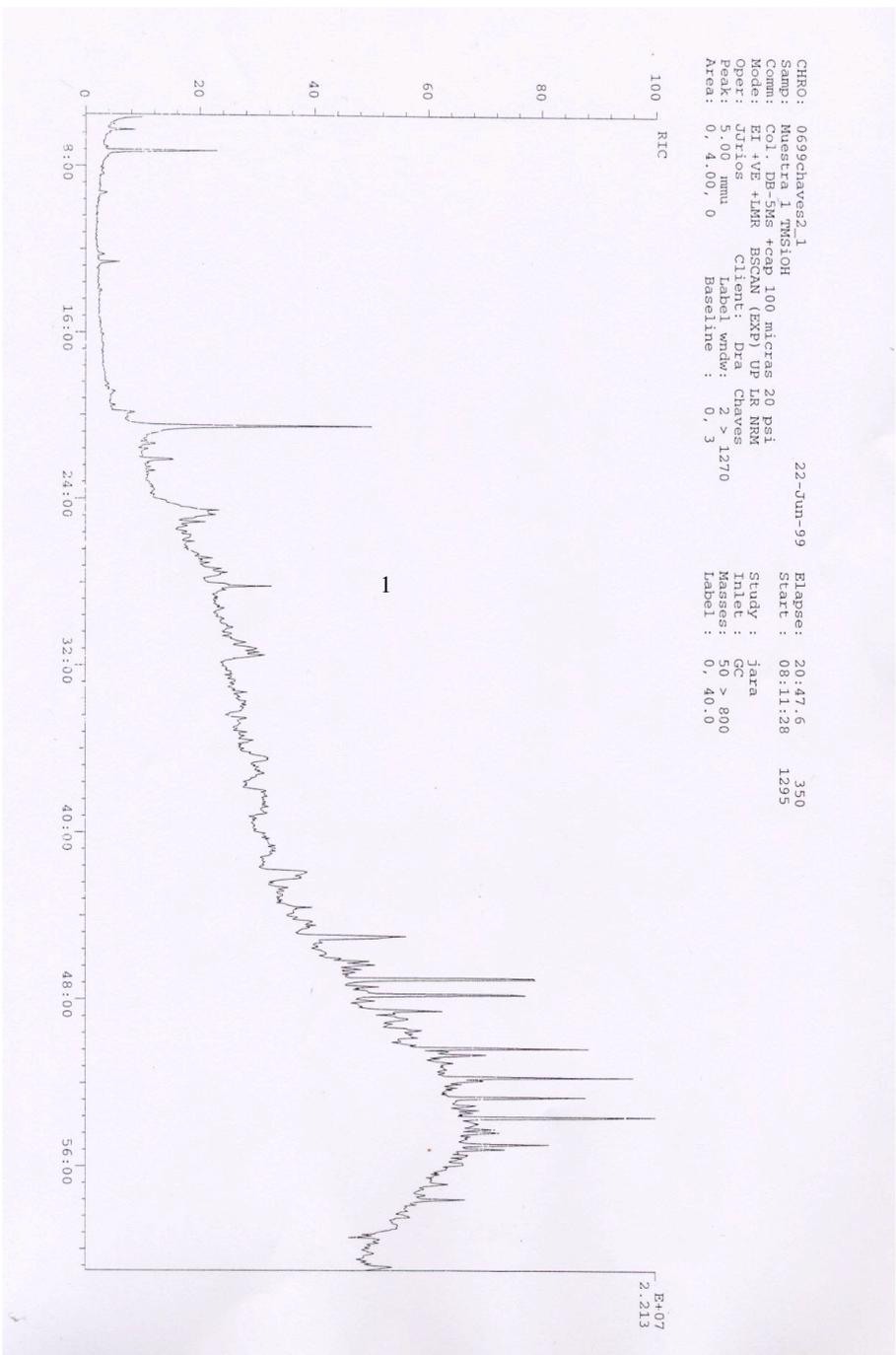
Pico 6: Ácido p-Anísico.

Pico 7: Ácido Cinámico.

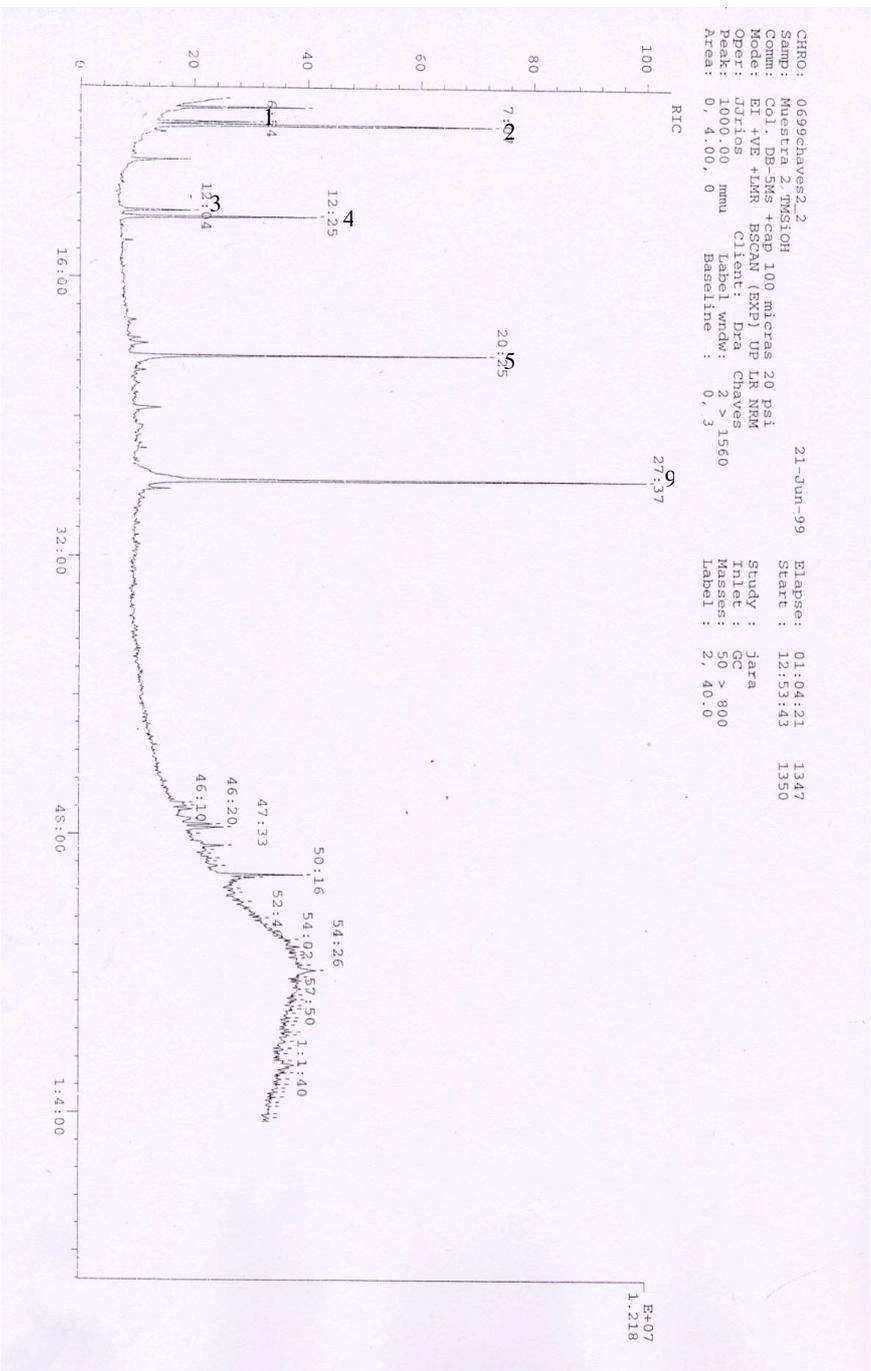
Pico 8: Azuleno.

Pico 9: Ácido 4-Hidroxibenzoico.

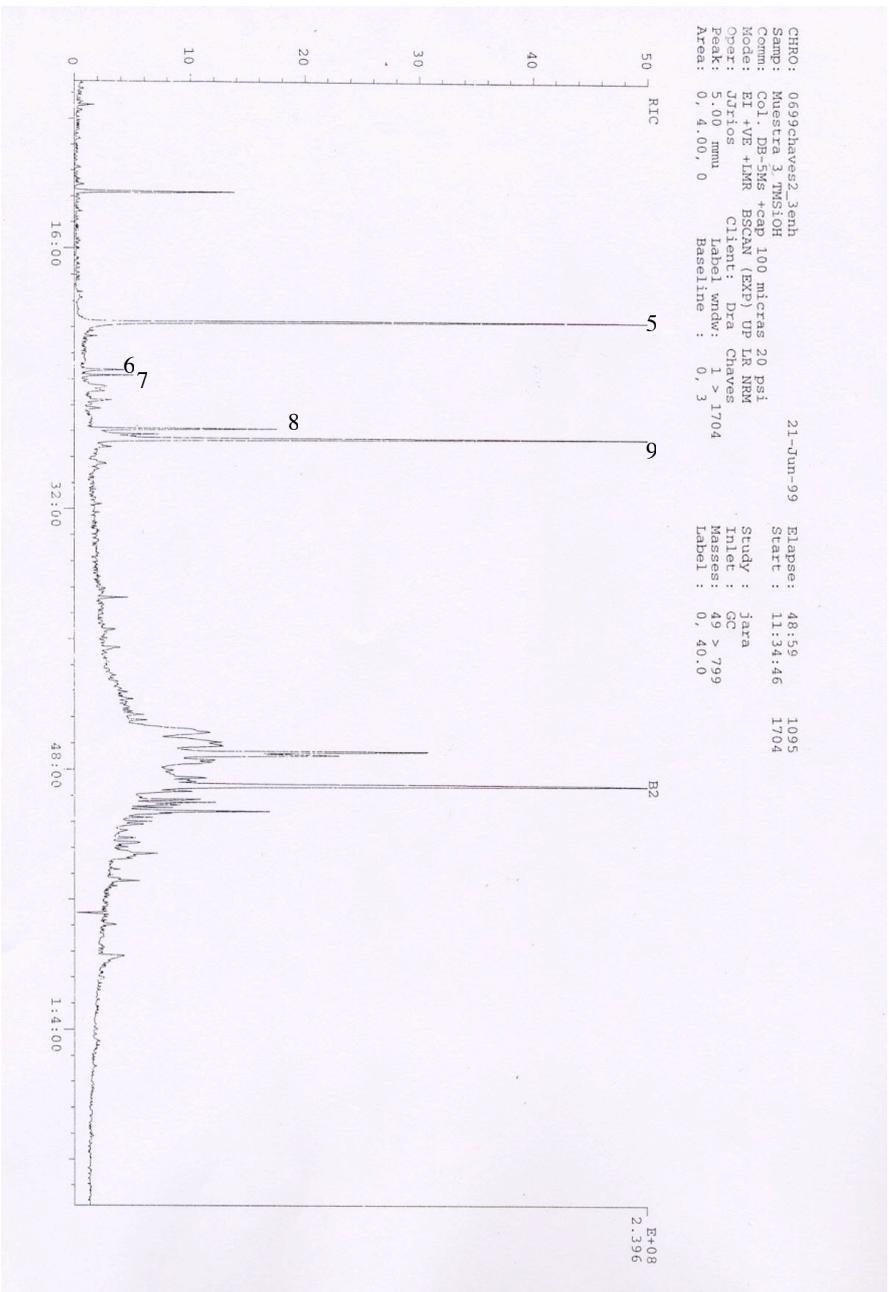
Pico 10: Ácido Ferúlico.



**Figura 12:** Cromatograma obtenido por cromatografía de gases de la fracción 2 completa



**Figura 13:** Cromatograma obtenido por cromatografía de gases de los primeros ocho minutos recogidos en HPLC de la fracción 2.



**Figura 14:** Cromatograma obtenido por cromatografía de gases de los diez primeros minutos recogidos en HPLC de la fracción 2.

## **IV.2.- EFECTO ALELOPÁTICO DEL EXUDADO DE *C. ladanifer* ENSAYOS CON LA ESPECIE *Rumex crispus*.**

### **IV.2.1- Efecto de los flavonoides sobre *R. crispus*. Ensayos utilizando como sustrato papel.**

Los flavonoides pueden presentar actividad alelopática sobre la germinación y/o la emergencia de cotiledones de semillas de *R. crispus*, a tres niveles; inhibiendo la germinación; y/o afectando al desarrollo de las plántulas; y/o produciéndoles retraso en su velocidad de crecimiento.

#### **IV.2.1.1.- Efecto de los flavonoides en la germinación, nacimiento de cotiledones y desarrollo de plántulas de *R. Crispus*.**

Las Tablas 3, 4, 5 y 6 muestran el efecto de 3 flavonas: apigenina (Ap), 4'-*O*-metilapigenina (Ap-4'), 7-*O*-metilapigenina (Ap-7), dos flavonoles: 3-*O*-metilkampferol (K-3), 3,7-*O*-metilkampferol (K-3,7), y la acción conjunta de estos últimos flavonoides sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y sobre el crecimiento de la raíz y cotiledones de *R. crispus*, a concentraciones comprendidas entre 1mM y 0,05mM.

El porcentaje de germinación y nacimiento de cotiledones no se muestran afectados significativamente por ninguno de estos compuestos, sin embargo la longitud de las raíces eran inhibidos significativamente ( $p < 0,05$ ) por las concentraciones de 1 y 0,5mM de Ap-4' y K-3,7.

Se observa en la acción del K-3,7 un incremento en el porcentaje de inhibición con la concentración de 1mM comparada con la concentración 0,5mM, implicando en

este caso que la inhibición es dependiente de la concentración. Esta dependencia con la concentración no es detectada ni en la Ap-4' ni en la mezcla de K-3 con el K-3,7. La actividad del K-3,7 a 0,5mM es comparable a la que muestra la flavona.

Con respecto al tamaño de los cotiledones ningún flavonoide de los ensayados por separado ejercen efecto sobre ellos, pero sí, aparecen cotiledones más pequeños cuando actúan conjuntamente el K-3,7 y el K-3. La interacción entre estos dos flavonoles repercute de forma diferente en el tamaño de la raíz y en los cotiledones. Sobre el tamaño de la raíz, la acción conjunta de los dos, es menor que cuando actúa el K-3,7 por sí solo, sin embargo la acción sobre los cotiledones resulta más eficaz cuando actúan conjuntamente ( $p < 0,05$ ) que cuando se ensayan por separado.

**Tabla 3:** Efecto de los flavonoides aislados del exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1; 0,5; 0,1 y 0,05mM) sobre la germinación de *R. crispus* , expresada como porcentaje respecto del control.

	Germinación (%)			
	concentración			
	1mM	0,5mM	0,1 mM	0,05mM
<b>Ap</b>	95,7	102,4	106,9	95,2
<b>Ap-4'</b>	91,7	97,1	103,1	102,5
<b>Ap-7</b>	96,4	95,9	97,5	107,6
<b>K-3</b>	110,4	108,7	108,1	103,7
<b>K-3,7</b>	98,2	110,1	102,4	99,3
<b>K-3 + K-3,7</b>	91,5	95,7	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

Ap-4': 4'-*O* -metilapigenina

Ap-7: 7-*O* -metilapigenina

K-3: 3-*O* -metilkampferol

K-3,7: 3,7-di-*O* -metilkampferol

K-3 + K-3,7: 3-*O* -metilkampferol y 3,7-di-*O* -metilkampferol

**Tabla 4:** Efecto de los flavonoides aislados del exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1; 0,5; 0,1 y 0,05mM) en la emergencia de cotiledones de *R. crispus* , expresado como porcentaje respecto del control.

	Cotiledones (%)			
	concentración			
	1mM	0,5mM	0,1mM	0,05mM
<b>Ap</b>	96,1	102,0	108,6	99,2
<b>Ap-4'</b>	88,8	95,2	112,5	103,7
<b>Ap-7</b>	92,2	89,9	100,3	108,4
<b>K-3</b>	104,6	105,1	117,0	108,9
<b>K-3,7</b>	95,5	88,9	97,5	104,0
<b>K-3 + K-3,7</b>	85,6	93,0	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

Ap-4': 4'-*O* -metilapigenina

Ap-7: 7-*O* -metilapigenina

K-3: 3-*O* -metilkampferol

K-3,7: 3,7-di-*O* -metilkampferol

K-3 + K-3,7: 3-*O* -metilkampferol y 3,7-di-*O* -metilkampferol

**Tabla 5:** Efecto de los flavonoides aislados del exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1; 0,5; 0,1 y 0,05mM) en el tamaño de la raíz de *R. crispus*, expresado como porcentaje respecto del control.

	Longitud de raíz (%)			
	concentración			
	1mM	0,5mM	0,1mM	0,05mM
<b>Ap</b>	94,6	93,5	95,6	95,0
<b>Ap-4'</b>	76,2*	71,3*	97,1	101,1
<b>Ap-7</b>	101,2	91,2	90,7	100,6
<b>K-3</b>	98,9	99,0	88,4	97,2
<b>K-3,7</b>	19,2*	72,3*	103,9	94,0
<b>K-3 + K-3,7</b>	69,5*	75,8*	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

Ap-4': 4'-*O* -metilapigenina

Ap-7: 7-*O* -metilapigenina

K-3: 3-*O* -metilkampferol

K-3,7: 3,7-di-*O* -metilkampferol

K-3 + K-3,7: 3-*O* -metilkampferol y 3,7-di-*O* -metilkampferol

**Tabla 6:** Efecto de los flavonoides aislados del exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1; 0,5; 0,1 y 0,05mM) en el tamaño de cotiledones de *R. crispus*, expresado como porcentaje respecto del control.

	Longitud de cotiledones (%)			
	concentración			
	1mM	0,5mM	0,1mM	0,05mM
<b>Ap</b>	101,1	100,9	103,4	100,6
<b>Ap-4'</b>	103,7	110,4	103,4	110,4
<b>Ap-7</b>	81,2	88,4	113,5	106,5
<b>K-3</b>	97,3	96,8	113,4	103,9
<b>K-3,7</b>	95,0	94,1	105,9	100,5
<b>K-3 + K-3,7</b>	78,5*	78,8*	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

Ap-4': 4'-*O* -metilapigenina

Ap-7: 7-*O* -metilapigenina

K-3: 3-*O* -metilkampferol

K-3,7: 3,7-di-*O* -metilkampferol

K-3 + K-3,7: 3-*O* -metilkampferol y 3,7-di-*O* -metilkampferol

#### **IV.2.1.2- Efecto de los flavonoides en la velocidad de germinación y nacimiento de cotiledones de plántulas de *R. Crispus*.**

Las Tablas 7 y 8 muestran el índice de vigor de la germinación y cotiledones relativa para cada uno de los flavonoides ensayados. Las concentraciones ensayadas están comprendidas entre 1 y 0,05mM. Este índice cuantifica el posible efecto que se ejerce en el retraso de la germinación y nacimiento de cotiledones, siendo una medida útil para conocer el grado de efecto en el desarrollo de las plántulas y la posibilidad competitiva que puedan tener. Los flavonoides por sí solos no afectan a la velocidad de nacimiento de cotiledones ni a la velocidad de germinación, pero sí se aprecia retraso en el nacimiento de cotiledones cuando se ensaya con la mezcla de estos dos flavonoles ( $p < 0,05$ ). Aunque la velocidad de germinación no resulta afectado, las concentraciones altas de K-3 y K-3,7 tienen una clara influencia en el tiempo necesario para que aparezcan los cotiledones, necesitando más tiempo para que este proceso ocurra.

**Tabla 7:** Efecto de los flavonoides aislados del exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1; 0,5; 0,1 y 0,05mM) en el Índice de Vigor en la germinación de *R. crispus*, expresado como porcentaje respecto del control.

	IVG (%)			
	concentración			
	1mM	0,5mM	0,1 mM	0,05mM
<b>Ap</b>	95,7	106,7	100,0	97,2
<b>Ap-4'</b>	97,2	87,9	95,6	105,0
<b>Ap-7</b>	91,0	89,1	91,1	99,0
<b>K-3</b>	104,0	109,3	110,0	109,0
<b>K-3,7</b>	97,9	90,2	91,8	99,4
<b>K-3 + K-3,7</b>	87,9	92,7	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

Ap-4': 4'-*O* -metilapigenina

Ap-7: 7-*O* -metilapigenina

K-3: 3-*O* -metilkampferol

K-3,7: 3,7-di-*O* -metilkampferol

K-3 + K-3,7: 3-*O* -metilkampferol y 3,7-di-*O* -metilkampferol

**Tabla 8:** Efecto de los flavonoides aislados del exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1; 0,5; 0,1 y 0,05mM) en el Índice de Vigor en la emergencia de cotiledones de *R. crispus*, expresado como porcentaje respecto del control.

	IVC (%)			
	concentración			
	1mM	0,5mM	0,1mM	0,05mM
<b>Ap</b>	98,3	103	100,2	103,3
<b>Ap-4'</b>	90,6	95,7	107,8	105,5
<b>Ap-7</b>	96,7	93	100,2	103
<b>K-3</b>	112	106	108	103,6
<b>K-3,7</b>	103,8	115,3	93,6	92,7
<b>K-3 + K-3,7</b>	76,6*	79,0*	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

Ap-4': 4'-*O* -metilapigenina

Ap-7: 7-*O* -metilapigenina

K-3: 3-*O* -metilkampferol

K-3,7: 3,7-di-*O* -metilkampferol

K-3 + K-3,7: 3-*O* -metilkampferol y 3,7-di-*O* -metilkampferol

#### **IV.2.2.- Efecto de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre *R. crispus*. Ensayos utilizando sustrato papel.**

Al igual que los flavonoides, la actividad alelopática del resto de compuestos identificados pueden afectar a las semillas de *R. crispus*, a tres niveles; inhibiendo la germinación, y/o afectando al desarrollo de las plántulas, y/o produciéndoles retraso en su velocidad de crecimiento.

##### ***IV.2.2.1.- Efecto de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y desarrollo de las plántulas de *R. crispus*.***

Las Tablas 9, 10, 11 y 12 muestran el efecto de los compuestos identificados en el exudado de *C. ladanifer*: ácido oxálico (1), ácido metilmalónico (2), ácido butírico (3), ácido metilpropionato (4), ácido 3-hidroxi-butírico (5), ácido hidroxicinámico (6), ácido p-anísico (7), ácido cinámico (8), azuleno (9), ácido 4-hidroxi-benzoico (10) y ácido ferúlico (11), en la germinación, nacimiento de cotiledones e inhibición del tamaño de la raíz y cotiledones de *R. crispus*, con las concentraciones comprendidas entre 1 y 0,0001mM. Para cada uno de estos compuestos, la concentración más baja ensayada era aquella, en la que no existía efecto significativo ( $p > 0,05$ ) en los parámetros considerados.

Observando los resultados, se pueden distinguir diferentes comportamientos:

El ácido butírico (3) y el ácido metilpropionato (4) son los únicos que presentan una inhibición total del porcentaje de germinación y cotiledones hasta una concentración de 0,05mM. A partir de esta concentración la germinación no se inhibe totalmente, pero sigue teniendo efecto significativo respecto al control hasta una concentración de 0,001mM, a partir de la cual no se encuentran diferencias significativas.

Ácido butírico (3), ácido metilpropionato (4) y ácido cinámico (8) afectan al porcentaje de germinación y cotiledones, y a la longitud de raíces y cotiledones.

Ácido hidroxicinámico (6), ácido p-anísico (7) y ácido 4-hidroxibenzoico (10) actúan sobre al tamaño de las plántulas afectando al tamaño de raíz y cotiledones.

El ácido metilmalónico (2) afecta solo a cotiledones; al porcentaje y su longitud.

El azuleno (9) afecta a la longitud de la raíz, que además de ser más pequeñas muestran oscurecimiento en las puntas. Esto puede deberse a un incremento de la reducción del ácido ascórbico en los vasos del xilema, Rice (1984), o por simple oxidación de compuestos fenólicos (Inderjit y Dakshini, 1991).

Y el ácido oxálico (1), ácido 3-hidroxibutírico (5) y ácido ferúlico (11) afectan únicamente a la longitud de cotiledones.

Con estos resultados se pueden distinguir con respecto a la actividad alelopática, tres grupos; compuestos con baja actividad: ácido oxálico (1), ácido metilmalónico (2), ácido 3-hidroxibutírico (5), ácido p-anísico (7), azuleno (9), ácido 4-hidroxibenzoico (10) y ácido ferúlico (11), compuestos con actividad intermedia: ácido hidroxicinámico (6) y ácido cinámico (8), y compuestos con alta actividad: ácido butírico (3) y ácido metilpropionato (4).

Con respecto a la germinación y nacimiento de cotiledones (Tabla 9 y 10) los compuestos: ácido oxálico (1), ácido metilmalónico (2), ácido 3-hidroxibutírico (5), ácido p-anísico (7), azuleno (9), ácido 4-hidroxibenzoico (10) y ácido ferúlico (11) no demuestran ningún efecto significativo ( $p > 0,05$ ) a las concentraciones ensayadas. Por el contrario, se observa que todos afectan negativamente en el desarrollo de las plántulas, pues inhiben el tamaño de las raíces y el de los cotiledones (Tabla 11 y 12).

Los compuestos: ácido p-anísico (7), azuleno (9) y ácido 4-hidroxibenzoico (10) inhiben el tamaño de la raíz a la concentración de 1mM y desde 0,5mM el azuleno (9). El número de compuestos que actúan negativamente sobre el tamaño de los cotiledones es aún mayor, pues todos a excepción del azuleno (9) lo inhiben, aunque a

concentraciones diferentes, siendo más efectivos el ácido oxálico (**1**), y el ácido ferúlico (**11**) que inhiben desde 0,5mM.

Los compuestos ácido hidroxicinámico (**6**) y ácido cinámico (**8**), son más activos que los anteriores. El ácido cinámico (**8**) inhibe la germinación a la concentración de 1mM, el nacimiento de cotiledones se ve afectado negativamente por ambos compuestos, hasta la concentración de 0,5mM con el ácido cinámico (**8**) y únicamente a la concentración de 1mM con el ácido hidroxicinámico (**6**) (Tabla 9 y 10). En ambos *aleloquímicos* se observa un incremento en el porcentaje de inhibición en el nacimiento de cotiledones con la concentración, pero únicamente el ácido cinámico (**8**) tiene una relación dependiente de la concentración ( $r^2=0,99$ ).

Con respecto al tamaño de la raíz (Tabla 11 y 12), el ácido hidroxicinámico (**6**) y ácido cinámico (**8**) inhiben fuertemente a 1mM, disminuyendo este efecto negativo con la concentración ( $r^2=0,98$  y  $r^2=0,9$  para el **6** y **8** respectivamente). El tamaño de los cotiledones sólo es inhibido por el ácido hidroxicinámico (**6**) ya la máxima concentración y hasta 0,5mM por el ácido cinámico (**8**), existiendo igualmente una relación dependiente de la concentración.

Por último los compuestos más activos son el ácido butírico (**3**) y el ácido metilpropionato (**4**). Ambos inhiben la germinación por completo hasta 0,05mM y presentan un fuerte efecto a 0,01mM. En el nacimiento de cotiledones aún son más efectivos, inhibiendo hasta la concentración de 0,01mM el ácido butírico (**3**) y hasta 0,001mM el ácido metilpropionato (**4**).

El tamaño de la raíz es inhibido por y el ácido metilpropionato (**4**) a concentraciones superiores de 0,01mM y de 0,0001mM por el el ácido butírico (**3**). Igualmente se ve afectado el tamaño de los cotiledones por encima de 0,001mM con el ácido butírico (**3**) y de 0,05mM con el ácido metilpropionato (**4**).

**Tabla 9:** Efecto de los *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1mM a 0,0001mM) en la germinación de *R. crispus*, expresado como porcentaje relativo al control.

	Germinación (%)						
	concentración						
	1mM	0,5mM	0,1mM	0,05mM	0,01mM	0,001mM	0,0001mM
<b>Acido Oxálico (1)</b>	109,8	86,1	-	-	-	-	-
<b>Acido Metilmalónico (2)</b>	102,0	88,9	-	-	-	-	-
<b>Acido Butírico (3)</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	10,2*	91,4	98,3
<b>Metilpropionato (4)</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	77,7*	85,3	104,0
<b>Acido 3-Hidroxibutírico (5)</b>	108,8	95,3	-	-	-	-	-
<b>Acido Hidroxicinámico (6)</b>	95,0	88,7	92,5	-	-	-	-
<b>Ácido p-Anísico (7)</b>	107,3	106,5	-	-	-	-	-
<b>Acido Cinámico (8)</b>	77,4*	95,2	96,5	94,1	-	-	-
<b>Azuleno (9)</b>	103,2	106,6	103,2	-	-	-	-
<b>Acido 4-Hidroxibenzoico (10)</b>	112,0	97,9	89,8	-	-	-	-
<b>Acido Ferúlico (11)</b>	115,0	96,7	-	-	-	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 10:** Efecto de los *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1mM a 0,0001mM) en la emergencia de cotiledones de *R. crispus*, expresado como porcentaje relativo al control.

	Cotiledones (%)						
	concentración						
	1mM	0,5mM	0,1mM	0,05mM	0,01mM	0,001mM	0,0001mM
<b>Acido Oxálico (1)</b>	101,92	86,28	-	-	-	-	-
<b>Acido Metilmalónico (2)</b>	108,87	101,45	-	-	-	-	-
<b>Acido Butírico (3)</b>	0	0	0	0	0	90,8	97,98
<b>Metilpropionato (4)</b>	0	0	0	0	71,7*	84,86*	108,59
<b>Acido 3-Hidroxibutírico (5)</b>	104,17	96,14	-	-	-	-	-
<b>Acido Hidroxicinámico (6)</b>	52,29*	88,98	93,25	-	-	-	-
<b>Acido p-Anísico (7)</b>	107,69	108,52	-	-	-	-	-
<b>Acido Cinámico (8)</b>	60,58*	75,82*	89,9	94,29	-	-	-
<b>Azuleno (9)</b>	105,3	109,6	104	-	-	-	-
<b>Acido 4-Hidroxibenzoico (10)</b>	105	100,27	83,59	-	-	-	-
<b>Ácido Ferúlico (11)</b>	111,46	98,69	-	-	-	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 11:** Efecto de los *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1mM a 0,0001mM) sobre la longitud de la raíz de *R. crispus*, expresado como porcentaje relativo al control.

	Longitud de raíz (%)						
	concentración						
	1mM	0,5mM	0,1mM	0,05mM	0,01mM	0,001mM	0,0001mM
<b>Acido Oxálico (1)</b>	84,2	87,7	-	-	-	-	-
<b>Acido Metilmalónico (2)</b>	80,3	85,4	-	-	-	-	-
<b>Acido Butírico (3)</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	8,1*	82,0*	103,8
<b>Metilpropionato (4)</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	93,9	87,2	97,6
<b>Acido 3-Hidroxibutírico (5)</b>	87,3	103,6	-	-	-	-	-
<b>Acido Hidroxicinámico (6)</b>	44,9*	70,2*	82,4	-	-	-	-
<b>Ácido p-Anísico (7)</b>	75,7*	90,8	-	-	-	-	-
<b>Acido Cinámico (8)</b>	9,2*	30,3*	60,3*	84,9*	-	-	-
<b>Azuleno (9)</b>	32,3*	77,0*	82,5	-	-	-	-
<b>Acido 4-Hidroxibenzoico (10)</b>	76,7*	85,6	81,2	-	-	-	-
<b>Acido Ferúlico (11)</b>	85,1	89,0	-	-	-	-	-

\*significativamente diferente al control p<0,05 (Mann-Whitney U-test)

**Table 12:** Efecto de los *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1mM a 0,0001mM) sobre la longitud de cotiledones de *R. crispus* , expresado como porcentaje relativo al control.

	Longitud de cotiledones (%)						
	concentración						
	1mM	0,5mM	0,1mM	0,05mM	0,01mM	0,001mM	0,0001mM
<b>Acido Oxálico (1)</b>	72,83*	84,75*	-	-	-	-	-
<b>Acido Metilmalónico (2)</b>	74,14*	92,22	-	-	-	-	-
<b>Acido Butírico (3)</b>	0	0	0	0	0	92,78	110,24
<b>Metilpropionato (4)</b>	0	0	0	0	92,89	95,4	104,67
<b>Acido 3-Hidroxibutírico (5)</b>	72,44*	90,26	-	-	-	-	-
<b>Acido Hidroxicinámico (6)</b>	51,12*	94,86	89,13	-	-	-	-
<b>Acido p-Anísico (7)</b>	72,86*	90,61	-	-	-	-	-
<b>Acido Cinámico (8)</b>	48,99*	82,38*	101,13	91,15	-	-	-
<b>Azuleno (9)</b>	98,2	106,9	97,2	-	-	-	-
<b>Acido 4-Hidroxibenzoico (10)</b>	63,14*	95,85	86,72	-	-	-	-
<b>Ácido Ferúlico (11)</b>	74,39*	84,94*	-	-	-	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

#### **IV.2.2.2.- Efecto de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la velocidad de germinación y nacimiento de cotiledones de plántulas de *R. crispus*.**

Las Tablas 13 y 14 muestran el índice de vigor de la geminación y cotiledones relativo para cada uno de los *aleloquímicos* ensayados. Las concentraciones están comprendidas entre 1 y 0,0001mM. Este índice cuantifica el posible efecto que se ejerce en el retraso de la germinación y nacimiento de cotiledones, siendo una medida útil para conocer el grado de efecto en el desarrollo de las plántulas y posibilidad competitiva que puedan tener. Según este índice, los compuestos: ácido metilmalónico (**2**) ácido 3-hidroxibutírico (**5**), azuleno (**9**) y ácido ferúlico (**11**), no presentan retraso en la germinación ni en la emergencia de cotiledones.

El ácido oxálico (**1**), ácido hidroxicinámico (**6**), ácido p-anísico (**7**) y ácido 4-hidroxibenzoico (**10**) no presentaban diferencia significativa en el porcentaje de germinación, sin embargo, si presentan cierto retraso en la velocidad de germinación. Este retraso en ácido oxálico (**1**) y ácido p-anísico (**7**) se observa a una concentración de 1mM, en ácido 4-hidroxibenzoico (**10**) hasta 0,5mM y en ácido hidroxicinámico (**6**) hasta una concentración de 0,1mM.

El ácido butírico (**3**), ácido metilpropionato (**4**) afectan al porcentaje de germinación hasta una concentración de 0,01mM y a partir de estas concentraciones también se observa un retraso en la germinación hasta una concentración de 0,001mM. Al igual que estos compuestos, el afecta al porcentaje de germinación a 1mM y presenta retraso hasta una concentración de 0,01mM. Respecto a los cotiledones, se observa que el ácido cinámico (**8**) afecta a la emergencia de los cotiledones hasta 0,1mM y a la velocidad de emergencia de los cotiledones hasta una concentración de 0,01mM.

El ácido oxálico (**1**) y ácido 4-hidroxibenzoico (**10**), aunque no afectan al nacimiento de cotiledones, presentan un retraso hasta concentraciones de 1 y 0,5mM respectivamente, y en ácido butírico (**3**), ácido metilpropionato (**4**) ácido hidroxicinámico (**6**), ácido cinámico (**8**) se observa que además de afectar al nacimiento

de cotiledones, presentan retraso en el nacimiento de los cotiledones hasta una concentración de 0,01mM en ácido butírico (3), ácido metilpropionato (4) y ácido cinámico (8); y hasta 0,1mM en ácido hidroxicinámico (6).

**Tabla 13:** Efecto de los *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1mM a 0,0001mM) en el Índice de Vigor en la germinación de *R. crispus*, expresado como porcentaje relativo al control.

	IVG respecto control						
	concentración						
	1mM	0,5mM	0,1mM	0,05mM	0,01mM	0,001mM	0,0001mM
<b>Acido Oxálico (1)</b>	98,4	71*	-	-	-	-	-
<b>Acido Metilmalónico (2)</b>	113,4	109,4	-	-	-	-	-
<b>Acido Butírico (3)</b>	0	0	0	0	4,7*	72,8*	97,6
<b>Metilpropionato (4)</b>	0	0	0	0	59*	74,6*	100
<b>Acido 3-Hidroxibutírico (5)</b>	94,8	98,2	-	-	-	-	-
<b>Acido Hidroxicinámico (6)</b>	52,2*	72,7*	81,7*	-	-	-	-
<b>Ácido p-Anísico (7)</b>	89,7*	107,5	-	-	-	-	-
<b>Acido Cinámico (8)</b>	61,9*	63,7*	79,8*	61,6*	-	-	-
<b>Azuleno (9)</b>	102,9	117,6	-	-	-	-	-
<b>Acido 4-Hidroxibenzoico (10)</b>	83,3*	89,9	79,7*	-	-	-	-
<b>Acido Ferúlico (11)</b>	104,5	100,9	-	-	-	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 14:** Efecto de los *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1mM a 0,0001mM) en el Índice de Vigor en la emergencia de cotiledones de *R. crispus*, expresado como porcentaje relativo al control.

	IVC respecto control						
	concentración						
	1mM	0,5mM	0,1mM	0,05mM	0,01mM	0,001mM	0,0001mM
<b>Acido Oxálico (1)</b>	91,3	74,7*	-	-	-	-	-
<b>Acido Metilmalónico (2)</b>	114,1	110,4	-	-	-	-	-
<b>Acido Butírico (3)</b>	0	0	0	0	0	77,6*	128,3
<b>Metilpropionato (4)</b>	0	0	0	0	62*	75,9*	133,3
<b>Acido 3-Hidroxibutírico (5)</b>	86,4	98,1	-	-	-	-	-
<b>Acido Hidroxicinámico (6)</b>	33,5*	81,3*	88,2	-	-	-	-
<b>Acido p-Anísico (7)</b>	81,6*	112,5	-	-	-	-	-
<b>Acido Cinámico (8)</b>	27,2*	49,9*	76,5*	63*	-	-	-
<b>Azuleno (9)</b>	99	151*	-	-	-	-	-
<b>Acido 4-Hidroxibenzoico (10)</b>	84,7*	101,7	89,3	-	-	-	-
<b>Ácido Ferúlico (11)</b>	101,6	106,8	-	-	-	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

***IV.2.2.3.- Efecto de la interacción de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y desarrollo de las plántulas de R. crispus.***

La Tabla 15 muestra el efecto en la germinación de la acción conjunta de los *aleloquímicos* identificados en *C. ladanifer*.

Como puede observarse, todas las combinaciones ensayadas de los diferentes compuestos producen inhibiciones en la germinación y desarrollo de las plántulas más efectivas que cuando el compuesto actúa por separado.

La *Mezcla 1* muestra un comportamiento sinérgico a 1mM, en la inhibición de la germinación, disminuyendo prácticamente el 60% la germinación. Este efecto desaparece a 0,5mM. Cuando a esta mezcla se le añade el ácido hidroxicinámico, se potencia el efecto inhibitor y más aún cuando actúa conjuntamente con el ácido cinámico, potenciando la acción inhibitoria de los otros compuestos incluso a 0,5mM.

Aunque los compuestos de la *Mezcla 5* no inhiben la germinación por sí solos, si afectan negativamente en la germinación cuando actúan conjuntamente. El ácido cinámico, al igual que en el caso anterior, potencia la acción de inhibición, reduciendo el porcentaje de germinación hasta hacerlo prácticamente nulo.

El nacimiento de cotiledones (Tabla 16) es fuertemente afectado cuando estos compuestos actúan conjuntamente. La interacción derivada de estos compuestos afectan de forma más efectiva en la emergencia de los cotiledones que directamente sobre la germinación. De la misma manera que ocurre en la germinación, cuando el ácido cinámico se añade, se ve potenciada la acción de éstos, reduciéndose prácticamente a cero el nacimiento de cotiledones. Cuando la concentración disminuye (0,5mM) el efecto se atenúa, a excepción de la mezcla de todos los *aleloquímicos*.

La longitud de la raíz y longitud de cotiledones es afectada en forma diferente. El tamaño de la raíz (Tabla 17) queda negativamente afectado con todas las mezclas. La reducción del tamaño a la concentración de 1mM es tan fuerte con todas las mezclas,

que las plántulas son prácticamente inviábiles. Por el contrario, como puede observarse en la Tabla 18, el tamaño de los cotiledones en aquellos tratamientos en los que han nacido, son menos afectados negativamente. Incluso la *Mezcla 1* a 1mM no afecta significativamente a su tamaño. A diferencia de lo que ocurre en los otros índices, es el ácido hidroxicinámico el que potencia la acción inhibitoria de los otros compuestos (a 1mM) cuando éste es añadido.

**Tabla 15:** Efecto de la mezcla de *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a dos concentraciones (1 y 0,5mM) en la germinación de *R. crispus* expresado como porcentaje relativo al control.

Tratamiento	Germinación (%)	
	1 mM	0,5 mM
Ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno (1)	40,3	97,3*
+ ácido hidroxicinámico (2)	20,8	74,3
+ ácido cinámico (3)	3,8	39,4
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (4)	4,5	34,4
Ácido felúrico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, y ácido 3-hidroxibutírico (5)	10,0	49,7
+ ácido hidroxicinámico (6)	7,9	38,3
+ ácido cinámico (7)	0,6	20,5
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (8)	0,0	18,5
Acido cinámico y ácido hidroxicinámico (9)	15,4	72,2
Ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido p-anísico, ácido cinámico, ácido hidroxicinámico, ácido metilmalónico, ácido 3-hidroxibutírico y azuleno (10)	0,6	7,4

\*significativamente no diferente al control p<0,05 (Mann-Whitney U-test)

(1) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con ellos solos.

(5) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de los cotiledones.

(9) Mezcla de los compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación.

(10) Mezcla de todos los compuestos.

**Tabla 16:** Efecto de la mezcla de *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a dos concentraciones (1 y 0,5mM) en el nacimiento de cotiledones de *K. crispus* expresado como porcentaje relativo al control.

Tratamiento	Cotiledones (%)	
	Concentración	
	1 mM	0,5 mM
Ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno (1)	36,7	76
+ ácido hidroxicinámico (2)	2,1	53,3
+ ácido cinámico (3)	1,4	24,4
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (4)	0,0	20,5
Ácido felúrico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, y ácido 3-hidroxibutírico (5)	5,2	39,8
+ ácido hidroxicinámico (6)	0,0	19,0
+ ácido cinámico (7)	0,0	6,0
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (8)	0,0	4,9
Acido cinámico y ácido hidroxicinámico (9)	5,3	49,0
Ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido p-anísico, ácido cinámico, ácido hidroxicinámico, ácido metilmalónico, ácido 3-hidroxibutírico y azuleno (10)	0,0	0,0

\*significativamente no diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

(1) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con ellos solos

(5) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de los cotiledones.

(9) Mezcla de los compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación

(10) Mezcla de todos los compuestos.

**Tabla 17:** Efecto de la mezcla de *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a dos concentraciones (1 y 0,5mM) en la longitud de la raíz de *R. crispus* expresado como porcentaje relativo al control.

Tratamiento	Longitud de raíz (%)	
	Concentración	
	1 mM	0,5 mM
Ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno (1)	8,7	79
+ ácido hidroxicinámico (2)	3,9	18,0
+ ácido cinámico (3)	3,9	12,0
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (4)	3,9	3,9
Ácido felúrico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, y ácido 3-hidroxi-butírico (5)	3,9	10,8
+ ácido hidroxicinámico (6)	6,8	6,4
+ ácido cinámico (7)	0,9	3,9
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (8)	0,0	4,9
Acido cinámico y ácido hidroxicinámico (9)	4,6	37,5
Ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido p-anísico, ácido cinámico, ácido hidroxicinámico, ácido metilmalónico, ácido 3-hidroxi-butírico y azuleno (10)	1,2	7,5

\*significativamente no diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

(1) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con ellos solos

(5) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de los cotiledones.

(9) Mezcla de los compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación

(10) Mezcla de todos los compuestos.

**Tabla 18:** Efecto de la mezcla de *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a dos concentraciones (1 y 0,5mM) en la longitud de cotiledones de *R. crispus* expresado como porcentaje relativo al control.

Tratamiento	Longitud de Cotiledones (%)	
	Concentración	
	1 mM	0,5 mM
Ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno (1)	90*	92*
+ ácido hidroxicinámico (2)	19,0	82,0
+ ácido cinámico (3)	40,0	61,0
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (4)	0,0	82,0
Ácido felúrico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, y ácido 3-hidroxibutírico (5)	34	102*
+ ácido hidroxicinámico (6)	0,0	59,0
+ ácido cinámico (7)	0,0	52,0
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (8)	0,0	22,0
Acido cinámico y ácido hidroxicinámico (9)	52,8	86,1*
Ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido p-anísico, ácido cinámico, ácido hidroxicinámico, ácido metilmalónico, ácido 3-hidroxibutírico y azuleno (10)	0,0	0,0

\*significativamente no diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

(1) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con ellos solos.

(5) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de los cotiledones.

(9) Mezcla de los compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación.

(10) Mezcla de todos los compuestos.

#### **IV.2.2.4.- Efecto de la interacción de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la velocidad de germinación y nacimiento de cotiledones de plántulas de *R. crispus*.**

En las Tablas 19 y 20 se muestran el índice de vigor de la germinación y cotiledones para las diferentes mezclas. De forma similar que para el porcentaje de germinación y cotiledones, todas las mezclas ensayadas de los diferentes compuestos provocan un retraso mayor en la germinación y en la aparición de cotiledones que cuando los *aleloquímicos* actúan solos. En todas ellas, a excepción de la *Mezcla 1* a 1mM, se aprecia también un mayor retraso en el nacimiento de cotiledones que en la germinación.

La *Mezcla 1* muestra un comportamiento sinérgico a 1 y 0,5mM en la velocidad de la germinación y nacimiento de cotiledones. Cuando a esta mezcla se le añade el ácido hidroxicinámico (6), se potencia el efecto inhibitor y más aún cuando se le añade el ácido cinámico (8).

Cuando se ensaya con la *Mezcla 5*, aunque ácido metilmalónico (2), ácido 3-hidroxi-butírico (5) y ácido ferúlico (11) por sí solos, no provocan retraso en la germinación ni en el nacimiento de cotiledones y el ácido oxálico (1) y ácido p-anísico (7) sólo ejerce retraso en la germinación a 1mM, cuando actúan en conjunto los cinco, se potencia considerablemente este efecto. El ácido hidroxicinámico (6) y ácido cinámico (8), al igual que en el caso anterior, potencian la acción de inhibición reduciendo el porcentaje de germinación prácticamente a cero.

Los compuestos que forman la *Mezcla 9*, cuando se ensayan por separado presentan retraso en la germinación y nacimiento de cotiledones pero cuando actúan conjuntamente el efecto se potencia, obteniéndose unos valores del IVG y IVC mucho más bajos.

Los compuestos que forman la *Mezcla 10* presentan también un efecto sinérgico tan fuerte que no hay germinación ni nacimiento de cotiledones.

**Tabla 19:** Efecto de la mezcla de *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a dos concentraciones (1 y 0,5mM) en el Índice de Vigor de la germinación de *R. crispus*, expresado como porcentaje relativo al control.

Tratamiento	IVG (%)	
	Concentración	
	1 mM	0,5 mM
Ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno (1)	34,8	75,9
+ ácido hidroxicinámico (2)	9,4	42,3
+ ácido cinámico (3)	2,0	21,6
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (4)	2,3	18,4
Ácido felúrico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, y ácido 3-hidroxibutírico (5)	5,1	36,5
+ ácido hidroxicinámico (6)	3,3	21,4
+ ácido cinámico (7)	0,3	9,7
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (8)	0,0	7,7
Ácido cinámico y ácido hidroxicinámico (9)	7,1	42,6
Ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido p-anísico, ácido cinámico, ácido hidroxicinámico, ácido metilmalónico, ácido 3-hidroxibutírico y azuleno (10)	0,3	3,7

\*significativamente no diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

(1) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con ellos solos.

(5) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de los cotiledones.

(9) Mezcla de los compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación.

(10) Mezcla de todos los compuestos.

**Tabla 20:** Efecto de la mezcla de *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a dos concentraciones (1 y 0,5mM) en el Índice de Vigor del nacimiento de cotiledones de *R. crispus*, expresado como porcentaje relativo al control.

Tratamiento	IVC (%)	
	Concentración	
	1 mM	0,5 mM
Acido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno (1)	36,0	66,7
+ ácido hidroxicinámico (2)	1,6	44,5
+ ácido cinámico (3)	1,3	19,8
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (4)	0,0	16,7
Ácido felúrico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, y ácido 3-hidroxibutírico (5)	4,0	34,4
+ ácido hidroxicinámico (6)	0,0	15,4
+ ácido cinámico (7)	0,0	5,0
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (8)	0,0	3,8
Acido cinámico y ácido hidroxicinámico (9)	4,1	42,0
Ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido p-anísico, ácido cinámico, ácido hidroxicinámico, ácido metilmalónico, ácido 3-hidroxibutírico y azuleno (10)	0,0	0,0

\*significativamente no diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

(1) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con ellos solos.

(5) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de los cotiledones.

(9) Mezcla de los compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación.

(10) Mezcla de todos los compuestos.

#### **IV.2.3.- Efecto alelopático de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre *R. crispus*. Ensayos utilizando como sustrato el suelo.**

##### **IV.2.3.1.- Efecto de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y desarrollo de las plántulas de *R. crispus*.**

Los ensayos realizados con estos compuestos sobre suelo, ponen de manifiesto que todos tienen efecto negativo sobre la germinación, a excepción del ácido 3-hidroxi-butírico (5) y el azuleno (9) (Tabla 21). Si comparamos los resultados obtenidos en estos ensayos con los realizados en papel, se observa que la acción negativa que ejercen estos compuestos sobre la germinación de plantas herbáceas, es potenciada al actuar en el suelo. Así, hay compuestos: oxálico (1), metilmalónico (2), hidroxicinámico (6), p-anísico (7), 4-hidroxibenzoico (10) y ferúlico (11), que no inhiben la germinación de *R. crispus* cuando crece sobre papel, pero sí presentan un efecto negativo, cuando se ensaya sobre suelo. Compuestos como el butírico (3), metilpropionato (4) y cinámico (8), que inhiben en los ensayos sobre papel, cuando se cuantifica su efecto sobre suelo aumentan su actividad inhibitoria. Sólo dos compuestos (3-hidroxi-butírico y azuleno) no presentan diferencias en la germinación entre los ensayos realizados sobre papel y suelo.

Cuando se analiza el nacimiento de cotiledones (Tabla 22) se observa el mismo comportamiento que para la germinación, cuando se ensaya en suelo todos los compuestos inhiben el nacimiento de cotiledones menos 3-hidroxi-butírico (5) y azuleno (9). Comparándola con los ensayos sobre papel, se observa que la acción de estos compuestos es potenciada al actuar en el suelo. El ácido cinámico, ejerce el mismo efecto en los ensayos en suelo que en papel.

Respecto al efecto sobre la longitud de raíz (Tabla 23) se observa que sólo cinco compuestos: oxálico (1), butírico (3), metilpropionato (4), cinámico (8) y azuleno (9) afectan negativamente a este órgano. Si comparamos estos resultados con los obtenidos

sobre papel, se observa el fenómeno contrario al de la germinación y nacimiento de cotiledones, pues la inhibición es menor cuando los ensayos son realizados en suelo, aunque sigue existiendo una inhibición significativa. La acción de estos compuestos es la siguiente: compuestos como el metilmalónico (2), butírico (3), 3-hidroxi-butírico (5) y ferúlico (11), no presentan efecto sobre papel ni suelo, el cinámico y azuleno ven atenuado su efecto en suelo y el hidroxicinámico (6), p-anísico (7) y 4-hidroxibenzoico (10), pierden su acción inhibitoria en el suelo a las concentraciones ensayadas. Solo el ácido oxálico, que cuando se ensaya en papel no ejerce ningún efecto sobre la longitud de la raíz, en suelo inhibe significativamente este parámetro.

La longitud de los cotiledones (Tabla 24) es inhibida por la mayoría de los compuestos a excepción del ácido butírico, 3-hidroxi-butírico y azuleno que no afectan a ninguna de las concentraciones ensayadas. Si comparamos los resultados con los obtenidos en el ensayo sobre papel se observa un comportamiento muy heterogéneo, pues compuestos como el metilmalónico (2), metilpropionato (4) y 4-hidroxibenzoico (10) potencian su efecto, y compuestos como el 3-hidroxi-butírico (5), hidroxicinámico (6) y cinámico (8), lo ven atenuado. Incluso compuestos como el 3-hidroxi-butírico (5) pierden el efecto de inhibición cuando actúan en el suelo. El resto de compuestos presenta el mismo efecto en suelo que en papel.

#### **IV.2.3.2.- Efecto de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la velocidad de germinación y nacimiento de cotiledones de plántulas de *R. Crispus*.**

Las Tablas 25 y 26 muestran el índice de vigor de la geminación y cotiledones relativo para cada uno de los *aleloquímicos* ensayados. Las concentraciones están comprendidas entre 1 y 0,0001mM.

Cuando se analiza este índice, se observa que todos los compuestos retrasan la germinación y el nacimiento de cotiledones menos el azuleno, siendo los más efectivos el ácido butírico y metilpropionato.

Todos los compuestos presentan en suelo, mayor retraso sobre la germinación y la emergencia de cotiledones, que en papel. Hay que destacar que compuestos como el ácido p-anísico (**7**) y ácido 4-hidroxibenzoico (**10**) que en papel presentan retraso sólo a la mayor concentración ensayada (1mM), en suelo también presentan a menor concentración (0,5mM), compuestos como el ácido butírico (**3**) y metilpropionato (**4**) que en papel no presentan inhibición a 0,0001mM en suelos sí presentan inhibición, y compuestos como metilmalónico (**2**), 3-hidroxibutírico (**5**) y ácido ferúlico (**11**) que no presentan retraso en papel, en suelo si tienen efecto negativo sobre la velocidad de germinación y la emergencia de cotiledones.

**Tabla 21:** Efecto de los *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1mM a 0,0001mM) en la germinación de *R. crispus* , sobre suelo y papel, expresado como porcentaje relativo al control.

	% Germinación							
	Sobre suelo				Sobre papel			
	1mM	0,5mM	0,001mM	0,0001mM	1mM	0,5mM	0,001mM	0,0001mM
<b>Ácido Oxálico (1)</b>	66,0*	52,0*	-	-	109,8	86,1	-	-
<b>Ácido Metilmalónico (2)</b>	64,0*	54,0*	-	-	102,0	88,9	-	-
<b>Ácido Butírico (3)</b>	-	-	70,0*	76,0	0,0	0,0	91,4	98,3
<b>Metilpropionato (4)</b>	-	-	66,0*	92,0	0,0	0,0	85,3	104,0
<b>Ácido 3-Hidroxibutírico (5)</b>	116,0	96,0	-	-	108,8	95,3	-	-
<b>Ácido Hidroxicinámico (6)</b>	60,0*	56,0*	-	-	95,0	88,7	-	-
<b>Ácido p-Anísico (7)</b>	48,0*	64,0*	-	-	107,3	106,5	-	-
<b>Ácido Cinámico (8)</b>	66,0*	78,0*	-	-	77,4*	95,2	-	-
<b>Azuleno (9)</b>	98,0	114,0	-	-	103,2	106,6	-	-
<b>Ácido 4-Hidroxibenzoico (10)</b>	66,0*	58,0*	-	-	112,0	97,9	-	-
<b>Ácido Ferúlico (11)</b>	68,0*	104,0	-	-	115,0	96,7	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 22:** Efecto de los *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1mM a 0,0001mM) en la emergencia de cotiledones de *R. crispus* , sobre suelo y papel, expresado como porcentaje relativo al control.

	Cotiledones (%)							
	Sobre suelo				Sobre papel			
	1mM	0,5mM	0,001mM	0,0001mM	1mM	0,5mM	0,001mM	0,0001mM
<b>Ácido Oxálico (1)</b>	67,3*	59,2*	-	-	101,9	86,3	-	-
<b>Ácido Metilmalónico (2)</b>	65,3*	55,1*	-	-	108,9	101,5	-	-
<b>Ácido Butírico (3)</b>	-	-	71,4*	77,6*	0,0	0,0	90,8	98,0
<b>Metilpropionato (4)</b>	-	-	67,3*	93,9	0,0	0,0	84,8*	108,6
<b>Ácido 3-Hidroxibutírico (5)</b>	118,4	95,9	-	-	104,2	96,1	-	-
<b>Ácido Hidroxicinámico (6)</b>	61,2*	57,1*	-	-	52,2*	89,0	-	-
<b>Ácido p-Anísico (7)</b>	46,0*	64,0*	-	-	107,7	108,5	-	-
<b>Ácido Cinámico (8)</b>	67,3*	79,6*	-	-	60,5*	75,8*	-	-
<b>Azuleno (9)</b>	100,0	116,3	-	-	105,3	109,6	-	-
<b>Ácido 4-Hidroxibenzoico (10)</b>	67,3*	59,2*	-	-	105,0	100,3	-	-
<b>Ácido Ferúlico (11)</b>	69,4*	106,1	-	-	111,5	98,7	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 23:** Efecto de los *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1mM a 0,0001mM) en la longitud de la raíz de *R. crispus*, sobre suelo y papel, expresado como porcentaje relativo al control.

	% Longitud de raíz							
	Sobre suelo				Sobre papel			
	1mM	0,5mM	0,001mM	0,0001mM	1mM	0,5mM	0,001mM	0,0001mM
<b>Ácido Oxálico (1)</b>	78,5*	95,6	-	-	84,2	87,7	-	-
<b>Ácido Metilmalónico (2)</b>	84,7	88,9	-	-	80,3	85,4	-	-
<b>Ácido Butírico (3)</b>	-	-	84,8*	89,5	0,0	0,0	82,0*	103,8
<b>Metilpropionato (4)</b>	-	-	82,1*	93,5	0,0	0,0	87,2	97,6
<b>Ácido 3-Hidroxibutírico (5)</b>	91,2	88,4	-	-	87,3	103,6	-	-
<b>Ácido Hidroxicinámico (6)</b>	89,8	85,0	-	-	44,9*	70,2*	-	-
<b>Ácido p-Anísico (7)</b>	86,1	95,3	-	-	75,7*	90,8	-	-
<b>Ácido Cinámico (8)</b>	83,8*	87,4	-	-	9,2*	30,2*	-	-
<b>Azuleno (9)</b>	74,2*	84,1	-	-	32,2*	77,0*	-	-
<b>Ácido 4-Hidroxibenzoico (10)</b>	110,9	87,6	-	-	76,7*	85,6	-	-
<b>Ácido Ferúlico (11)</b>	93,1	96,3	-	-	85,1	89,0	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 24:** Efecto de los *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1mM a 0,0001mM) en la longitud de cotiledones de *R. crispus* , sobre suelo y papel, expresado como porcentaje relativo al control.

	Longitud de cotiledones (%)							
	Sobre suelo				Sobre papel			
	1mM	0,5mM	0,001mM	0,0001mM	1mM	0,5mM	0,001mM	0,0001mM
<b>Ácido Oxálico (1)</b>	80,0	75,1	-	-	72,8*	84,7*	-	-
<b>Ácido Metilmalónico (2)</b>	72,7	76,8	-	-	74,1*	92,2	-	-
<b>Ácido Butírico (3)</b>	-	-	102,5	104,8	0,0	0,0	92,8	110,2
<b>Metilpropionato (4)</b>	-	-	71,6	74,2	0,0	0,0	95,4	104,7
<b>Ácido 3-Hidroxi-butírico (5)</b>	99,3	101,5	-	-	72,4*	90,3	-	-
<b>Ácido Hidroxicinámico (6)</b>	80,5	84,8	-	-	51,1*	94,9	-	-
<b>Ácido p-Anísico (7)</b>	77,2	80,9	-	-	72,8*	90,6	-	-
<b>Ácido Cinámico (8)</b>	72,6	74,4	-	-	48,9*	82,3*	-	-
<b>Azuleno (9)</b>	97,5	109,7	-	-	98,2	106,9	-	-
<b>Ácido 4-Hidroxi-benzoico (10)</b>	80,4	72,5	-	-	63,1*	95,9	-	-
<b>Ácido Ferúlico (11)</b>	71,2	71,8	-	-	74,3*	84,9*	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 25:** Efecto de los *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1mM a 0,0001mM) en el Índice de Vigor en la germinación de *R. crispus*, sobre suelo y papel, expresado como porcentaje relativo al control.

	IVG respecto al control							
	Sobre suelo				Sobre papel			
	1mM	0,5mM	0,001mM	0,0001mM	1mM	0,5mM	0,001mM	0,0001mM
<b>Ácido Oxálico (1)</b>	47,8*	36,3*	-	-	98,4	71*	-	-
<b>Ácido Metilmalónico (2)</b>	39,3*	41,7*	-	-	113,4	109,4	-	-
<b>Ácido Butírico (3)</b>	-	-	51,4*	58,5*	-	-	72,8*	97,6
<b>Metilpropionato (4)</b>	-	-	47,5*	69,7*	-	-	74,6*	100,0
<b>Ácido 3-Hidroxi-butírico (5)</b>	73,2*	84,2	-	-	94,8	98,2	-	-
<b>Ácido Hidroxicinámico (6)</b>	49,6*	39,2*	-	-	52,2*	72,7*	-	-
<b>Ácido p-Anísico (7)</b>	28,8*	38,3*	-	-	89,7*	107,5	-	-
<b>Ácido Cinámico (8)</b>	69,7*	47,5*	-	-	61,9*	63,7*	-	-
<b>Azuleno (9)</b>	86,1	95,8	-	-	102,9	117,6	-	-
<b>Ácido 4-Hidroxi-benzoico (10)</b>	55,6*	48,5*	-	-	83,3*	89,9	-	-
<b>Ácido Ferúlico (11)</b>	56,1*	92,6	-	-	104,0	100,9	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 26:** Efecto de los *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (1mM a 0,0001mM) en el Índice de Vigor en la cotiledones de *R. crispus* , sobre suelo y papel, expresado como porcentaje relativo al control .

	IVC respecto al control							
	Sobre suelo				Sobre papel			
	1mM	0,5mM	0,001mM	0,0001mM	1mM	0,5mM	0,001mM	0,0001mM
<b>Ácido Oxálico (1)</b>	53,5*	43,8*	-	-	91,3	74,7*	-	-
<b>Ácido Metilmalónico (2)</b>	46,1*	44,2*	-	-	114,1	110,4	-	-
<b>Ácido Butírico (3)</b>	-	-	57,8*	66,4*	-	-	77,6*	128,3
<b>Metilpropionato (4)</b>	-	-	53,7*	76,2*	-	-	75,9*	133,3
<b>Ácido 3-Hidroxibutírico (5)</b>	81,4*	95,0	-	-	86,4	98,1	-	-
<b>Ácido Hidroxicinámico (6)</b>	48,6*	40,2*	-	-	33,5*	81,3*	-	-
<b>Ácido p-Anísico (7)</b>	32,9*	44,9*	-	-	81,6*	112,5	-	-
<b>Ácido Cinámico (8)</b>	53,7*	76,2*	-	-	27,2*	49,9*	-	-
<b>Azuleno (9)</b>	92,8	105,7	-	-	99,0	151*	-	-
<b>Ácido 4-Hidroxibenzoico (10)</b>	60,6*	49,3*	-	-	84,7*	101,7	-	-
<b>Ácido Ferúlico (11)</b>	60,9*	100,7	-	-	101,6	106,8	-	-

\*significativamente diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

#### **IV.2.3.3.- Efecto de la interacción de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y desarrollo de plántulas de *R. crispus*.**

Cuando se realizan los ensayos en suelos con las mezclas de los *aleloquímicos* se observa (Tabla 27) que todas ellas inhiben significativamente la germinación de *R. crispus*, y además esta inhibición es más fuerte que cuando se ensaya con cada uno de los compuestos por separado. Si se comparan los resultados con los obtenidos en papel, se observa que, como ocurría en los ensayos sobre papel, se potencia el efecto inhibitorio cuando se añade hidroxicinámico o cinámico, pero a diferencia de los ensayos sobre papel, este efecto no se potencia cuando a las mezclas se añaden los dos compuestos conjuntamente. Por otra parte, la mayoría de las mezclas ven potenciada su acción de inhibición cuando los ensayos se realizan en suelo, a excepción de las *mezclas 7, 8 y 10* donde el efecto en suelo es atenuado.

Cuando se analiza el nacimiento de cotiledones (Tabla 28) se observa el mismo comportamiento que para el porcentaje de germinación. Si se comparan los resultados con los obtenidos en papel; el efecto inhibitorio se potencia cuando se añade hidroxicinámico o cinámico, pero no cuando se añaden conjuntamente. Al igual que en la germinación, hay mezclas que presentan un efecto menor en suelo que en papel, sumándose otras tres que presentan este mismo comportamiento: las *mezclas 3, 4 y 6*.

En cuanto el efecto de las mezclas sobre la longitud de raíces (Tabla 29), existe inhibición significativa, aunque ésta no es tan fuerte como la que presentan las mezclas sobre la germinación. Además, no hay un comportamiento sinérgico cuando se añade el cinámico o el hidroxicinámico. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en papel, se observa el mismo comportamiento que con cada uno de los compuestos por separado, el efecto sobre la longitud de raíces es menor cuando los ensayos se realizan en suelo que en papel, a excepción de la *Mezcla 1*, donde su acción es potenciada.

El efecto de las mezclas sobre la longitud de cotiledones (Tabla 30), manifiesta el mismo comportamiento que el observado en la longitud de la raíz, aunque existe inhibición significativa, ésta no es tan fuerte como la que presentan las mezclas sobre el nacimiento de cotiledones. El comportamiento sinérgico cuando se añade el cinámico o el hidroxicinámico desaparece. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en papel se observa cinco mezclas que potencian su acción en suelo (*Mezcla 1, 2, 4, 5 y 9*) y con cinco mezclas se atenúa (*Mezcla 3, 6, 7, 8 y 10*).

**Tabla 27:** Efecto de la mezcla de *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a dos concentraciones en la germinación de *R. Crispus*, sobre suelo y papel, expresado como porcentaje relativo al control.

	% Germinación			
	Sobre suelo		Sobre papel	
	0,5mM	0,1mM	1mM	0,5mM
Ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno (1)	45,5	36,4	40,3	97,3*
+ ácido hidroxicinámico (2)	40,0	58,2	20,8	74,3
+ ácido cinámico (3)	27,3	36,4	3,8	39,4
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (4)	32,7	41,8	4,5	34,4
Ácido felúrico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, y ácido 3-hidroxibutírico (5)	30,9	21,8	10,0	49,7
+ ácido hidroxicinámico (6)	29,1	23,6	7,9	38,3
+ ácido cinámico (7)	34,5	54,5	0,6	20,5
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (8)	41,8	43,6	0,0	18,5
Ácido cinámico y ácido hidroxicinámico (9)	29,1	38,2	15,4	72,2
Ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido p-anísico, ácido cinámico, ácido hidroxicinámico, ácido metilmalónico, ácido 3-hidroxibutírico y azuleno (10)	43,6	43,6	0,6	7,4

\*significativamente no diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

(1) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con ellos solos.

(5) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de los cotiledones.

(9) Mezcla de los compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación.

(10) Mezcla de todos los compuestos.

**Tabla 28:** Efecto de la mezcla de *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a dos concentraciones en la emergencia de cotiledones de *R. Crispus*, sobre suelo y papel, expresado como porcentaje relativo al control.

	% Cotiledones			
	Sobre suelo		Sobre papel	
	0,5 mM	0,1 mM	1 mM	0,5 mM
Ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno (1)	46,3	37,0	36,7	76
+ ácido hidroxicinámico (2)	40,7	59,3	2,1	53,3
+ ácido cinámico (3)	27,8	37,0	1,4	24,4
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (4)	33,3	42,6	0,0	20,5
Ácido felúrico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, y ácido 3-hidroxibutírico (5)	31,5	22,2	5,2	39,8
+ ácido hidroxicinámico (6)	29,6	24,1	0,0	19,0
+ ácido cinámico (7)	53,7	35,2	0,0	6,0
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (8)	42,6	44,4	0,0	4,9
Ácido cinámico y ácido hidroxicinámico (9)	29,6	38,9	5,3	49,0
Ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido p-anísico, ácido cinámico, ácido hidroxicinámico, ácido metilmalónico, ácido 3-hidroxibutírico y azuleno (10)	44,4	44,4	0,0	0,0

\*significativamente no diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

(1) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con ellos solos.

(5) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de los cotiledones.

(9) Mezcla de los compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación.

(10) Mezcla de todos los compuestos.

**Tabla 29:** Efecto de la mezcla de *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a dos concentraciones en la longitud de cotiledones de *R. Crispus*, sobre suelo y papel, expresado como porcentaje relativo al control.

	% Longitud de raíz			
	Sobre suelo		Sobre papel	
	0,5mM	0,1mM	1mM	0,5mM
Ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno (1)	71,3	90,7*	8,7	79
+ ácido hidroxicinámico (2)	80,4	88,9*	3,9	18,0
+ ácido cinámico (3)	86,9	93,9*	3,9	12,0
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (4)	79,7	76,8	3,9	3,9
Ácido felúrico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, y ácido 3-hidroxi-butírico (5)	69,8	78,0	3,9	10,8
+ ácido hidroxicinámico (6)	77,4	84,2	6,8	6,4
+ ácido cinámico (7)	77,9	88,0*	0,9	3,9
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (8)	74,8	78,8	0,0	4,9
Ácido cinámico y ácido hidroxicinámico (9)	61,1	68,8	4,6	37,5
Ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido p-anísico, ácido cinámico, ácido hidroxicinámico, ácido metilmalónico, ácido 3-hidroxi-butírico y azuleno (10)	64,3	72,1	1,2	7,5

\*significativamente no diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

(1) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con ellos solos.

(5) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de los cotiledones.

(9) Mezcla de los compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación.

(10) Mezcla de todos los compuestos.

**Tabla 30:** Efecto de la mezcla de *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a dos concentraciones en la longitud de raíces de *R. Crispus*, sobre suelo y papel, expresado como porcentaje relativo al control.

	% Longitud de cotiledones			
	Sobre suelo		Sobre papel	
	0,5 mM	0,1 mM	1 mM	0,5 mM
Ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno (1)	83,0	69,4	90*	92*
+ ácido hidroxicinámico (2)	93,9*	77,7	19,0	82,0
+ ácido cinámico (3)	95,3*	71,7	40,0	61,0
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (4)	90,0*	75,0	0,0	82,0
Ácido felúrico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, y ácido 3-hidroxibutírico (5)	84,8	74,0	34	102*
+ ácido hidroxicinámico (6)	94,0*	70,8	0,0	59,0
+ ácido cinámico (7)	85,3	77,0	0,0	52,0
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (8)	86,9	70,6	0,0	22,0
Ácido cinámico y ácido hidroxicinámico (9)	76,7	64,9	52,8	86,1*
Ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido p-anísico, ácido cinámico, ácido hidroxicinámico, ácido metilmalónico, ácido 3-hidroxibutírico y azuleno (10)	81,9	67,9	0,0	0,0

\*significativamente no diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

- (1) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con ellos solos.  
(5) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de los cotiledones.  
(9) Mezcla de los compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación.  
(10) Mezcla de todos los compuestos.

#### **IV.2.3.4.- Efecto de la interacción de los compuestos identificados en la Fracción 2 sobre la velocidad de germinación y nacimiento de plántulas de *R. crispus*.**

Las Tablas 31 y 32 muestran el índice de vigor de la geminación y cotiledones relativo al control para cada uno de las muestras ensayadas a dos concentraciones, 0,5 y 0,1mM. En estas tablas se observa que todas las mezclas retrasan la germinación y nacimiento de cotiledones a las dos concentraciones ensayadas. En todas se observan dependencia con la concentración, a mayor concentración mayor efecto, excepto en las *mezclas 1, 5 y 6* sobre la velocidad de nacimiento de cotiledones, donde el comportamiento se invierte, y en las *mezclas 5 y 6* sobre la velocidad de germinación, donde escasamente se observan diferencias entre las concentraciones.

Como ocurre cuando se analiza el porcentaje de germinación y cotiledones y desarrollo de las plántulas, el efecto que producen las mezclas no es igual para todas cuando el ensayo se realiza sobre suelo. Se observa que hay *mezclas (1, 2 y 9)* que potencian el retraso de la germinación y emergencia de cotiledones sobre suelo, *mezclas (3 y 6)* que presentan el mismo efecto que en papel, y *mezclas (7, 8 y 10)* que aunque siguen produciendo retraso, pierden efectividad en suelo.

**Tabla 31:** Efecto de la mezcla de *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a dos concentraciones en el Índice de Vigor de la germinación de *R. crispus*, sobre suelo y papel, expresado como porcentaje relativo al control.

	IVG (%)			
	Sobre suelo		Sobre papel	
	0,5mM	0,1mM	1mM	0,5mM
Ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno (1)	31,3	56,5	34,8	75,9
+ ácido hidroxicinámico (2)	24,6	51,3	9,4	42,3
+ ácido cinámico (3)	25,3	30,1	2,0	21,6
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (4)	22,6	35,8	2,3	18,4
Ácido felúrico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, y ácido 3-hidroxi-butírico (5)	21,1	18,6	5,1	36,5
+ ácido hidroxicinámico (6)	19,3	16,5	3,3	21,4
+ ácido cinámico (7)	31,8	41,6	0,3	9,7
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (8)	31,0	34,6	0,0	7,7
Ácido cinámico y ácido hidroxicinámico (9)	23,6	31,8	7,1	42,6
Ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido p-anísico, ácido cinámico, ácido hidroxicinámico, ácido metilmalónico, ácido 3-hidroxi-butírico y azuleno (10)	26,7	29,3	0,3	3,7

\*significativamente no diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

(1) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con ellos solos.

(5) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de los cotiledones.

(9) Mezcla de los compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación.

(10) Mezcla de todos los compuestos.

**Tabla 32:** Efecto de la mezcla de *aleloquímicos* identificados en el exudado de *C. ladanifer* a dos concentraciones en el Índice de Vigor de la germinación de *R. crispus*, sobre suelo y papel, expresado como porcentaje relativo al control.

	IVC (%)			
	Sobre suelo		Sobre papel	
	0,5mM	0,1mM	1mM	0,5mM
Ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno (1)	41,0	34,9	36,0	66,7
+ ácido hidroxicinámico (2)	34,6	55,4	1,6	44,5
+ ácido cinámico (3)	28,3	34,9	1,3	19,8
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (4)	29,2	40,4	0,0	16,7
Ácido felúrico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, y ácido 3-hidroxi-butírico (5)	27,9	21,2	4,0	34,4
+ ácido hidroxicinámico (6)	26,0	20,7	0,0	15,4
+ ácido cinámico (7)	30,5	47,7	0,0	5,0
+ ácido hidroxicinámico + ácido cinámico (8)	38,7	38,3	0,0	3,8
Ácido cinámico y ácido hidroxicinámico (9)	26,1	35,3	4,1	42,0
Ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido p-anísico, ácido cinámico, ácido hidroxicinámico, ácido metilmalónico, ácido 3-hidroxi-butírico y azuleno (10)	38,7	40,4	0,0	0,0

\*significativamente no diferente al control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

(1) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con ellos solos.

(5) Mezcla de los compuestos que inhiben la longitud de los cotiledones.

(9) Mezcla de los compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación.

(10) Mezcla de todos los compuestos.

### **IV.3.- ENSAYO DE GERMINACIÓN EN SUELOS ASOCIADOS A *Cistus ladanifer*.**

Con el objeto de cuantificar el efecto alelopático en los suelos asociados a esta especie se recogieron muestras de ellos, durante todos los meses y a lo largo de un año. En las Tablas 33, 34, 35 y 36 se muestra el porcentaje y el índice de vigor de la germinación en los meses ensayados y por estaciones.

Estos resultados ponen de relieve que los suelos de jarales inhiben la germinación de la especie ensayada. Esta inhibición no es uniforme ni entre los suelos ensayados ni a lo largo del año.

Las muestras de suelos S-1, S-2 y S-3 (Tabla 33) inhiben significativamente la germinación ( $p < 0,05$ ) durante los meses de Mayo, Noviembre y Febrero, además S-1 la inhibe en Abril, Septiembre, Octubre y Enero, S-2 al igual que S-1 en Abril y S-3 en Diciembre. El mayor porcentaje de inhibición en S-1 se produce en Septiembre y en S-2 y S-3 en Noviembre.

Si analizamos estos resultados por estaciones (Tabla 34) en S-1 la germinación se inhibe en todas ellas a excepción del verano, en S-2 en otoño e invierno y en S-3 sólo en invierno.

La cuantificación del retraso en la germinación medido a través del índice de vigor pone de manifiesto (Tabla 35 y 36) que la germinación además de inhibida se retrasa durante el mes de Junio, mientras que en Abril y Octubre, aunque sí existe inhibición, no existe retraso. En S-2 en el mes de Enero no existe inhibición pero sí se aprecia un retraso significativo y en S-3 coinciden aquellos meses donde la germinación se ve inhibida con retraso en la germinación.

Si se analiza por estaciones, existen diferencias con respecto a la inhibición de germinación en s-2. existe retraso en la germinación durante la primavera, en la cual no

se observa inhibición y por el contrario, en otoño sí se inhibe la germinación y no se aprecia retraso en la velocidad de germinación.

Respecto al nacimiento de cotiledones (Tabla 37 y 38) las tres muestras de suelos presentan el mismo patrón que en la inhibición de la germinación, a excepción del S-2, en el cual la germinación no es inhibida en Enero y sí se observa un efecto negativo significativo ( $p < 0,05$ ) en el nacimiento de cotiledones en este mes.

La velocidad en el nacimiento de cotiledones (Tabla 39 y 40) en S-1 se retrasa en aquellos suelos donde existe inhibición en el nacimiento de cotiledones a excepción de Marzo, donde se observa un considerable retraso, y por el contrario, en Octubre y Abril no se aprecian retrasos significativos en el nacimiento de cotiledones. S-3, además de los meses en lo que se han detectado inhibiciones significativas, en Junio y Enero se observa retrasos en la emergencia de los cotiledones. En S-2 durante la primavera aunque no se aprecia inhibición sí se observa retraso en el nacimiento de cotiledones.

**Tabla 33:** Porcentajes de germinación de semillas de *R. crispus* sembradas mensualmente en suelos asociados a *C. ladanifer*, expresados como porcentajes relativos respecto al control.

	Germinación (%)		
	S-1	S-2	S-3
<b>Abril (1999)</b>	73,3* ± 25,2	81,6* ± 9,3	93,9 ± 9,2
<b>Mayo</b>	75,5* ± 15,1	64,5* ± 3,8	71,3* ± 11,5
<b>Junio</b>	76,5 ± 18,1	85,3 ± 14,0	79,1 ± 7,1
<b>Julio</b>	107,0 ± 12,1	128,9 ± 11,1	101,1 ± 50,5
<b>Agosto</b>	100,5 ± 34,9	83,1 ± 22,3	96,3 ± 18,6
<b>Septiembre</b>	30* ± 19,7	89,3 ± 39,1	92 ± 8,7
<b>Octubre</b>	71,4* ± 14,0	77,7 ± 49,5	93,5 ± 29,3
<b>Noviembre</b>	62,3* ± 26,2	58,5* ± 3,9	50,4* ± 8,1
<b>Diciembre</b>	99,1 ± 22,4	84,9 ± 25,7	74,6* ± 9,4
<b>Enero (2000)</b>	57,7* ± 3,6	61,9 ± 16,1	68,7 ± 24,6
<b>Febrero</b>	75,5* ± 14,2	67,2* ± 22,2	75* ± 19,2
<b>Marzo</b>	79,4 ± 25,2	101,3 ± 11,7	98,2 ± 20,3

\*significativamente diferente del control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 34:** Porcentajes medios estacionales de la germinación de semillas de *R. crispus* sembradas en suelos asociados a *C. ladanifer*, expresados como porcentajes relativos respecto al control.

	Germinación (%)		
	S-1	S-2	S-3
<b>Primavera</b>	76,0* ± 3,1	82,4 ± 18,4	87,8 ± 14,4
<b>Verano</b>	94,6 ± 16,1	99,0 ± 25,8	92,1 ± 11,5
<b>Otoño</b>	54,5* ± 21,7	75,1* ± 15,5	78,6 ± 24,4
<b>Invierno</b>	77,4* ± 20,7	71,3* ± 12,0	72,7* ± 3,5

\*significativamente diferente del control  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 35:** Índices de Vigor de la germinación de semillas de *R. crispus* sembradas en suelos asociados a *C. ladanifer*, expresados como porcentajes relativos respecto al control

	IVG		
	S-1	S-2	S-3
<b>Abril (1999)</b>	86,6 ± 28,5	90,3 ± 18,5	101,4 ± 23,9
<b>Mayo</b>	57,1* ± 20,1	52,5* ± 2,2	58,1* ± 14,8
<b>Junio</b>	76,6* ± 17,3	71,1 ± 21,6	59,3* ± 18,5
<b>Julio</b>	80,5 ± 21,3	114,7 ± 23,4	76,4 ± 55,5
<b>Agosto</b>	91,0 ± 34,9	80,8 ± 38,9	94,7 ± 33,0
<b>Septiembre</b>	28,3* ± 23,4	86,2 ± 41,7	82,5 ± 11,4
<b>Octubre</b>	105,4 ± 28,8	115,7 ± 58,0	125,0 ± 46,1
<b>Noviembre</b>	62,8* ± 26,6	50,8* ± 5,3	48,6* ± 10,8
<b>Diciembre</b>	96,8 ± 35,9	74,2 ± 33,6	67,3* ± 18,3
<b>Enero (2000)</b>	40,6* ± 14,5	47,6* ± 12,8	61,9 ± 33,0
<b>Febrero</b>	54,9* ± 14,9	43,6* ± 12,6	66,5* ± 23,7
<b>Marzo</b>	71,3 ± 30,4	80,6 ± 16,8	90,3 ± 22,3

\*significativamente diferente del control p<0,05 (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 36:** Índices de Vigor medios estacionales de la germinación de semillas de *R. crispus* sembradas en suelos asociados a *C. ladanifer*, expresados como porcentajes relativos respecto al control.

	IVG		
	S-1	S-2	S-3
<b>Primavera</b>	71,7* ± 14,8	74,4* ± 19,6	83,3 ± 22,4
<b>Verano</b>	82,7 ± 7,4	88,9 ± 22,9	76,8* ± 17,6
<b>Otoño</b>	65,5* ± 38,5	84,2 ± 32,4	85,4 ± 38,2
<b>Invierno</b>	64,1* ± 29,2	55,1* ± 16,6	65,2* ± 2,9

\*significativamente diferente del control p<0,05 (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 37:** Porcentajes del nacimiento de cotiledones de semillas de *R. crispus* sembradas en suelos asociados a *C. ladanifer*, expresados como porcentajes relativos respecto al control.

	Cotiledones (%)		
	S-1	S-2	S-3
<b>Abril (1999)</b>	73,3* ± 25,2	81,6 ± 9,2	95,5 ± 9,4
<b>Mayo</b>	71,7* ± 15,1	62,8* ± 4,4	70,8* ± 12,8
<b>Junio</b>	72,8 ± 20,3	80,6 ± 14,2	74,9 ± 6,9
<b>Julio</b>	87,9 ± 15,8	117,9 ± 9,1	83,5 ± 53,2
<b>Agosto</b>	97,8 ± 35,2	80,9 ± 19,8	93,6 ± 19,5
<b>Septiembre</b>	28* ± 19,7	88 ± 39,9	91,3 ± 8,0
<b>Octubre</b>	70,1* ± 14,4	74,9 ± 50,3	92,7 ± 30,3
<b>Noviembre</b>	62,3* ± 26,1	56,0* ± 4,9	50,4* ± 8,1
<b>Diciembre</b>	94,0 ± 26,5	81,4 ± 27,1	73,5* ± 10,2
<b>Enero (2000)</b>	48,1* ± 7,8	58,4* ± 15,4	72,1 ± 13,5
<b>Febrero</b>	72,7* ± 13,4	66,1* ± 21,1	73,8* ± 20,0
<b>Marzo</b>	82,2 ± 26,6	102,1 ± 10,7	98,9 ± 20,1

\*significativamente diferente del control p<0,05 (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 38:** Porcentajes medios estacionales del nacimiento de cotiledones de semillas de *R. crispus* sembradas en suelos asociados a *C. ladanifer*, expresados como porcentajes relativos respecto al control.

	Cotiledones (%)		
	S-1	S-2	S-3
<b>Primavera</b>	75,7* ± 5,6	82,2 ± 19,6	88,4 ± 15,3
<b>Verano</b>	86,2 ± 12,5	93,1 ± 21,4	84,0 ± 9,3
<b>Otoño</b>	53,4* ± 22,4	72,9* ± 16,0	78,1 ± 24,0
<b>Invierno</b>	71,6* ± 22,9	68,6* ± 11,7	73,1* ± 0,9

\*significativamente diferente del control p<0,05 (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 39:** Índices de Vigor del nacimiento de cotiledones de semillas de *R. crispus* sembradas en suelos asociados a *C. ladanifer*, expresados como porcentajes relativos respecto al control.

	IVC		
	S-1	S-2	S-3
<b>Abril (1999)</b>	85,3 ± 28,5	94,6 ± 5,5	102,1 ± 12,6
<b>Mayo</b>	52,8* ± 21,6	42,9* ± 2,1	48,9* ± 13,9
<b>Junio</b>	75,1 ± 26,7	82,4 ± 1,8	66,1* ± 12,1
<b>Julio</b>	86,8 ± 5,0	117,2 ± 26,0	76,6 ± 68,5
<b>Agosto</b>	94,8 ± 41,3	91,7 ± 33,3	101,7 ± 50,6
<b>Septiembre</b>	21,7* ± 17,6	75,0 ± 32,3	73,5 ± 10,0
<b>Octubre</b>	78,2 ± 20,7	85,5 ± 51,0	96,8 ± 35,0
<b>Noviembre</b>	71,9* ± 33,1	62,7* ± 6,0	54,9* ± 12,7
<b>Diciembre</b>	96,3 ± 41,4	72,8 ± 31,6	70,4 ± 27,6
<b>Enero (2000)</b>	46,2* ± 10,1	64,7* ± 12,6	67,3* ± 29,4
<b>Febrero</b>	65,6* ± 16,1	53,4* ± 17,6	73,0* ± 25,7
<b>Marzo</b>	53,3* ± 23,1	66,2 ± 15,2	77,5 ± 17,0

\*significativamente diferente del control p<0,05 (Mann-Whitney U-test)

**Tabla 40:** Índices de Vigor medios estacionales del nacimiento de cotiledones de semillas de *R. crispus* sembradas en suelos asociados a *C. ladanifer*, expresados como porcentajes relativos respecto al control.

	IVC		
	S-1	S-2	S-3
<b>Primavera</b>	63,8* ± 18,6	67,9* ± 25,8	76,2 ± 26,6
<b>Verano</b>	85,6 ± 9,9	97,1 ± 18,0	81,5 ± 18,3
<b>Otoño</b>	57,2* ± 30,9	74,4* ± 11,4	75,1 ± 21,0
<b>Invierno</b>	69,3* ± 25,2	63,6* ± 9,7	70,2* ± 2,8

\*significativamente diferente del control p<0,05 (Mann-Whitney U-test)

#### **IV.4.- ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS ASOCIADOS A *C. ladanifer*.**

La inhibición en la germinación observada en los suelos de jarales puede ser consecuencia de los posibles *aleloquímicos* existentes en el suelo (procedentes del exudado) o debido a una competencia por nutrientes. Para discernir entre estas dos causas, se realizó el análisis edafológico a todos los suelos con los que se había ensayado la germinación. Las Tablas 41-52 muestran los resultados de este análisis realizado en los suelos de jarales y controles durante los meses muestreados. En las Tablas (53 a 56) puede apreciarse la variación de las características edafológicas a lo largo del año de cada uno de los suelos.

Con respecto a los valores de calcio, los suelos S-2 y S-3 presentan valores más altos que S-1 y este último valores muy parecidos al control. Este elemento a lo largo del año se mantienen bastante constante a excepción de los meses de primavera que experimenta un descenso.

Los iones hierro, sodio y magnesio no muestran prácticamente ninguna variación apreciable a lo largo del año. En Junio y Julio puede observarse un pequeño aumento del sodio. Entre suelos de jarales y suelos control tampoco existen diferencias, solo en los meses de Enero y Febrero que se encuentran valores más bajos de magnesio para los controles y S-3, en Junio, que presenta un valor más bajo de sodio que los demás.

El contenido de potasio en los suelos es más alto en los meses de Abril, Mayo, Junio y Diciembre en los suelos S-2 y S-3. Con respecto a este elemento sí se aprecian diferencias entre los suelos controles y jarales, siendo más alto en los jarales. A lo largo del año este elemento muestra una clara variación, los suelos asociados a jarales baja en otoño y en el control disminuye en otoño y en invierno.

El zinc es un elemento que presenta un comportamiento variable a lo largo del año y entre los suelos. En todos los meses el suelo control presenta un menor contenido

que los suelos de jarales, pero también existe diferencias entre los propios suelos de jarales. S-2 y S-3 poseen valores más altos que S-1 en los meses de Abril, Junio, Noviembre y Diciembre. Este elemento en S-1, S-2 y S-3 aumenta en Abril, Mayo y Agosto y en el control aumenta de Abril a Agosto y disminuye de Diciembre a Marzo.

Con respecto al fósforo, disminuye en todos los suelos durante los meses de otoño e invierno, presentando valores más bajos los suelos controles.

El pH en los suelos de jarales y control es ácido y prácticamente no existen diferencias entre ellos. En S-1, S-2 y S-3 se vuelve ligeramente más ácido en otoño y en el control baja en el mes de Noviembre.

El porcentaje de materia orgánica es más bajo en el suelo control que en los suelos asociados a *C. ladanifer*, y los suelos S-2 y S-3 presentan valores más altos que S-1. El contenido de materia orgánica en suelos asociados a jarales es prácticamente igual durante todo el año, mientras en el suelo control aumenta en Junio, Julio, Agosto y Octubre.

En resumen, se puede concluir que existe una gran heterogeneidad en los diferentes suelos. Observándose, de forma general, que el control tiene menor contenido en nutrientes que los suelos asociados a jarales y que el suelo S-1, que es el que más inhibición presenta, es el que más semejanza presenta al suelo control durante algunos meses y en algunos elementos.

En el análisis granulométrico se muestra que no existen diferencias significativas entre los diferentes puntos estudiados. Tanto los suelos controles como los suelos jarales presentan similares porcentajes de arena, limo y arcilla, y además ninguno de ellos presenta variación a lo largo del año. En la Tabla 57 se muestra la media de los diferentes meses de los suelos jarales y de los suelos control.

**Tabla 57:** Características granulométricas de los diferentes suelos estudiados a lo largo del año.

	<b>Arcilla (%)</b>	<b>Limo (%)</b>	<b>Arena (%)</b>
<b>Media Jara</b>	22,29 ± 1,38	7,43 ± 1,51	70,29 ± 2,69
<b>Media Control</b>	25,71 ± 1,85	12,00 ± 3,21	62,29 ± 4,00

Media Jara: promedio de todos los meses de suelos de jarales

Media Control: promedio de todos los meses de suelos controles.

**Tabla 41:** Características edafológicas de los diferentes puntos muestreados en el mes de abril.

<b>ABRIL</b>	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>Control</b>
<b>Ca (ppm)</b>	23,32 ± 8,44	31,58 ± 13,04	25,88 ± 3,94	15,33 ± 1,06
<b>Mg(ppm)</b>	4,76 ± 2,36	4,55 ± 1,96	3,87 ± 0,66	2,65 ± 0,06
<b>Na(ppm)</b>	8,51 ± 2,36	8,60 ± 1,37	6,96 ± 2,69	9,15 ± 0,76
<b>K(ppm)</b>	29,76 ± 3,75	40,5 ± 7,95	31,10 ± 2,19	22,78 ± 0,00
<b>Zn(ppm)</b>	0,72 ± 0,27	1,02 ± 0,77	0,89 ± 0,20	0,59 ± 0,01
<b>Fe (ppm)</b>	29,51 ± 3,17	26,90 ± 5,48	26,29 ± 6,65	28,79 ± 0,45
<b>P(ppm)</b>	1,19 ± 0,51	2,18 ± 1,38	0,46 ± 0,62	0,49 ± 0,72
<b>N(ppm)</b>	409,5 ± 34,65	1033,67 ± 173,78	653,33 ± 336,32	647,5 ± 173,24
<b>pH</b>	6,33 ± 0,31	6,57 ± 0,06	6,5 ± 0,10	6,05 ± 0,07
<b>%MO</b>	6,88 ± 2,56	9,42 ± 3,49	7,36 ± 0,75	4,89 ± 0,26

%M.O, porcentaje de materia orgánica

**Tabla 42:** Características edafológicas de los diferentes puntos muestreados en el mes de mayo.

<b>MAYO</b>	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>Control</b>
<b>Ca (ppm)</b>	18,32 ± 6,65	36,76 ± 4,82	36,64 ± 12,28	14,01 ± 0,30
<b>Mg(ppm)</b>	3,93 ± 1,09	5,38 ± 0,92	4,73 ± 1,85	2,94 ± 0,39
<b>Na(ppm)</b>	7,5 ± 4,08	6,60 ± 0,76	8,36 ± 3,32	8,54 ± 0,65
<b>K(ppm)</b>	33,62 ± 8,46	42,79 ± 9,20	39,33 ± 4,83	15,97 ± 4,29
<b>Zn(ppm)</b>	0,78 ± 0,28	1,35 ± 0,37	1,37 ± 0,22	0,43 ± 0,07
<b>Fe (ppm)</b>	29,54 ± 2,80	27,48 ± 5,37	27,23 ± 3,47	29,21 ± 2,17
<b>P(ppm)</b>	0,38 ± 0,22	0,69 ± 0,23	0,58 ± 0,15	0,21 ± 0,02
<b>N(ppm)</b>	933,33 ± 398,04	315 ± 218,57	256,67 ± 135,51	157,5 ± 74,25
<b>pH</b>	6,53 ± 0,06	6,67 ± 0,12	6,67 ± 0,12	5,6 ± 0,28
<b>%M.O</b>	7,10 ± 2,45	10,76 ± 2,41	9,38 ± 1,74	4,59 ± 1,28

%M.O, porcentaje de materia orgánica

**Tabla 43:** Características edafológicas de los diferentes puntos muestreados en el mes de junio.

<b>JUNIO</b>	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>Control</b>
<b>Ca (ppm)</b>	27,96 ± 13,35	45,23 ± 11,66	36,44 ± 4,43	34,53 ± 17,24
<b>Mg(ppm)</b>	4,57 ± 0,83	6,9 ± 1,99	5,95 ± 1,23	5,20 ± 1,05
<b>Na(ppm)</b>	10,04 ± 1,25	8,79 ± 1,77	5,62 ± 1,02	12,4 ± 0,68
<b>K(ppm)</b>	34,67 ± 1,63	42,97 ± 6,31	36,74 ± 7,57	29,58 ± 9,74
<b>Zn(ppm)</b>	0,21 ± 0,16	0,44 ± 0,22	0,44 ± 0,13	0,31 ± 0,30
<b>Fe (ppm)</b>	32 ± 5,27	28,33 ± 10,21	21,67 ± 1,44	36,75 ± 15,91
<b>P(ppm)</b>	0,54 ± 0,16	0,34 ± 0,27	0,45 ± 0,10	0,95 ± 0,86
<b>N(ppm)</b>	373,33 ± 434,81	291,67 ± 233,04	385 ± 160,39	332,5 ± 321,73
<b>pH</b>	6,33 ± 0,15	6,66 ± 0,03	6,71 ± 0,12	6,41 ± 0,13
<b>%M.O.</b>	7,69 ± 2,05	10,27 ± 2,41	8,56 ± 0,66	8,54 ± 4,83

%M.O, porcentaje de materia orgánica

**Tabla 44:** Características edafológicas de los diferentes puntos muestreados en el mes de julio.

<b>JULIO</b>	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>Control</b>
<b>Ca (ppm)</b>	23,73 ± 3,36	33,26 ± 0,58	35,32 ± 1,30	28,21 ± 8,06
<b>Mg(ppm)</b>	4,47 ± 0,54	6,08 ± 0,68	5,54 ± 0,12	4,71 ± 0,50
<b>Na(ppm)</b>	9,35 ± 0,96	11,55 ± 3,78	12,09 ± 3,31	14,36 ± 3,29
<b>K(ppm)</b>	38,05 ± 4,29	41,74 ± 3,98	33,21 ± 6,37	29,88 ± 5,82
<b>Zn(ppm)</b>	0,24 ± 0,12	0,38 ± 0,05	0,32 ± 0,28	0,23 ± 0,22
<b>Fe (ppm)</b>	26,83 ± 11,24	32,33 ± 9,67	22,5 ± 5,07	34,5 ± 17,68
<b>P(ppm)</b>	1,21 ± 1,11	0,90 ± 0,64	0,44 * 0,24	0,42 ± 0,13
<b>N(ppm)</b>	700 ± 299,04	478,33 ± 72,86	350 ± 92,60	437,5 ± 123,74
<b>pH</b>	6,22 ± 0,47	6,44 ± 0,28	6,62 ± 0,10	6,22 ± 0,40
<b>% M.O.</b>	6,61 ± 3,71	11,50 ± 1,22	9,72 ± 1,50	6,77 ± 3,81

%M.O, porcentaje de materia orgánica

**Tabla 45:** Características edafológicas de los diferentes puntos muestreados en el mes de agosto.

<b>AGOSTO</b>	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>Control</b>
<b>Ca (ppm)</b>	26,62 ± 7,44	44,26 ± 2,69	45,02 ± 8,84	20,94 ± 2,26
<b>Mg(ppm)</b>	5,11 ± 1,04	7,04 ± 1,50	6,69 ± 0,42	4,03 ± 0,26
<b>Na(ppm)</b>	8,74 ± 0,50	10,17 ± 1,35	9,17 ± 0,33	10 ± 1,79
<b>K(ppm)</b>	37,56 ± 2,91	44,36 ± 6,25	37,49 ± 5,47	22,31 ± 1,41
<b>Zn(ppm)</b>	0,83 ± 0,46	1,11 ± 0,13	1,03 ± 0,40	0,30 ± 0,02
<b>Fe (ppm)</b>	29,87 ± 0,91	28,23 ± 3,46	26,89 ± 2,99	24,34 ± 2,74
<b>P(ppm)</b>	0,45 ± 0,22	1,35 ± 0,08	0,45 ± 0,10	0,31 ± 0,02
<b>N(ppm)</b>	326,67 ± 205,08	641,67 ± 343,52	501,7 ± 253,20	490 ± 395,98
<b>pH</b>	6,37 ± 0,45	6,49 ± 0,62	6,68 ± 0,58	6,31 ± 0,01
<b>% M.O.</b>	8,32 ± 0,86	10,90 ± 1,81	9,61 ± 1,88	6,11 ± 0,93

%M.O, porcentaje de materia orgánica

**Tabla 46:** Características edafológicas de los diferentes puntos muestreados en el mes de septiembre

<b>SEPTIEMBRE</b>	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>Control</b>
<b>Ca (ppm)</b>	32,28 ± 1,25	54,8 ± 5,26	61,24 ± 4,24	29,58 ± 6,19
<b>Mg(ppm)</b>	4,26 ± 0,81	5,61 ± 1,20	6,36 ± 0,53	3,65 ± 0,44
<b>Na(ppm)</b>	8,89 ± 1,22	7,67 ± 1,18	8,78 ± 1,12	10,08 ± 0,92
<b>K(ppm)</b>	30 ± 2,95	39,31 ± 5,87	35,10 ± 3,16	22,13 ± 6,54
<b>Zn(ppm)</b>	-	0,55 ± 0,05	1,10 ± 0,22	0,13 ± 0,31
<b>Fe (ppm)</b>	-	19,25 ± 1,77	22,17 ± 1,04	24,25 ± 10,96
<b>P(ppm)</b>	0,37 ± 0,02	0,43 ± 0,09	0,55 ± 0,25	0,37 ± 0,16
<b>N(ppm)</b>	735 ± 181,87	280 ± 218,57	338,33 ± 257,99	612,5 ± 74,25
<b>pH</b>	5,85 ± 0,30	5,93 ± 0,22	5,97 ± 0,07	5,67 ± 0,26
<b>%M.O.</b>	7,92 ± 0,54	9,38 ± 0,10	9,92 ± 0,90	4,96 ± 2,07

%M.O, porcentaje de materia orgánica

**Tabla 47:** Características edafológicas de los diferentes puntos muestreados en el mes de octubre.

<b>OCTUBRE</b>	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>Control</b>
<b>Ca (ppm)</b>	27,44 ± 7,51	45,72 ± 12,49	46,2 ± 10,55	27,72 ± 5,77
<b>Mg(ppm)</b>	3,90 ± 1,22	4,32 ± 1,40	4,36 ± 1,26	3,23 ± 0,30
<b>Na(ppm)</b>	6,92 ± 0,84	6,62 ± 1,44	6,51 ± 1,25	12,79 ± 6,77
<b>K(ppm)</b>	20,77 ± 8,50	30,88 ± 3,45	24,83 ± 4,25	34 ± 17,32
<b>Zn(ppm)</b>	0,67 ± 0,41	0,69 ± 0,43	0,29 ± 0,35	0,29 ± 0,21
<b>Fe(ppm)</b>	31,67 ± 13,25	26,33 ± 11,88	19 ± 1,0	22,25 ± ,035
<b>P(ppm)</b>	0,37 ± 0,11	0,41 ± 0,06	0,32 ± 0,04	0,32 ± 0,03
<b>N(ppm)</b>	344,17 ± 399,19	863,33 ± 665,31	898,33 ± 687,94	122,5 ± 24,75
<b>pH</b>	5,52 ± 0,51	5,97 ± 0,22	5,96 ± 0,14	6,12 ± 0,08
<b>% M.O.</b>	6,91 ± 2,32	9,55 ± 0,96	8,04 ± 2,04	6,08 ± 0,47

%M.O, porcentaje de materia orgánica

**Tabla 48:** Características edafológicas de los diferentes puntos muestreados en el mes de noviembre.

<b>NOVIEMBRE</b>	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>Control</b>
<b>Ca (ppm)</b>	27,68 ± 2,43	54,6 ± 12,26	48,08 ± 4,16	22,14 ± 2,63
<b>Mg(ppm)</b>	4,00 ± 0,26	4,88 ± 1,83	5,48 ± 0,65	2,84 ± 0,49
<b>Na(ppm)</b>	8,95 ± 0,63	9,68 ± 1,03	8,98 ± 0,48	9,31 ± 1,11
<b>K(ppm)</b>	25 ± 6,03	26,48 ± 4,52	24,25 ± 1,9	4 ± 1,41
<b>Zn(ppm)</b>	0,08 ± 0,05	0,86 ± 0,47	0,79 ± 0,24	0,01 ± 0,01
<b>Fe(ppm)</b>	22,67 ± 1,61	26,33 ± 9,67	22 ± 4,36	19,25 ± 3,18
<b>P(ppm)</b>	0,29 ± 0,02	0,33 ± 0,06	0,34 ± 0,03	0,27 ± 0,06
<b>N(ppm)</b>	326,67 ± 40,41	140 ± 70,0	105 ± 0,0	385 ± 98,99
<b>pH</b>	5,78 ± 0,15	5,86 ± 0,15	5,82 ± 0,23	4,67 ± 0,24
<b>% MO</b>	6,36 ± 0,67	10,46 ± 2,04	8,27 ± 0,60	2,16 ± 0,39

%M.O, porcentaje de materia orgánica

**Tabla 49:** Características edafológicas de los diferentes puntos muestreados en el mes de diciembre.

<b>DICIEMBRE</b>	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>Control</b>
<b>Ca (ppm)</b>	23,41 ± 4,75	45,53 ± 13,15	46,58 ± 7,16	29,99 ± 16,95
<b>Mg(ppm)</b>	4,18 ± 0,73	5,66 ± 1,83	6,41 ± 1,44	5,36 ± 2,27
<b>Na(ppm)</b>	9,24 ± 1,69	8,72 ± 0,91	7,53 ± 0,73	10,02 ± 1,60
<b>K(ppm)</b>	23,82 ± 10,71	40,60 ± 5,80	35,37 ± 2,66	15,37 ± 8,20
<b>Zn(ppm)</b>	0,34 ± 0,05	0,68 ± 0,23	0,68 ± 0,23	0,14 ± 0,06
<b>Fe(ppm)</b>	34,93 ± 0,62	31,83 ± 7,76	28,86 ± 1,86	31,89 ± 5,81
<b>P(ppm)</b>	0,13 ± 0,06	0,19 ± 0,09	0,15 ± 0,03	0,045 ± 0,01
<b>N(ppm)</b>	506,33 ± 305,63	854 ± 634,92	560 ± 202,52	1095,5 ± 579,12
<b>pH</b>	6,34 ± 0,28	6,62 ± 0,09	6,35 ± 0,05	6,32 ± 0,19
<b>%M.O.</b>	6,88 ± 2,56	9,42 ± 3,49	7,36 ± 0,75	4,89 ± 0,26

%M.O, porcentaje de materia orgánica

**Tabla 50:** Características edafológicas de los diferentes puntos muestreados en el mes de enero.

<b>ENERO</b>	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>Control</b>
<b>Ca (ppm)</b>	25,03 ± 4,68	66,69 ± 12,04	44,90 ± 11,39	19,25 ± 0,82
<b>Mg(ppm)</b>	4,75 ± 0,47	7,20 ± 2,00	5,98 ± 1,67	3,54 ± 0,70
<b>Na(ppm)</b>	7,21 ± 0,58	7,78 ± 1,13	7,49 ± 2,72	7,24 ± 1,05
<b>K(ppm)</b>	33,00 ± 4,75	37,93 ± 4,69	27,77 ± 8,12	12,87 ± 0,08
<b>Zn(ppm)</b>	0,42 ± 0,02	0,52 ± 0,12	0,4 ± 0,17	0,06 ± 0,06
<b>Fe(ppm)</b>	33,74 ± 3,00	33,74 ± 5,30	30,05 ± 3,32	31,71 ± 6,57
<b>P (ppm)</b>	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,06	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,01
<b>N(ppm)</b>	695,33 ± 258,27	1005,67 ± 935,60	466,67 ± 10,69	427,00 ± 29,70
<b>pH</b>	6,40 ± 0,30	6,63 ± 0,06	6,67 ± 0,15	6,10 ± 0,42
<b>%M.O.</b>	7,00 ± 1,27	9,66 ± 3,25	9,66 ± 0,91	3,08 ± 0,26

%M.O, porcentaje de materia orgánica

**Tabla 51:** Características edafológicas de los diferentes puntos muestreados en el mes de febrero.

<b>FEBRERO</b>	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>Control</b>
<b>Ca (ppm)</b>	28,59 ± 9,47	61,37 ± 10,88	53,30 ± 2,49	23,26 ± 9,76
<b>Mg(ppm)</b>	4,81 ± 0,79	6,93 ± 1,19	6,41 ± 0,82	3,42 ± 0,93
<b>Na(ppm)</b>	7,06 ± 1,49	6,71 ± 0,64	6,51 ± 1,62	9,83 ± 0,95
<b>K(ppm)</b>	28,84 ± 2,84	35,84 ± 7,64	29,25 ± 5,78	14,55 ± 2,21
<b>Zn(ppm)</b>	0,38 ± 0,25	0,57 ± 0,01	0,42 ± 0,04	0,13 ± 0,0
<b>Fe(ppm)</b>	35,76 ± 3,79	30,76 ± 5,78	23,14 ± 4,34	25,82 ± 1,77
<b>P(ppm)</b>	0,12 ± 0,05	0,15 ± 0,06	0,10 ± 0,01	0,04 ± 0,01
<b>N(ppm)</b>	746,67 ± 317,58	1493,33 ± 767,88	1421 ± 370,21	430,5 ± 292,04
<b>pH</b>	6,5 ± 0,44	6,77 ± 0,06	6,77 ± 0,06	5,75 ± 0,92
<b>%M.O.</b>	7,85 ± 1,79	9,42 ± 2,61	8,33 ± 0,36	3,62 ± 0,51

%M.O, porcentaje de materia orgánica

**Tabla 52:** Características edafológicas de los diferentes puntos muestreados en el mes de marzo.

<b>MARZO</b>	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>Control</b>
<b>Ca (ppm)</b>	19,30 ± 3,75	37,95 ± 17,98	31,87 ± 1,56	27,80 ± 4,03
<b>Mg(ppm)</b>	4,38 ± 0,71	4,88 ± 1,60	5,00 ± 0,68	4,01 ± 0,41
<b>Na(ppm)</b>	8,63 ± 1,48	6,96 ± 1,04	6,72 ± 0,61	8,92 ± 0,47
<b>K(ppm)</b>	27,00 ± 4,66	31,20 ± 4,93	23,59 ± 7,14	14,01 ± 1,85
<b>Zn(ppm)</b>	0,23 ± 0,20	0,36 ± 0,19	0,28 ± 0,16	0,11 ± 0,14
<b>Fe(ppm)</b>	33,26 ± 3,24	28,14 ± 10,18	26,36 ± 0,94	34,21 ± 7,07
<b>P(ppm)</b>	0,12 ± 0,07	0,13 ± 0,03	0,13 ± 0,07	0,09 ± 0,01
<b>N(ppm)</b>	450,33 ± 208,40	856,33 ± 309,61	571,67 ± 81,13	623 ± 306,88
<b>pH</b>	6,34 ± 0,28	6,62 ± 0,09	6,35 ± 0,05	6,32 ± 0,19
<b>%M.O.</b>	6,76 ± 2,54	8,69 ± 1,31	6,76 ± 0,84	4,35 ± 2,56

%M.O, porcentaje de materia orgánica

**Tabla 53:** Características edafológicas de S-1 a lo largo del año.

<b>S-1</b>	<b>Ca (ppm)</b>	<b>Mg(ppm)</b>	<b>Na(ppm)</b>	<b>K(ppm)</b>	<b>Zn(ppm)</b>	<b>Fe (ppm)</b>	<b>P(ppm)</b>	<b>N(ppm)</b>	<b>pH</b>	<b>%M.O.</b>
<b>Abril (1999)</b>	23,32	4,76	8,51	29,76	0,72	29,51	1,19	409,50	6,33	6,88
<b>Mayo</b>	18,32	3,93	7,50	33,62	0,78	29,54	0,38	933,33	6,53	7,10
<b>Junio</b>	27,96	4,57	10,04	34,67	0,21	32,00	0,54	373,33	6,33	7,69
<b>Julio</b>	23,73	4,47	9,35	38,05	0,24	26,83	1,21	700,00	6,22	6,61
<b>Agosto</b>	26,62	5,11	8,74	37,56	0,83	29,87	0,45	326,67	6,37	8,32
<b>Septiembre</b>	32,28	4,26	8,89	30,00	-	-	0,37	735,00	5,85	7,92
<b>Octubre</b>	27,44	3,90	6,92	20,77	0,67	31,67	0,37	344,17	5,52	6,91
<b>Noviembre</b>	27,68	4,00	8,95	25,00	0,08	22,67	0,29	326,67	5,78	6,36
<b>Diciembre</b>	23,41	4,18	9,24	23,82	0,34	34,93	0,13	506,33	6,34	6,88
<b>Enero (2000)</b>	25,03	4,75	7,21	33,00	0,42	33,74	0,12	695,33	6,40	7,00
<b>Febrero</b>	28,59	4,81	7,06	28,84	0,38	35,76	0,12	746,67	6,50	7,85
<b>Marzo</b>	19,30	4,38	8,63	27,00	0,23	33,26	0,12	450,33	6,34	6,76

%M.O, porcentaje de materia orgánica.

**Tabla 54:** Características edafológicas de S-2 a lo largo del año.

<b>S-2</b>	<b>Ca (ppm)</b>	<b>Mg(ppm)</b>	<b>Na(ppm)</b>	<b>K(ppm)</b>	<b>Zn(ppm)</b>	<b>Fe (ppm)</b>	<b>P(ppm)</b>	<b>N(ppm)</b>	<b>pH</b>	<b>%M.O.</b>
<b>Abril (1999)</b>	31,58	4,55	8,60	40,50	1,02	26,90	2,18	1033,67	6,57	9,42
<b>Mayo</b>	36,76	5,38	6,60	42,79	1,35	27,48	0,69	315,00	6,67	10,76
<b>Junio</b>	45,23	6,90	8,79	42,97	0,44	28,33	0,34	291,67	6,66	10,27
<b>Julio</b>	33,26	6,08	11,55	41,74	0,38	32,33	0,90	478,33	6,44	11,50
<b>Agosto</b>	44,26	7,04	10,17	44,36	1,11	28,23	1,35	641,67	6,49	10,90
<b>Septiembre</b>	54,80	5,61	7,67	39,31	0,55	19,25	0,43	280,00	5,93	9,39
<b>Octubre</b>	45,72	4,32	6,62	30,88	0,69	26,33	0,41	863,33	5,97	9,55
<b>Noviembre</b>	54,60	4,88	9,68	26,48	0,86	26,33	0,33	140,00	5,86	10,46
<b>Diciembre</b>	45,53	5,66	8,72	40,60	0,68	31,83	0,19	854,00	6,62	9,42
<b>Enero (2000)</b>	66,69	7,20	7,78	37,93	0,52	33,74	0,13	1005,67	6,63	9,66
<b>Febrero</b>	61,37	6,93	6,71	35,84	0,57	30,76	0,15	1493,33	6,77	9,42
<b>Marzo</b>	37,95	4,88	6,96	31,20	0,36	28,14	0,13	856,33	6,62	8,69

%M.O, porcentaje de materia orgánica.

**Tabla 55:** Características edafológicas de S-3 a lo largo del año.

<b>S-3</b>	<b>Ca (ppm)</b>	<b>Mg(ppm)</b>	<b>Na(ppm)</b>	<b>K(ppm)</b>	<b>Zn(ppm)</b>	<b>Fe (ppm)</b>	<b>P(ppm)</b>	<b>N(ppm)</b>	<b>pH</b>	<b>%M.O.</b>
<b>Abril (1999)</b>	25,88	3,87	6,96	31,10	0,89	26,29	0,46	653,33	6,50	7,36
<b>Mayo</b>	36,64	4,73	8,36	39,33	1,37	27,23	0,58	256,67	6,67	9,38
<b>Junio</b>	36,44	5,95	5,62	36,74	0,44	21,67	0,45	385,00	6,71	8,56
<b>Julio</b>	35,32	5,54	12,09	33,21	0,32	22,50	0,44	350,00	6,62	9,72
<b>Agosto</b>	45,02	6,69	9,17	37,49	1,03	26,89	0,45	501,67	6,68	9,61
<b>Septiembre</b>	61,24	6,36	8,78	35,10	1,10	22,17	0,55	338,33	5,97	9,92
<b>Octubre</b>	46,20	4,36	6,51	24,83	0,29	19,00	0,32	898,33	5,96	8,04
<b>Noviembre</b>	48,08	5,48	8,98	24,25	0,79	22,00	0,34	105,00	5,82	8,27
<b>Diciembre</b>	46,58	6,41	7,53	35,37	0,68	28,86	0,15	560,00	6,35	7,36
<b>Enero (2000)</b>	44,90	5,98	7,49	27,77	0,40	30,05	0,11	466,67	6,67	9,66
<b>Febrero</b>	53,30	6,41	6,51	29,25	0,42	23,14	0,10	1421,00	6,77	8,33
<b>Marzo</b>	31,87	5,00	6,72	23,59	0,28	26,36	0,13	571,67	6,35	6,76

%M.O, porcentaje de materia orgánica.

**Tabla 56:** Características edafológicas del control a lo largo del año.

<b>CONTROL</b>	<b>Ca (ppm)</b>	<b>Mg(ppm)</b>	<b>Na(ppm)</b>	<b>K(ppm)</b>	<b>Zn(ppm)</b>	<b>Fe (ppm)</b>	<b>P(ppm)</b>	<b>N(ppm)</b>	<b>pH</b>	<b>%M.O.</b>
<b>Abril (1999)</b>	15,33	2,65	9,15	22,79	0,59	28,79	0,49	647,50	6,05	4,89
<b>Mayo</b>	14,01	2,94	8,54	15,96	0,43	29,21	0,21	157,50	5,60	4,59
<b>Junio</b>	34,53	5,20	12,40	29,58	0,30	36,75	0,95	332,50	6,41	8,54
<b>Julio</b>	28,21	4,71	14,37	29,88	0,23	34,50	0,42	437,50	6,22	6,77
<b>Agosto</b>	20,94	4,03	10,00	22,31	0,30	24,34	0,31	490,00	6,32	6,11
<b>Septiembre</b>	29,58	3,65	10,08	22,13	0,13	24,25	0,37	612,50	5,68	4,96
<b>Octubre</b>	27,72	3,23	12,79	34,00	0,29	22,25	0,32	122,50	6,12	6,08
<b>Noviembre</b>	22,14	2,84	9,31	4,00	0,01	19,25	0,27	385,00	4,67	2,16
<b>Diciembre</b>	29,99	5,36	10,02	15,37	0,14	31,89	0,05	1095,50	6,32	4,89
<b>Enero (2000)</b>	19,25	3,54	7,24	12,87	0,06	31,71	0,09	427,00	6,10	3,08
<b>Febrero</b>	23,26	3,42	9,83	14,55	0,13	25,82	0,04	430,50	5,75	3,62
<b>Marzo</b>	27,80	4,01	8,92	14,01	0,11	34,21	0,09	623,00	6,32	4,35

%M.O, porcentaje de materia orgánica.

## **IV.5.- EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EN SUELOS ASOCIADOS A *C. ladanifer*.**

Se han realizado dos estudios con respecto a la cuantificación de compuestos en suelos. Se ha determinado la cantidad de fenoles totales en suelo, y por HPLC se ha analizado la cantidad de cada compuesto por separado.

### **IV.5.1.- Distribución de los fenoles totales en suelos asociados a *C. ladanifer*.**

La Tabla 58 muestra la concentración de fenoles totales en los diferentes puntos estudiados a lo largo de todo el año. Estos resultados se han expresado como cantidad de ácido cinámico, que es el compuesto que se ha utilizado como patrón. Hay que destacar que los resultados obtenidos no son válidos para cuantificar los fenoles absolutos, sino que exclusivamente nos sirve como sistemática de comparación entre los suelos y sus variaciones a lo largo del tiempo.

Los resultados muestran que el control tiene menor cantidad de fenoles que los suelos de jarales, aunque S-1 y S-3 del mes de Abril y S-1 y S-2 de Agosto tienen un valor menor que el control.

Existe una clara variación a lo largo del año en los fenoles totales y entre los suelos. La mayor cantidad de fenoles se aprecia en S-1, seguido de S-3 y S-2. En S-1 los valores más altos lo presentan los meses de Marzo, Julio, Agosto, Septiembre, Enero y Febrero. En S-2 la distribución de fenoles totales es más homogénea a lo largo del año, predominando en los meses de Mayo, Junio y Febrero. S-3 muestra un patrón parecido a S-1 existiendo mayor cantidad de fenoles en Marzo, Junio, Agosto, Enero y Febrero.

Si se considera la media de los suelos, para cuantificar los fenoles totales, se aprecia que la variación durante los diferentes meses del año de la concentración de fenoles totales en suelos asociados a *C. ladanifer* es mayor que en suelos control (K-W test;  $p=0,0001$ ;  $p=0,03$ , respectivamente) (Tabla 59). La cantidad de fenoles totales es

mayor en los suelos asociados a *C. ladanifer* que en suelos control a excepción de los meses abril, agosto y diciembre, siendo significativamente mayor (M-W test;  $p < 0,05$ ) en los meses de enero, febrero, marzo, mayo, octubre y noviembre, encontrando en estos suelos de 82,7 a 1443,9% más de fenoles totales que en los suelos control. La concentración de fenoles totales en los suelos asociados a *C. ladanifer* y suelos control varía de 6,4 a 38,2  $\mu\text{g/g}$  y de 1,3 a 26,0  $\mu\text{g/g}$  de suelo, respectivamente. La concentración mínima se encuentra en los meses de abril y diciembre en los suelos asociados a *C. ladanifer*, y en mayo, octubre y noviembre en suelos control.

**Tabla 58:** Concentración de fenoles totales presentes en los suelos estudiados a lo largo del año, expresada como  $\mu\text{g/g}$  de ácido cinámico.

	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>Control</b>
<b>Marzo</b>	30,7 $\pm$ 12,8	15,2 $\pm$ 4,6	25,0 $\pm$ 24,5	5,6 $\pm$ 0,7
<b>Abril</b>	5,1 $\pm$ 5,2	15,9 $\pm$ 10,2	3,5 $\pm$ 2,8	11,1 $\pm$ 2,6
<b>Mayo</b>	17,3 $\pm$ 21,7	22,3 $\pm$ 11,0	11,0 $\pm$ 4,8	2,9 $\pm$ 0,7
<b>Junio</b>	18,4 $\pm$ 7,3	28,5 $\pm$ 42,5	18,3 $\pm$ 14,1	12,6 $\pm$ 9,2
<b>Julio</b>	23,9 $\pm$ 23,5	11,8 $\pm$ 6,8	10,8 $\pm$ 5,7	8,8 $\pm$ 0,7
<b>Agosto</b>	24,7 $\pm$ 10,6	17,7 $\pm$ 7,6	34,2 $\pm$ 9,7	26,0 $\pm$ 11,2
<b>Septiembre</b>	50,3 $\pm$ 50,3	17,0 $\pm$ 12,7	12,9 $\pm$ 7,6	12,3 $\pm$ 0,1
<b>Octubre</b>	16 $\pm$ 13,8	19,9 $\pm$ 20,8	20,9 $\pm$ 11,8	1,3 $\pm$ 0,7
<b>Noviembre</b>	7,5 $\pm$ 4,4	12,2 $\pm$ 4,5	20,5 $\pm$ 15,2	3,1 $\pm$ 0,7
<b>Diciembre</b>	5,6 $\pm$ 2,8	5,4 $\pm$ 0,8	8,5 $\pm$ 1,4	3,6 $\pm$ 2,7
<b>Enero</b>	28,6 $\pm$ 9,1	16,7 $\pm$ 5,0	25,3 $\pm$ 9,9	6,2 $\pm$ 1,9
<b>Febrero</b>	46,2 $\pm$ 16,4	2,9 $\pm$ 13,9	36,5 $\pm$ 13,1	5,6 $\pm$ 1,7

**Tabla 59:** Media de la concentración de fenoles totales en suelos asociados a *Cistus ladanifer* y en suelos Control estudiados a lo largo del año.

	<b>Fenoles Totales (<math>\mu\text{g/g}</math> suelo)</b>		
	<b>Suelos <i>C. ladanifer</i></b>	<b>Control</b>	<b>% incremento(+)/disminución(-) respecto a suelos control</b>
<b>Marzo</b>	25,7 $\pm$ 12,3*	5,6 $\pm$ 0,65	374,4
<b>Abril</b>	8,6 $\pm$ 6,8	11,1 $\pm$ 2,6	682,1
<b>Mayo</b>	17,1 $\pm$ 10,2*	2,9 $\pm$ 0,65	463,1
<b>Junio</b>	23,2 $\pm$ 20,4	12,7 $\pm$ 9,2	-77,5
<b>Julio</b>	16,9 $\pm$ 14,4	8,8 $\pm$ 0,65	589,7
<b>Agosto</b>	25,5 $\pm$ 11,6	26,0 $\pm$ 11,2	182,7
<b>Septiembre</b>	16,7 $\pm$ 10,5	12,3 $\pm$ 1,9	192,1
<b>Octubre</b>	20,2 $\pm$ 10,4*	1,3 $\pm$ 0,1	-2,0
<b>Noviembre</b>	14,2 $\pm$ 8,4*	3,1 $\pm$ 0,65	135,7
<b>Diciembre</b>	6,4 $\pm$ 2,3	6,6 $\pm$ 2,7	1553,9
<b>Enero</b>	23,4 $\pm$ 9,55*	6,25 $\pm$ 1,9	458,1
<b>Febrero</b>	38,2 $\pm$ 10,3*	5,6 $\pm$ 1,75	-4,0
<b>p(K-W)<sup>a</sup></b>	0,0001	0,03	

\* Significativamente diferente del control (Mann-Whitney  $p < 0,05$ ).

<sup>a</sup>Resultados del test Kruskal-Wallis para la variación anual de fenoles totales

#### **IV.5.2.- Identificación y cuantificación por HPLC de compuestos presentes en suelos asociados a *C. ladanifer*.**

##### *-. Identificación:*

De la extracción con metanol de los suelos asociados a jarales y suelos controles se detectaron por HPLC diferentes compuestos. Estos compuestos se encuentran en el exudado de *C. ladanifer* y sólo algunos de ellos se encontraron también en el suelo control. Los compuestos, que no se han detectado en el exudado no fueron considerados en este estudio.

En los cromatogramas obtenidos se pudieron identificar, comparando el espectro y tiempos de retención de patrones de compuestos identificados, flavonoides como la Ap , el K-3 y el K-3,7, otros ácidos fenólicos como hidroxibenzoico, cinámico e hidroxicinámico y un hidrocarburo, azuleno. Estos compuestos juntos con otros no identificados, pero que sí están presentes en el exudado de *C. ladanifer* se muestran en la Tabla 60.

**Tabla 60:** Compuestos extraídos de suelos asociados a *C. ladanifer*.

Compuesto	Tiempo de retención (min.)	$\lambda$ máx. (nm.)	Presencia control
Ácido hidroxibenzoico	3,5	254,9	Si
Ácido cinámico	3,8	270	Si
Sin identificar	4,7	253	No
Flavona sin identificar	5	229-265-317	No
Ácido hidroxicinámico	5,8	254	Si
Sin identificar	6,5	245	No
Sin identificar	7	240	No
Ap	8	265-340	No
Sin identificar	9	252,6	Si
Sin identificar	10	240,8	No
K-3	11	365-350	No
Sin identificar	16	258,5	No
Sin identificar	17	244,3	No
Azuleno	21	273,8	No
K-3,7	22	265-350	No
Sin identificar	25	253	No
Sin identificar	36	240	No

*-. Cuantificación:*

Como puede apreciarse la composición de los suelos de jarales y suelos controles es muy diferente (Tablas 61-79). De todos estos compuestos, en los suelos control sólo se ha detectado el ácido hidroxibenzoico en Junio, Julio, Agosto, Septiembre, el compuesto de longitud de onda máxima igual a 252,6 en Diciembre, Enero, y Marzo y el ácido hidroxicinámico en Marzo, en cantidades muy bajas.

Entre los suelos de jarales la distribución de estos compuestos a lo largo del año y entre ellos es bastante heterogénea. La composición de estos compuestos varía entre los meses cuantitativa y cualitativamente. Sólo el K-3 y la flavona son detectados a lo largo de todos los meses muestreados.

De los tres puntos seleccionados el S-2 es el que menor variedad de compuestos presenta a la vez que menor cantidad de cada uno de ellos, seguido de S-1 y S-3.

En todos ellos se observa que la mayor cantidad de compuestos se produce en los meses de otoño e invierno y la menor en los meses correspondientes a primavera. Hay que destacar por tanto que la composición de estos compuestos presentan variaciones estacionales. De esta forma, el ácido hidroxibenzoico es detectado en los tres puntos de muestreos de jarales y el control, prácticamente todo el año a excepción de los meses de Enero y Febrero en los jarales y durante el verano en el control. Por el contrario el ácido cinámico, es detectado sólo en Septiembre en el S-1, Diciembre en el S-2 y Octubre y Diciembre en S-3.

El hidroxicinámico, no es detectado en los meses de primavera en los suelos de jarales, pero sí en el control. Los compuestos de longitud de onda máxima 252,6 y 240,8 son detectados prácticamente todos los meses, pero se observa una clara variación cuantitativa, siendo estos compuestos más abundantes durante los meses de invierno. Los compuestos que absorben a 258,5 y 244,3 presentan el mismo comportamiento, aumentando la cantidad de ellos en los meses de invierno. Por el contrario, no se detectan los compuestos 253,7 y 240 durante los meses de invierno y es en la primavera cuando presentan mayor cantidad, en concreto en el mes de Marzo. Otro compuesto con una clara distribución estacional es el azuleno. Éste aunque no aparece siempre en los

mismos suelos a lo largo de los diferentes meses, es más abundante en primavera y verano.

**Tabla 61:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en los suelos recogidos de los diferentes puntos de muestreo en el mes de enero\*.

ENERO	S1	S2	S3	C
Ac. hidroxibenzoico	-	-	-	-
Ac. cinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 253nm	+++	-	-	-
Flavona sin identificar	-	-	+	-
Ac. hidroxicinámico	+	-	+	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 245nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 240nm	+	-	-	-
Apigenina	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 252,6nm	++	++	++	+
S.I. $\lambda_{max}$ . 240,8nm	+	-	-	-
K-3	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 258,5nm	+	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 244,3nm	+	-	-	-
Azuleno	+	+	-	-
K-3,7	+	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 253,7nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 240nm	-	-	-	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia <0,001

'++': compuesto con absorbancia >0,001<0,003

'+++': compuesto con absorbancia >0,003<0,01

'++++': compuesto con absorbancia >0,01

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 62:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en los suelos recogidos de los diferentes puntos de muestreo en el mes de febrero\*.

<b>FEBRERO</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>C</b>
Ac. hidroxibenzoico	-	-	-	-
Ac. cinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253nm	-	-	-	-
Flavona sin identificar	-	+	++	-
Ac. hidroxicinámico	+	+	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 245nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	+	-	-	-
Apigenina	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 252,6nm	+	++	+++	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240,8nm	-	-	+	-
K-3	++	++	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 258,5nm	++	+	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 244,3nm	+	-	-	-
Azuleno	-	-	-	-
K-3,7	+	-	++	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253,7nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	-	-	-	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia  $<0,001$

'++': compuesto con absorbancia  $>0,001<0,003$

'+++': compuesto con absorbancia  $>0,003<0,01$

'++++': compuesto con absorbancia  $>0,01$

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 63:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en los suelos recogidos de los diferentes puntos de muestreo en el mes de marzo\*.

<b>MARZO</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>C</b>
Ac. hidroxibenzoico	++	+	+	-
Ac. cinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253nm	+	-	+	-
Flavona sin identificar	-	-	-	-
Ac. hidroxicinámico	-	-	-	+
S.I. $\lambda_{\max}$ . 245nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	+	-	-	-
Apigenina	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 252,6nm	+	-	-	+
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240,8nm	++	+	+	-
K-3	-	+	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 258,5nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 244,3nm	++	-	+	-
Azuleno	-	-	-	-
K-3,7	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253,7nm	+++	+	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	++	+	+	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+': compuesto con absorbancia <0,001

'++': compuesto con absorbancia >0,001<0,003

'+++': compuesto con absorbancia >0,003<0,01

'++++': compuesto con absorbancia >0,01

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 64:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en los suelos recogidos de los diferentes puntos de muestreo en el mes de abril\*.

<b>ABRIL</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>C</b>
Ac. hidroxibenzoico	+++	+++	+	-
Ac. cinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 253nm	+	++++	+	-
Flavona sin identificar	-	+	-	-
Ac. hidroxicinámico	-	+	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 245nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 240nm	-	-	-	-
Apigenina	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 252,6nm	+	+	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 240,8nm	-	-	-	-
K-3	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 258,5nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 244,3nm	-	-	-	-
Azuleno	-	-	+	-
K-3,7	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 253,7nm	+	+	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 240nm	-	-	-	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+': compuesto con absorbancia  $<0,001$

'++': compuesto con absorbancia  $>0,001<0,003$

'+++': compuesto con absorbancia  $>0,003<0,01$

'++++': compuesto con absorbancia  $>0,01$

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 65:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en los suelos recogidos de los diferentes puntos de muestreo en el mes de mayo\*.

MAYO	S1	S2	S3	C
Ac. hidroxibenzoico	+++	++++	+++	-
Ac. cinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 253nm	+	+++	+	-
Flavona sin identificar	+	+++	-	-
Ac. hidroxicinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 245nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 240nm	-	-	-	-
Apigenina	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 252,6nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 240,8nm	-	+	-	-
K-3	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 258,5nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 244,3nm	-	-	-	-
Azuleno	-	-	++	-
K-3,7	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 253,7nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 240nm	-	-	+	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia  $<0,001$

'++': compuesto con absorbancia  $>0,001<0,003$

'+++': compuesto con absorbancia  $>0,003<0,01$

'++++': compuesto con absorbancia  $>0,01$

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 66:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en los suelos recogidos de los diferentes puntos de muestreo en el mes de junio\*.

<b>JUNIO</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>C</b>
Ac. hidroxibenzoico	++++	+	-	+
Ac. cinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253nm	-	-	-	-
Flavona sin identificar	+	-	-	-
Ac. hidroxicinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 245nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	-	-	-	-
Apigenina	+	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 252,6nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240,8nm	-	+	+	-
K-3	+++	++	+++	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 258,5nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 244,3nm	-	-	-	-
Azuleno	++	+	+	-
K-3,7	+	+	++	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253,7nm	+	-	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	+	-	+	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+': compuesto con absorbancia  $<0,001$

'++': compuesto con absorbancia  $>0,001<0,003$

'+++': compuesto con absorbancia  $>0,003<0,01$

'++++': compuesto con absorbancia  $>0,01$

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 67:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en los suelos recogidos de los diferentes puntos de muestreo en el mes de julio\*.

<b>JULIO</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>C</b>
Ac. hidroxibenzoico	+++	+++	++++	++++
Ac. cinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253nm	-	-	+	-
Flavona sin identificar	++	-	++	-
Ac. hidroxicinámico	+	-	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 245nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	+	-	-	-
Apigenina	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 252,6nm	++	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240,8nm	-	-	-	-
K-3	+	-	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 258,5nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 244,3nm	-	-	-	-
Azuleno	+	-	+	-
K-3,7	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253,7nm	+	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	-	-	-	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia  $<0,001$

'++': compuesto con absorbancia  $>0,001<0,003$

'+++': compuesto con absorbancia  $>0,003<0,01$

'++++': compuesto con absorbancia  $>0,01$

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 68:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en los suelos recogidos de los diferentes puntos de muestreo en el mes de agosto\*.

AGOSTO	S1	S2	S3	C
Ac. hidroxibenzoico	+++	+++	+++	++++
Ac. cinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 253nm	+	-	++	-
Flavona sin identificar	+	-	++	-
Ac. hidroxicinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 245nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 240nm	-	-	-	-
Apigenina	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 252,6nm	++	-	-	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 240,8nm	+	-	-	-
K-3	+	+	+++	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 258,5nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 244,3nm	-	-	+	-
Azuleno	-	+	-	-
K-3,7	-	+	++	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 253,7nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 240nm	-	-	-	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia  $<0,001$

'++': compuesto con absorbancia  $>0,001<0,003$

'+++': compuesto con absorbancia  $>0,003<0,01$

'++++': compuesto con absorbancia  $>0,01$

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 69:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en los suelos recogidos de los diferentes puntos de muestreo en el mes de septiembre\*.

SEPTIEMBRE	S1	S2	S3	C
Ac. hidroxibenzoico	++++	++++	++++	+++
Ac. cinámico	++	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253nm	-	+	-	-
Flavona sin identificar	+++	-	-	-
Ac. hidroxicinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 245nm	-	+	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	-	-	-	-
Apigenina	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 252,6nm	+	+	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240,8nm	-	-	-	-
K-3	+++	++	++	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 258,5nm	-	+	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 244,3nm	+++	+	+	-
Azuleno	-	-	-	-
K-3,7	+++	+	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253,7nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	-	+	-	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia  $<0,001$

'++': compuesto con absorbancia  $>0,001<0,003$

'+++': compuesto con absorbancia  $>0,003<0,01$

'++++': compuesto con absorbancia  $>0,01$

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 70:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en los suelos recogidos de los diferentes puntos de muestreo en el mes de octubre\*.

OCTUBRE	S1	S2	S3	C
Ac. hidroxibenzoico	-	+++	+++	-
Ac. cinámico	-	-	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 253nm	+	++	-	-
Flavona sin identificar	+	+	++	-
Ac. hidroxicinámico	+++	-	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 245nm	+	+	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 240nm	-	+	+	-
Apigenina	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 252,6nm	+++	+	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 240,8nm	+	-	-	-
K-3	++	+	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 258,5nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 244,3nm	+	-	+	-
Azuleno	-	-	+	-
K-3,7	+	+++	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 253,7nm	-	-	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 240nm	+	-	+	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia <0,001

'++': compuesto con absorbancia >0,001<0,003

'+++': compuesto con absorbancia >0,003<0,01

'++++': compuesto con absorbancia >0,01

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 71:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en los suelos recogidos de los diferentes puntos de muestreo en el mes de noviembre\*.

NOVIEMBRE	S1	S2	S3	C
Ac. hidroxibenzoico	-	-	+	-
Ac. cinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 253nm	-	-	-	-
Flavona sin identificar	-	-	+	-
Ac. hidroxicinámico	-	-	+	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 245nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 240nm	+	-	+	-
Apigenina	-	-	+	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 252,6nm	+++	+	++	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 240,8nm	++	-	++	-
K-3	+	+	+	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 258,5nm	-	-	+	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 244,3nm	-	-	-	-
Azuleno	-	+	-	-
K-3,7	+	+	+	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 253,7nm	+	-	+	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 240nm	+	+	+	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia  $<0,001$

'++': compuesto con absorbancia  $>0,001<0,003$

'+++': compuesto con absorbancia  $>0,003<0,01$

'++++': compuesto con absorbancia  $>0,01$

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 72:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en los suelos recogidos de los diferentes puntos de muestreo en el mes de diciembre\*.

DICIEMBRE	S1	S2	S3	C
Ac. hidroxibenzoico	-	+	-	-
Ac. cinámico	-	+	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253nm	-	-	+	-
Flavona sin identificar	+	-	+	-
Ac. hidroxicinámico	+	+	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 245nm	+	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	-	-	-	-
Apigenina	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 252,6nm	++	+	+	+
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240,8nm	-	-	+	-
K-3	+	+	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 258,5nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 244,3nm	-	++	-	-
Azuleno	+	+	-	-
K-3,7	+	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253,7nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	-	-	-	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia <0,001

'++': compuesto con absorbancia >0,001<0,003

'+++': compuesto con absorbancia >0,003<0,01

'++++': compuesto con absorbancia >0,01

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 73:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en el suelo S-1 recogido a lo largo del año\*.

S-1	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept.	Octub.	Nov.	Dic.
Ac. hidroxibenzoico	-	-	++	+++	+++	++++	+++	+++	++++	-	-	-
Ac. cinámico	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 253nm	+++	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
Flavona sin identificar	-	-	-	-	+	+	++	+	+++	+	-	+
Ac. hidroxicinámico	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+++	-	+
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 245nm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 240nm	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Apigenina	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 252,6nm	++	+	+	+	-	-	++	++	+	+++	+++	++
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 240,8nm	+	-	++	-	-	-	-	+	-	+	++	-
K-3	-	++	-	-	-	+++	+	+	+++	++	+	+
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 258,5nm	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 244,3nm	+	+	++	-	-	-	-	-	+++	+	-	-
Azuleno	+	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	+
K-3,7	+	+	-	-	-	+	-	-	+++	+	+	+
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 253,7nm	-	-	+++	+	-	+	+	-	-	-	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 240nm	-	-	++	-	-	+	-	-	-	+	+	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia <0,001

'++': compuesto con absorbancia >0,001<0,003

'+++': compuesto con absorbancia >0,003<0,01

'++++': compuesto con absorbancia >0,01

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 74:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en el suelo S-2 recogido a lo largo del año\*.

S-2	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept.	Octub.	Nov.	Dic.
Ac. hidroxibenzoico	-	-	+	+++	++++	+	+++	+++	++++	+++	-	+
Ac. cinámico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253nm	-	-	-	++++	+++	-	-	-	+	++	-	-
Flavona sin identificar	-	+	-	+	+++	-	-	-	-	+	-	-
Ac. hidroxicinámico	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
S.I. $\lambda_{\max}$ . 245nm	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Apigenina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 252,6nm	++	++	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240,8nm	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
K-3	-	++	+	-	-	++	-	+	++	+	+	+
S.I. $\lambda_{\max}$ . 258,5nm	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 244,3nm	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++
Azuleno	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
K-3,7	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+++	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253,7nm	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia <0,001

'++' : compuesto con absorbancia >0,001<0,003

'+++': compuesto con absorbancia >0,003<0,01

'++++': compuesto con absorbancia >0,01

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 75:** Presencia de los compuestos separados por HPLC, en el suelo S-3 recogido a lo largo del año\*.

S-3	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept.	Octub.	Nov.	Dic.
Ac. hidroxibenzoico	-	-	+	+	+++	-	++++	+++	++++	+++	+	-
Ac. cinámico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253nm	-	-	+	+	+	-	+	++	-	-	-	+
Flavona sin identificar	+	++	-	-	-	-	++	++	-	++	+	+
Ac. hidroxicinámico	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
S.I. $\lambda_{\max}$ . 245nm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Apigenina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 252,6nm	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240,8nm	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	++	+
K-3	-	+	+	-	-	+++	+	+++	++	+	+	+
S.I. $\lambda_{\max}$ . 258,5nm	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 244,3nm	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Azuleno	-	-	-	+	++	+	+	-	-	+	-	-
K-3,7	-	++	-	-	-	++	-	++	+	+	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253,7nm	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia <0,001

'++' : compuesto con absorbancia >0,001<0,003

'+++': compuesto con absorbancia >0,003<0,01

'++++': compuesto con absorbancia >0,01

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 76:** Presencia en los diferentes puntos de muestreo de los compuestos separados por HPLC en los suelos recogidos en los meses de primavera\*.

<b>PRIMAVERA</b>	<b>S-1</b>	<b>S-2</b>	<b>S-3</b>	<b>C</b>
Ac. hidroxibenzoico	+++	+++	++	-
Ac. cinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253nm	+	+++	+	-
Flavona sin identificar	+	++	-	-
Ac. hidroxicinámico	-	-	-	+
S.I. $\lambda_{\max}$ . 245nm	-	+	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	+	-	-	-
Apigenina	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 252,6nm	+	+	-	+
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240,8nm	+	+	+	-
K-3	-	+	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 258,5nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 244,3nm	+	-	+	-
Azuleno	-	-	+	-
K-3,7	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253,7nm	++	+	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	-	+	+	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia  $<0,001$

'++': compuesto con absorbancia  $>0,001<0,003$

'+++': compuesto con absorbancia  $>0,003<0,01$

'++++': compuesto con absorbancia  $>0,01$

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 77:** Presencia en los diferentes puntos de muestreo de los compuestos separados por HPLC en los suelos recogidos en los meses de verano\*.

VERANO	S-1	S-2	S-3	C
Ac. hidroxibenzoico	+++	++	+++	++++
Ac. cinámico	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253nm	+	-	+	-
Flavona sin identificar	++	-	++	-
Ac. hidroxicinámico	+	-	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 245nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	+	-	-	-
Apigenina	+	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 252,6nm	++	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240,8nm	+	+	+	-
K-3	++	+	+++	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 258,5nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 244,3nm	-	-	+	-
Azuleno	+	+	+	-
K-3,7	+	+	++	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 253,7nm	+	-	+	-
S.I. $\lambda_{\max}$ . 240nm	+	-	+	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia  $<0,001$

'++': compuesto con absorbancia  $>0,001<0,003$

'+++': compuesto con absorbancia  $>0,003<0,01$

'++++': compuesto con absorbancia  $>0,01$

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 78:** Presencia en los diferentes puntos de muestreo de los compuestos separados por HPLC en los suelos recogidos en los meses de otoño\*.

OTOÑO	S-1	S-2	S-3	C
Ac. hidroxibenzoico	+	++	+++	+
Ac. cinámico	+	-	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 253nm	+	+	-	-
Flavona sin identificar	++	+	+	-
Ac. hidroxicinámico	+	-	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 245nm	+	+	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 240nm	+	+	+	-
Apigenina	-	-	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 252,6nm	++	++	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 240,8nm	+	-	+	-
K-3	++	++	++	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 258,5nm	-	+	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 244,3nm	++	+	+	-
Azuleno	-	+	+	-
K-3,7	++	++	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 253,7nm	+	-	+	-
S.I. $\lambda_{\text{max}}$ . 240nm	+	+	+	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+' : compuesto con absorbancia  $<0,001$

'++': compuesto con absorbancia  $>0,001 < 0,003$

'+++': compuesto con absorbancia  $>0,003 < 0,01$

'++++': compuesto con absorbancia  $>0,01$

S.I: Compuesto sin identificar.

**Tabla 79:** Presencia en los diferentes puntos de muestreo de los compuestos separados por HPLC en los suelos recogidos en los meses de invierno\*.

INVIERNO	S-1	S-2	S-3	C
Ac. hidroxibenzoico	-	+	-	-
Ac. cinámico	-	+	+	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 253nm	+	-	+	-
Flavona sin identificar	+	+	++	-
Ac. hidroxicinámico	+	+	+	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 245nm	+	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 240nm	+	-	-	-
Apigenina	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 252,6nm	++	++	+++	+
S.I. $\lambda_{max}$ . 240,8nm	+	-	++	-
K-3	++	+	++	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 258,5nm	++	+	+	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 244,3nm	+	+	-	-
Azuleno	+	+	-	-
K-3,7	+	-	+	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 253,7nm	-	-	-	-
S.I. $\lambda_{max}$ . 240nm	-	-	-	-

\*Estos compuestos se han cuantificado en unidades de absorbancia

'-': ausencia del compuesto

'+': compuesto con absorbancia <0,001

'++': compuesto con absorbancia >0,001<0,003

'+++': compuesto con absorbancia >0,003<0,01

'++++': compuesto con absorbancia >0,01

S.I: Compuesto sin identificar.

Estos resultados muestran claramente que la presencia de los flavonoides y de otros compuestos identificados con actividad alelopática no está restringida a las hojas, sino que también son detectados en el suelo. La variación cuantitativa y cualitativa encontrada puede estar relacionada con las condiciones climáticas, tanto la secreción de estos en el exudado como la incorporación de ellos al suelo. La vía de incorporación al suelo no ha sido establecida, pero puede ser por lluvia. Esto hace necesario conocer las precipitaciones y temperatura de los meses con los que se han realizado los muestreos para comprobar si hay una relación con estas condiciones climáticas. Para ello, se solicitaron los datos de precipitaciones de Cheles al Instituto Nacional de Meteorología de Badajoz. Estos datos se muestran en la Tabla 80.

Como puede observarse las mayores precipitaciones se dieron en Septiembre y Octubre, seguido de Diciembre y en menor cantidad Abril y Mayo. Con respecto a las temperaturas, destacar que ha sido un año con temperaturas elevadas incluso en los meses de invierno, sólo en el mes de Enero se obtienen temperaturas cercanas a 0°C. Con respecto a las temperaturas máximas en el mes de Febrero y Marzo se registraron temperaturas más alta a la media (Cabezas y Escudero, 1989).

**Tabla 80:** Precipitación total y temperaturas medias máximas y mínimas correspondientes al año en el que se realizaron los estudios.

<b>Mes</b>	<b>P. Total (mm)</b>	<b>T<sup>a</sup> máx.(°C)</b>	<b>T<sup>a</sup> mín.(°C)</b>
<b>Abril (1999)</b>	250	22,0	8,0
<b>Mayo</b>	340	25,9	11,7
<b>Junio</b>	60	32,4	14,5
<b>Julio</b>	0	36,6	17,6
<b>Agosto</b>	50	34,1	15,5
<b>Septiembre</b>	910	28,0	14,5
<b>Octubre</b>	1800	22,7	12,3
<b>Noviembre</b>	60	16,2	4,0
<b>Diciembre</b>	510	13,7	5,6
<b>Enero (2000)</b>	70	12,2	0,3
<b>Febrero</b>	150	17,9	3,9
<b>Marzo</b>	180	21,5	5,7

P. Total: precipitación total.

T<sup>a</sup> máx.: temperatura media máxima

T<sup>a</sup> mín.: temperatura media mínima

## **IV.6.- CUANTIFICACIÓN DEL EXUDADO Y FLAVONOIDES EN HOJAS Y TALLOS FOTOSINTÉTICOS DE *C. ladanifer*.**

### **IV.6.1.- Variación cuantitativa del exudado de *C. ladanifer* a lo largo del año.**

Se ha estudiado la secreción del exudado de hojas jóvenes, viejas y de los tallos fotosintéticos de ocho poblaciones de *C. ladanifer* a lo largo de un año. Las precipitaciones y temperaturas de cuatro de estas localidades (Cornalvo, Quintana de la Serena, Valle de la Serena y Hornachos) son de 450–550 l/m<sup>2</sup> de precipitación media anual y 17°C de temperatura media anual; a este conjunto de localidades se le ha denominado Grupo I. Los registros de temperatura y precipitaciones de las localidades: Valle de Santa Ana, Jerez de los Caballeros, Higuera la Real y Cabeza la Vaca (Grupo II), son de 15°C de temperatura media anual y 650-750 l/m<sup>2</sup> de precipitación media anual (Cabezas y Escudero, 1989).

La Figura 15 muestra la cantidad de exudado de hojas y tallos, expresada como miligramo de exudado por gramo de peso seco de hoja o tallo en cada uno de los grupos establecidos. Se observa, que independientemente de la estación, la secreción es significativamente más abundante ( $p < 0,05$  M-W) en las hojas jóvenes que en las viejas y tallos fotosintéticos.

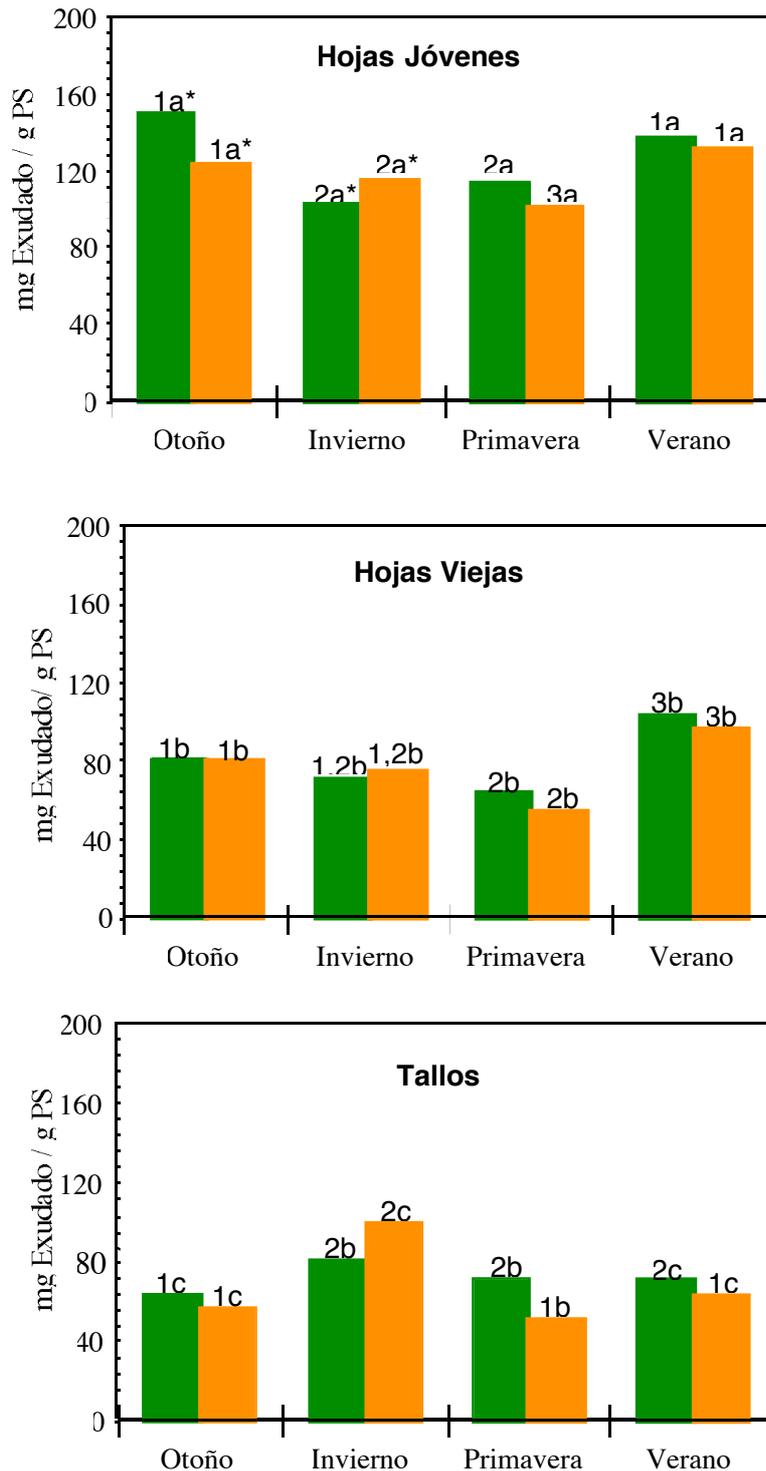
Independientemente de las condiciones climáticas a las que están sometidas estas poblaciones, en las hojas jóvenes la mayor cantidad de exudado se secreta en otoño y verano; con un máximo medio de 135,4-136,5mg/g de peso seco y disminuye en invierno y primavera con un mínimo medio de 107,3-108,6mg de exudado/g de peso seco de hoja. La secreción en las estaciones de verano y otoño frente a invierno y primavera es significativamente diferente.

Con respecto a los dos grupos en los que podemos dividir las poblaciones seleccionadas, solamente existen diferencias significativas en hojas jóvenes. En otoño la producción de exudado en hojas jóvenes en el Grupo I (poblaciones de altas temperaturas y bajas precipitaciones) es significativamente mayor que en el Grupo II

(bajas temperaturas y altas precipitaciones). Por el contrario, la situación se invierte en estas hojas en invierno, siendo la cantidad de exudado mayor en el Grupo II.

En hojas viejas la secreción de exudado es más abundante en verano, existiendo diferencias significativas respecto al resto de estaciones. Es en primavera cuando estas hojas muestran la menor secreción.

En tallos se observa un comportamiento diferente que en hojas. Los valores máximos de secreción se producen en invierno (obteniéndose un valor medio de 90mg/g de peso seco de tallo) y disminuye en otoño y primavera (obteniéndose un valor medio de 60mg/g de peso seco de tallo). Es de destacar que en el Grupo I los valores obtenidos en invierno no son significativamente diferentes a los de primavera y verano, mientras que en el Grupo II el exudado cuantificado si es significativamente diferente.



**Figura 15:** Contenido de exudado total en hojas jóvenes, viejas y tallos a lo largo del año en el Grupo I (■) y en el Grupo II (■), expresado como mg de exudado por g de peso seco de hoja o tallo. 1, 2, 3, 4: diferencias entre estaciones del mismo grupo, números iguales=significativamente no diferentes. a, b, c: diferencias entre hojas jóvenes, viejas y tallos del mismo grupo, letras iguales=significativamente no diferentes. \*: diferencia significativa entre grupos.  $P < 0,05$  (Mann-Whitney).

#### **IV.6.2.- Variación cuantitativa de flavonoides en el exudado a lo largo del año.**

Se ha estudiado a lo largo de un año la variación en la secreción de flavonoides del exudado de *C. ladanifer*, en ocho localidades con diferentes condiciones climáticas. Se ha cuantificado en tres tipos de muestras: hojas jóvenes, hojas viejas o senescentes aún verdes y tallos fotosintéticos.

En las Figuras 16 y 17 se muestra la cantidad de flavonoides totales (expresada en mg flavonoides/g de peso seco de exudado y mg flavonoides/g de peso seco de hoja o tallo, respectivamente) de las muestras recogidas en cuatro estaciones de las poblaciones seleccionadas.

En la figura 16 se observa que cuando se cuantifica la cantidad de flavonoides respecto al exudado presente en estos órganos, la síntesis de flavonoides en hojas jóvenes es significativamente diferente entre estaciones, siendo mínima en invierno, aumentando en primavera y alcanzando su máximo en verano, volviendo a disminuir en la estación de otoño. Desde invierno a verano la secreción se cuadriplica en las poblaciones de Grupo I y se triplica en las del Grupo II, existiendo diferencias significativas entre estos grupos.

En hojas viejas, en la estación de verano, no se alcanza la misma cantidad de flavonoides que se observa en las hojas jóvenes. Aunque la evolución en el tiempo presenta el mismo comportamiento, el máximo se alcanza en verano, las variaciones en la cantidad de flavonoides a lo largo del año no es tan notable en hojas viejas como en jóvenes. Estos resultados indican que las hojas correspondientes al año anterior que se mantienen en la planta, no tienen la misma capacidad de respuesta secretora que la de los órganos que se forman en ese año, manteniendo unos niveles de secreción o bien conservando el exudado del año anterior.

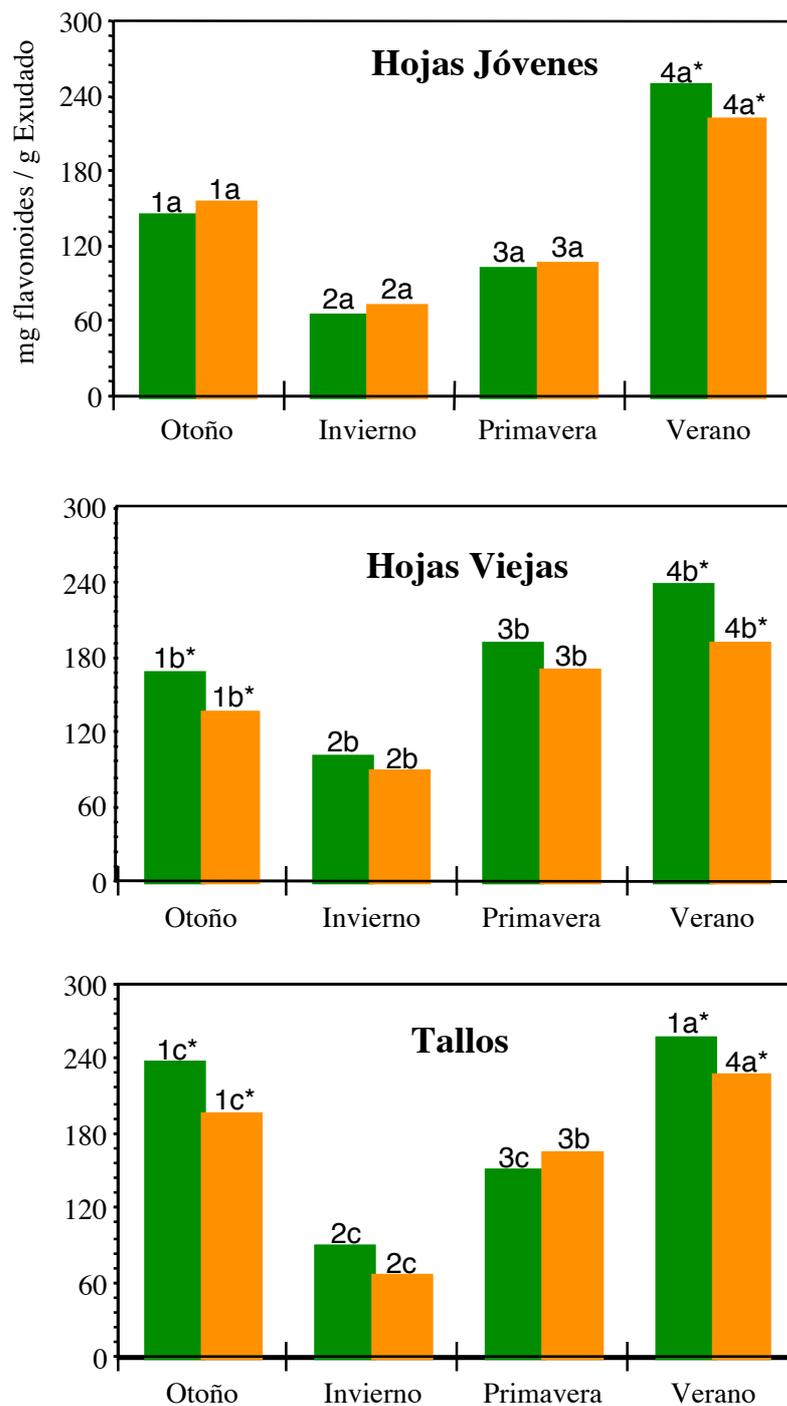
En tallos, se observa que el exudado es más rico en flavonoides en otoño y primavera que en las hojas jóvenes, pero la evolución del exudado es similar; la secreción comienza a aumentar en primavera hasta alcanzar el máximo en verano, conteniendo más del doble de flavonoides en esta estación que en invierno. Aunque, a partir del verano el contenido de flavonoides disminuye como en las hojas jóvenes,

durante la siguiente estación este descenso no es tan acusado. Esta diferencia de patrón de secreción, puede ser debida a que la capacidad secretora de las hojas disminuye una vez pasado el verano, mientras que en los tallos se mantiene, o bien, a que en ambos baja la síntesis de flavonoides, pero la adherencia del exudado debido a la orientación en estos dos órganos es diferente y las lluvias otoñales arrastran con más facilidad estos compuestos en las hojas.

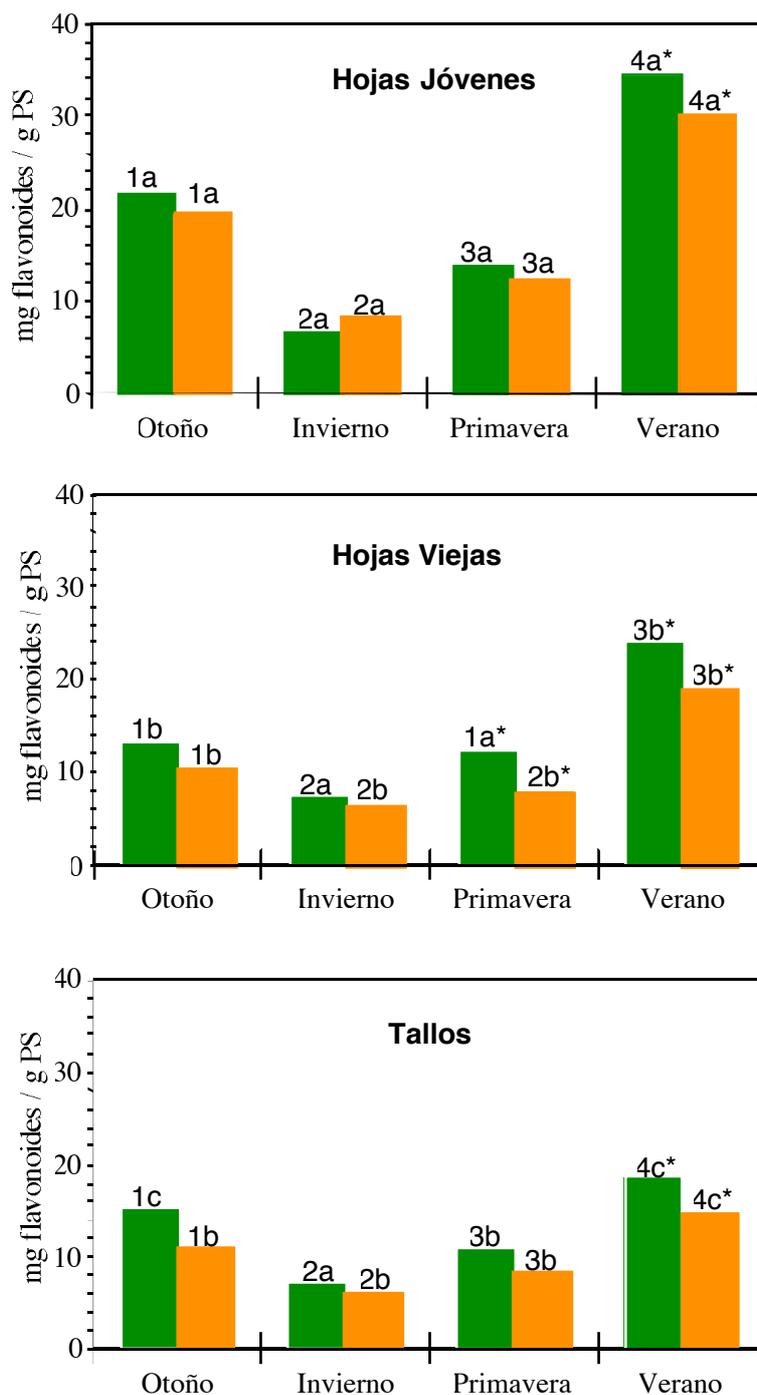
Se encuentran diferencias significativas entre los jarales del Grupo I y Grupo II durante la estación estival y otoño, en hojas viejas y tallos de los jarales del Grupo I se secretan mayor cantidad de flavonoides que en los del Grupo II. En hojas jóvenes, la diferencia significativa entre grupos únicamente se observa en verano. En esta figura se aprecia un aumento de flavonoides en las hojas y tallos que por término medio supone un incremento de casi unas cuatro veces más en verano que en invierno en los jarales del Grupo I y de tres veces en el Grupo II.

Cuando los flavonoides se cuantifican con respecto al peso seco de cada uno de los órganos (mg/gPS) el patrón de variación estacional es similar a cuando se expresa con respecto a la cantidad de exudado (Figura 17), destacando que en las hojas jóvenes el incremento en la síntesis de estos compuestos desde invierno a verano es superior. En concreto, la secreción se quintuplica en las localidades del Grupo I y se triplica en el Grupo II.

Se debe puntualizar que en hojas viejas y tallos las diferencias entre invierno y verano son significativamente menores que en hojas jóvenes y que aunque el contenido de flavonoides es mayor en el exudado de tallos que en el de hojas, cuando la cantidad de flavonoides totales se refiere a gramos de exudado, cuando se cuantifica con respecto al peso seco del órgano se hace menor en tallos que en hojas, debido claramente al mayor contenido de agua de las hojas.



**Figura 16:** Contenido de flavonoides totales en hojas jóvenes, viejas y tallos a lo largo del año en el Grupo I (■) y en el Grupo II (■), expresado como mg de flavonoides por g de peso seco de exudado. 1, 2, 3, 4: diferencias entre estaciones del mismo grupo, números iguales=significativamente no diferentes. a, b, c: diferencias entre hojas jóvenes, viejas y tallos del mismo grupo, letras iguales=significativamente no diferentes. \*: diferencia significativa entre grupos. P<0,05 (Mann-Whitney).



**Figura 17:** Contenido de flavonoides totales en hojas jóvenes, viejas y tallos a lo largo del año en el Grupo I (■) y en el Grupo II (■), expresado como mg de flavonoides por g de peso seco de hoja o tallo. **1, 2, 3, 4:** diferencias entre estaciones del mismo grupo, números iguales=significativamente no diferentes. **a, b, c:** diferencias entre hojas jóvenes, viejas y tallos del mismo grupo, letras iguales=significativamente no diferentes. \*: diferencia significativa entre grupos.  $P < 0,05$  (Mann-Whitney).

#### **IV.6.3.- Variación cualitativa y cuantitativa de cada uno de los flavonoides en el exudado a lo largo del año.**

Si se analiza la cantidad de cada uno de los flavonoides y el porcentaje que constituyen cada uno respecto al total de flavonoides (Tablas 81-86), se pueden apreciar las siguientes peculiaridades:

- Apigenina:

En hojas jóvenes (Tablas 81-82), la cantidad de Ap aumenta en primavera-verano no encontrándose diferencias significativas entre los grupos. Si se analiza el tanto por ciento que constituye este flavonoide frente a los demás, se observa que es el flavonoide minoritario, pues solo constituye aproximadamente el 1% de los flavonoides totales. Respecto a este porcentaje tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

En hojas viejas (Tablas 83-84), se observa el mismo comportamiento; la cantidad de este flavonoide aumenta en verano, constituyendo el 1% aproximadamente durante todo el año. En este tipo de hojas, se observan diferencias significativas entre los grupos en primavera cuando se cuantifica el porcentaje respecto a los demás flavonoides, contribuyendo en un porcentaje mayor en el Grupo II.

En tallos (Tablas 85-86), se aprecia la misma pauta que para las hojas, la cantidad de Ap aumenta en primavera-verano, pero con respecto al tanto por ciento que representa este flavonoide respecto de los demás, se observa que en primavera contribuye más de un 2%.

- 3-O-Metilkampferol:

La secreción de este flavonol aumenta en todos los puntos de muestreo durante la estación de otoño. En esta estación, la cantidad de K-3 es significativamente mayor en las hojas viejas y tallos del grupo I. En cuanto a la proporción que este compuesto constituye dentro del exudado, se observa que la mayor contribución se da en otoño, estando alrededor del 14% en hojas jóvenes. En hojas viejas y

tallos, existen diferencias significativas en otoño entre los grupos estudiados, constituyendo el 14% en el Grupo I y el 9% en el Grupo II en hojas viejas; y el 19% en el Grupo I y el 15,8% en el Grupo II en los tallos. En tallos el porcentaje es mayor que en hojas en todas las estaciones, tanto para el Grupo I como el Grupo II.

- 4'-*O*-Metilpigenina:

Esta flavona en hojas viejas y tallos aumenta en primavera, manteniéndose prácticamente constante durante el resto del año.

En hojas jóvenes el tanto por ciento que representa este flavonoide es aproximadamente del 20% en invierno, disminuyendo significativamente en primavera para alcanzar un mínimo del 5% en verano.

En hojas viejas, la diferencia entre estaciones es menor, con un 10% de media en otoño-invierno. En primavera permanece constante en el Grupo I, pero aumenta significativamente hasta un 15% en el Grupo II. En verano disminuye a un 7% en los dos grupos.

En tallos, se observan diferencias significativas entre los grupos durante todo el año, excepto en el verano, donde Ap-4' contribuye en ambos en aproximadamente un 10% del total de los flavonoides. En invierno y primavera aumenta la contribución de este flavonoide hasta el 17 y 22% respectivamente, en el Grupo I y hasta el 22 y 28% en el Grupo II.

- 7-*O*-Metilapigenina:

Los dos grupos de muestreo presentan el mismo patrón de secreción para esta flavona en hojas y tallos, aumentando en primavera y alcanzando su máximo en verano.

En cuanto al porcentaje que este flavonoide representa respecto al total, se observa que en hojas jóvenes, en verano y otoño, se mantiene alrededor del 11%, y aumenta hasta un 18% en invierno-primavera. No existen diferencias significativas entre los grupos. Los tallos presentan el mismo comportamiento.

Las hojas viejas muestran una pauta diferente, pues no hay diferencias estacionales en el Grupo I. En el Grupo II aumenta en primavera hasta un 19%, a diferencia del Grupo I donde sólo representa un 13%.

- 3,4'-Di-*O*-metilkampferol:

La secreción de este compuesto en todos los órganos estudiados es mínima en invierno y máxima en verano, presentando valores intermedios durante otoño y primavera. En verano se aprecian diferencias entre los grupos, mostrando valores más altos las muestras del Grupo I.

En cuanto a la proporción que este flavonoide representa respecto a los demás, se observa que en hojas jóvenes la contribución es del 12% en verano-otoño y aumenta hasta un 15% en invierno-primavera, sin que se observen diferencias entre los grupos. En hojas viejas y tallos prácticamente no se encuentran diferencias significativas entre las estaciones, resultando una media de aproximadamente el 12% para las hojas viejas y del 18% para los tallos. Únicamente se detectan diferencias significativas entre grupos en los tallos durante el otoño, mostrando mayor porcentaje el Grupo II.

- 3,7-Di-*O*-metilkampferol:

Este flavonoide es el mayoritario en todos los órganos, estaciones y grupos. Es mínimo en invierno, aumenta en primavera, alcanza su máximo en verano y vuelve a descender en otoño. Tanto en hojas jóvenes, como viejas y tallos la cantidad de este flavonoide es significativamente mayor en el Grupo I.

En cuanto al porcentaje que K-3,7 representa frente a los demás flavonoides, se aprecian diferencias estacionales y entre grupos. En hojas y tallos este compuesto se encuentra en mayor proporción en el Grupo I, excepto en hojas jóvenes durante el verano y hojas viejas en el otoño, donde las diferencias no son significativas.

En verano la proporción constituye alrededor del 60% en hojas y más del 45% en tallos, mostrando más de un 3% de diferencia entre los grupos en hojas viejas y tallos. En otoño la diferencia entre grupos, en hojas jóvenes y tallos, es aún

mayor (más del 6%). En invierno la diferencia entre grupos es del 4% en hojas y del 7% en tallos. Y en primavera, en hojas jóvenes, la diferencia se mantiene en un 4%, mientras que en hojas viejas y tallos aumenta hasta un 17% y 10% respectivamente.

**Tabla 81:** Cantidad de flavonoides en hojas jóvenes del Grupo I a lo largo del año, expresada como mg de flavonoide por g de peso seco de hoja y como porcentaje relativo al total de flavonoides.

<b>Grupo I: Hojas Jóvenes</b>								
	<b>Otoño</b>		<b>Invierno</b>		<b>Primavera</b>		<b>Verano</b>	
	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>
<b>Ap</b>	<b>0,17<sup>a</sup></b>	<b>0,78<sup>A</sup></b>	<b>0,09<sup>a</sup></b>	<b>1,45<sup>A</sup></b>	<b>0,17<sup>a</sup></b>	<b>1,20<sup>A</sup></b>	<b>0,23<sup>b</sup></b>	<b>0,66<sup>A</sup></b>
<b>K-3</b>	<b>2,85<sup>a</sup></b>	<b>13,29<sup>A</sup></b>	<b>0,48<sup>b</sup></b>	<b>7,59<sup>B</sup></b>	<b>0,99<sup>b</sup></b>	<b>7,17<sup>B</sup></b>	<b>2,31<sup>a</sup></b>	<b>6,72<sup>B</sup></b>
<b>Ap-4'</b>	<b>1,40<sup>a</sup></b>	<b>6,55<sup>A</sup></b>	<b>1,28<sup>a</sup></b>	<b>20,05<sup>B</sup></b>	<b>2,18<sup>b</sup></b>	<b>15,82<sup>C</sup></b>	<b>1,76<sup>a</sup></b>	<b>5,11<sup>A</sup></b>
<b>Ap-7</b>	<b>1,95<sup>a</sup></b>	<b>9,12<sup>A</sup></b>	<b>1,17<sup>b</sup></b>	<b>18,38<sup>B</sup></b>	<b>2,54<sup>c</sup></b>	<b>18,42<sup>B</sup></b>	<b>3,63<sup>d</sup></b>	<b>10,56<sup>A</sup></b>
<b>K-3,4</b>	<b>2,40<sup>a</sup></b>	<b>11,21<sup>A</sup></b>	<b>0,99<sup>b</sup></b>	<b>15,56<sup>B</sup></b>	<b>1,97<sup>a</sup></b>	<b>14,25<sup>BC</sup></b>	<b>4,47<sup>c*</sup></b>	<b>13,01<sup>AC</sup></b>
<b>K-3,7</b>	<b>12,65<sup>a*</sup></b>	<b>59,04<sup>A*</sup></b>	<b>2,35<sup>b</sup></b>	<b>36,97<sup>B*</sup></b>	<b>5,95<sup>c*</sup></b>	<b>43,15<sup>C*</sup></b>	<b>21,98<sup>d*</sup></b>	<b>63,94<sup>D</sup></b>

<sup>ABCD</sup>: diferencias de los % entre estaciones, letras iguales=significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

<sup>abcd</sup>: diferencias de las concentraciones entre estaciones, letras iguales=significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

\*: diferencia significativa entre grupos  $p<0,05$  (Mann-Whitney U-test).

**Tabla 82:** Cantidad de flavonoides en hojas jóvenes del Grupo II a lo largo del año, expresada como mg de flavonoide por g de peso seco de hoja y como porcentaje relativo al total de flavonoides.

<b>Grupo II: Hojas Jóvenes</b>								
	<b>Otoño</b>		<b>Invierno</b>		<b>Primavera</b>		<b>Verano</b>	
	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>
<b>Ap</b>	<b>0,18<sup>a</sup></b>	0,93 <sup>A</sup>	<b>0,12<sup>b</sup></b>	1,54 <sup>A</sup>	<b>0,15<sup>ab</sup></b>	1,24 <sup>A</sup>	<b>0,24<sup>c</sup></b>	0,79 <sup>A</sup>
<b>K-3</b>	<b>2,83<sup>a</sup></b>	14,69 <sup>A</sup>	<b>0,69<sup>b</sup></b>	8,60 <sup>B</sup>	<b>0,87<sup>b</sup></b>	7,10 <sup>B</sup>	<b>2,00<sup>a</sup></b>	6,67 <sup>B</sup>
<b>Ap-4'</b>	<b>1,73<sup>a</sup></b>	8,99 <sup>A</sup>	<b>1,80<sup>ab</sup></b>	22,31 <sup>B</sup>	<b>2,18<sup>b</sup></b>	17,85 <sup>C</sup>	<b>1,59<sup>a</sup></b>	5,29 <sup>D</sup>
<b>Ap-7</b>	<b>1,90<sup>a</sup></b>	9,86 <sup>A</sup>	<b>1,46<sup>b</sup></b>	18,15 <sup>B</sup>	<b>2,34<sup>c</sup></b>	19,23 <sup>B</sup>	<b>3,84<sup>d</sup></b>	12,80 <sup>A</sup>
<b>K-3,4</b>	<b>2,34<sup>a</sup></b>	12,16 <sup>A</sup>	<b>1,35<sup>b</sup></b>	16,70 <sup>B</sup>	<b>1,88<sup>a</sup></b>	15,43 <sup>B</sup>	<b>3,62<sup>d*</sup></b>	12,04 <sup>A</sup>
<b>K-3,7</b>	<b>10,27<sup>a*</sup></b>	53,37 <sup>A*</sup>	<b>2,64<sup>b</sup></b>	32,70 <sup>B*</sup>	<b>4,77<sup>c*</sup></b>	39,15 <sup>C*</sup>	<b>18,73<sup>d*</sup></b>	62,40 <sup>D</sup>

<sup>ABCD</sup>: diferencias de los % entre estaciones, letras iguales=significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

<sup>abcd</sup>: diferencias de las concentraciones entre estaciones, letras iguales=significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

\*: diferencia significativa entre grupos  $p<0,05$  (Mann-Whitney U-test).

**Tabla 83:** Cantidad de flavonoides en hojas viejas del grupo I a lo largo del año, expresada como mg de flavonoide por g de peso seco de hoja y como porcentaje relativo al total de flavonoides.

<b>Grupo I: Hojas Viejas</b>								
	<b>Otoño</b>		<b>Invierno</b>		<b>Primavera</b>		<b>Verano</b>	
	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>
<b>Ap</b>	<b>0,14<sup>a</sup></b>	1,03 <sup>A</sup>	<b>0,04<sup>b</sup></b>	0,62 <sup>A</sup>	<b>0,07<sup>ab</sup></b>	0,54 <sup>A*</sup>	<b>0,22<sup>c</sup></b>	0,91 <sup>A</sup>
<b>K-3</b>	<b>1,93<sup>a*</sup></b>	14,51 <sup>A*</sup>	<b>0,32<sup>b</sup></b>	4,38 <sup>B</sup>	<b>0,54<sup>c</sup></b>	4,40 <sup>B</sup>	<b>1,67<sup>a</sup></b>	6,95 <sup>C</sup>
<b>Ap-4'</b>	<b>1,13<sup>a</sup></b>	8,52 <sup>AB</sup>	<b>0,68<sup>b</sup></b>	9,46 <sup>A</sup>	<b>1,05<sup>ab</sup></b>	8,57 <sup>AB*</sup>	<b>1,50<sup>c</sup></b>	6,23 <sup>B</sup>
<b>Ap-7</b>	<b>1,43<sup>a</sup></b>	10,77 <sup>A</sup>	<b>0,88<sup>b</sup></b>	12,17 <sup>A</sup>	<b>1,69<sup>a</sup></b>	13,81 <sup>A*</sup>	<b>2,87<sup>c</sup></b>	11,96 <sup>A</sup>
<b>K-3,4</b>	<b>1,47<sup>a</sup></b>	11,07 <sup>A</sup>	<b>1,03<sup>b</sup></b>	14,25 <sup>B</sup>	<b>1,20<sup>ab</sup></b>	9,79 <sup>A*</sup>	<b>3,11<sup>c*</sup></b>	12,93 <sup>AB</sup>
<b>K-3,7</b>	<b>7,21<sup>a</sup></b>	54,11 <sup>A</sup>	<b>4,27<sup>b*</sup></b>	59,12 <sup>B*</sup>	<b>7,68<sup>a*</sup></b>	62,88 <sup>C*</sup>	<b>14,66<sup>c*</sup></b>	61,02 <sup>BC*</sup>

<sup>ABCD</sup>: diferencias de los % entre estaciones, letras iguales=significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

<sup>abcd</sup>: diferencias de las concentraciones entre estaciones, letras iguales=significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

\*: diferencia significativa entre grupos  $p<0,05$  (Mann-Whitney U-test).

**Tabla 84:** Cantidad de flavonoides en hojas viejas del grupo II a lo largo del año, expresada como mg de flavonoide por g de peso seco de hoja y como porcentaje relativo al porcentaje total de flavonoides.

<b>Grupo II: Hojas Viejas</b>								
	<b>Otoño</b>		<b>Invierno</b>		<b>Primavera</b>		<b>Verano</b>	
	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>	<b>mg/gHoja</b>	<b>%</b>
<b>Ap</b>	<b>0,12<sup>a</sup></b>	1,16 <sup>A</sup>	<b>0,04<sup>b</sup></b>	0,70 <sup>A</sup>	<b>0,08<sup>ab</sup></b>	1,03 <sup>A*</sup>	<b>0,21<sup>c</sup></b>	1,13 <sup>A</sup>
<b>K-3</b>	<b>0,95<sup>a*</sup></b>	9,26 <sup>AC*</sup>	<b>0,32<sup>b</sup></b>	5,15 <sup>BC</sup>	<b>0,42<sup>c</sup></b>	5,40 <sup>BC</sup>	<b>1,40<sup>d</sup></b>	7,33 <sup>C</sup>
<b>Ap-4'</b>	<b>1,15<sup>a</sup></b>	11,16 <sup>A</sup>	<b>0,75<sup>c</sup></b>	11,98 <sup>A</sup>	<b>1,22<sup>ab</sup></b>	15,71 <sup>B*</sup>	<b>1,32<sup>b</sup></b>	6,91 <sup>C</sup>
<b>Ap-7</b>	<b>1,29<sup>a</sup></b>	12,57 <sup>A</sup>	<b>0,88<sup>b</sup></b>	14,13 <sup>A</sup>	<b>1,51<sup>a</sup></b>	19,34 <sup>B*</sup>	<b>2,62<sup>c</sup></b>	13,76 <sup>A</sup>
<b>K-3,4</b>	<b>1,31<sup>a</sup></b>	12,71 <sup>A</sup>	<b>0,76<sup>b</sup></b>	12,26 <sup>A</sup>	<b>1,03<sup>a</sup></b>	13,18 <sup>A*</sup>	<b>2,54<sup>c*</sup></b>	13,35 <sup>A</sup>
<b>K-3,7</b>	<b>5,46<sup>a</sup></b>	53,13 <sup>A</sup>	<b>3,48<sup>b*</sup></b>	55,77 <sup>B*</sup>	<b>3,53<sup>b*</sup></b>	45,33 <sup>C*</sup>	<b>10,96<sup>c*</sup></b>	57,53 <sup>B*</sup>

<sup>ABCD</sup>: diferencias de los % entre estaciones, letras iguales=significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

<sup>abcd</sup>: diferencias de las concentraciones entre estaciones, letras iguales=significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

\*: diferencia significativa entre grupos  $p<0,05$  (Mann-Whitney U-test).

**Tabla 85:** Cantidad de flavonoides en tallos del Grupo I a lo largo del año, expresada como mg de flavonoide por g de peso seco de tallo y como porcentaje relativo al total de flavonoides.

<b>Grupo I: Tallos</b>								
	<b>Otoño</b>		<b>Invierno</b>		<b>Primavera</b>		<b>Verano</b>	
	<b>mg/gTallo</b>	<b>%</b>	<b>mg/gTallo</b>	<b>%</b>	<b>mg/gTallo</b>	<b>%</b>	<b>mg/gTallo</b>	<b>%</b>
<b>Ap</b>	<b>0,21<sup>a</sup></b>	1,42 <sup>A</sup>	<b>0,11<sup>a</sup></b>	1,53 <sup>A</sup>	<b>0,23<sup>a</sup></b>	2,12 <sup>B</sup>	<b>0,23<sup>a</sup></b>	1,22 <sup>A</sup>
<b>K-3</b>	<b>2,88<sup>a*</sup></b>	19,12 <sup>A*</sup>	<b>0,70<sup>b</sup></b>	9,99 <sup>D</sup>	<b>1,32<sup>c</sup></b>	12,30 <sup>B</sup>	<b>2,06<sup>d</sup></b>	11,11 <sup>B</sup>
<b>Ap-4'</b>	<b>1,35<sup>a</sup></b>	8,97 <sup>A</sup>	<b>1,20<sup>a</sup></b>	17,05 <sup>B*</sup>	<b>2,38<sup>b</sup></b>	22,08 <sup>C*</sup>	<b>1,82<sup>c</sup></b>	9,81 <sup>D</sup>
<b>Ap-7</b>	<b>1,45<sup>ab</sup></b>	9,61 <sup>A</sup>	<b>1,02<sup>a</sup></b>	14,56 <sup>B</sup>	<b>1,66<sup>bc</sup></b>	15,41 <sup>B</sup>	<b>1,85<sup>c</sup></b>	10,00 <sup>A</sup>
<b>K-3,4</b>	<b>2,13<sup>a</sup></b>	14,12 <sup>A*</sup>	<b>1,23<sup>b</sup></b>	17,43 <sup>A</sup>	<b>1,59<sup>ab</sup></b>	14,74 <sup>A</sup>	<b>3,61<sup>c*</sup></b>	19,50 <sup>B</sup>
<b>K-3,7</b>	<b>7,05<sup>a*</sup></b>	46,76 <sup>A*</sup>	<b>2,77<sup>b</sup></b>	39,44 <sup>B*</sup>	<b>3,59<sup>c*</sup></b>	33,35 <sup>C*</sup>	<b>8,96<sup>d*</sup></b>	48,37 <sup>A*</sup>

<sup>ABCD</sup>: diferencias de los % entre estaciones, letras iguales=significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

<sup>abcd</sup>: diferencias de las concentraciones entre estaciones, letras iguales=significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

\*: diferencia significativa entre grupos  $p<0,05$  (Mann-Whitney U-test).

**Tabla 86:** Cantidad de flavonoides en tallos del Grupo II a lo largo del año, expresada como mg de flavonoide por g de peso seco de tallo y como porcentaje relativo al total de flavonoides.

<b>Grupo II: Tallos</b>								
	<b>Otoño</b>		<b>Invierno</b>		<b>Primavera</b>		<b>Verano</b>	
	<b>mg/gTallo</b>	<b>%</b>	<b>mg/gTallo</b>	<b>%</b>	<b>mg/gTallo</b>	<b>%</b>	<b>mg/gTallo</b>	<b>%</b>
<b>Ap</b>	<b>0,21<sup>a</sup></b>	1,92 <sup>AB</sup>	<b>0,09<sup>b</sup></b>	1,52 <sup>A</sup>	<b>0,19<sup>a</sup></b>	2,36 <sup>B</sup>	<b>0,23<sup>a</sup></b>	1,56 <sup>A</sup>
<b>K-3</b>	<b>1,70<sup>a*</sup></b>	15,85 <sup>A*</sup>	<b>0,52<sup>b</sup></b>	8,85 <sup>B</sup>	<b>0,80<sup>c</sup></b>	9,74 <sup>B</sup>	<b>1,56<sup>a</sup></b>	10,68 <sup>B</sup>
<b>Ap-4'</b>	<b>1,42<sup>ab</sup></b>	13,22 <sup>A*</sup>	<b>1,24<sup>a</sup></b>	21,04 <sup>B*</sup>	<b>2,38<sup>c</sup></b>	28,87 <sup>C*</sup>	<b>1,65<sup>b</sup></b>	11,26 <sup>A</sup>
<b>Ap-7</b>	<b>1,21<sup>ab</sup></b>	11,24 <sup>A</sup>	<b>0,97<sup>b</sup></b>	16,56 <sup>B</sup>	<b>1,53<sup>ac</sup></b>	18,64 <sup>B</sup>	<b>1,75<sup>c</sup></b>	11,97 <sup>A</sup>
<b>K-3,4</b>	<b>1,93<sup>a</sup></b>	17,93 <sup>A*</sup>	<b>1,16<sup>b</sup></b>	19,82 <sup>A</sup>	<b>1,41<sup>b</sup></b>	17,18 <sup>A</sup>	<b>2,93<sup>c*</sup></b>	20,04 <sup>A</sup>
<b>K-3,7</b>	<b>4,28<sup>a*</sup></b>	39,83 <sup>A*</sup>	<b>1,89<sup>b</sup></b>	32,21 <sup>B*</sup>	<b>1,91<sup>b*</sup></b>	23,21 <sup>C*</sup>	<b>6,51<sup>c*</sup></b>	44,49 <sup>D*</sup>

<sup>ABCD</sup>: diferencias de los % entre estaciones, letras iguales=significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

<sup>abcd</sup>: diferencias de las concentraciones entre estaciones, letras iguales=significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

\*: diferencia significativa entre grupos  $p<0,05$  (Mann-Whitney U-test).

#### **IV.6.4.- Estudio individual de apigeninas y kampferoles frente a sus respectivos totales en hojas jóvenes, viejas y tallos.**

Si se representa la suma de apigeninas totales y kampferoles totales (Figura 18), se aprecia claramente que, independientemente del órgano estudiado, en verano se produce un aumento de apigeninas y kampferoles, siendo mucho mayor el de kampferoles. En tallos se puede distinguir un mayor aumento de la síntesis de apigeninas en primavera que en verano. Este comportamiento es semejante en los dos grupos de localidades, excepto en la hojas viejas donde se distingue una menor concentración de kampferoles en el Grupo II durante el verano.

En el apartado anterior (Tablas 79-86) se aprecia claramente que la secreción de todos los flavonoides presenta variación estacional y la velocidad de síntesis aumenta o disminuye según el compuesto. Este comportamiento se observa con mayor claridad si se cuantifica cada una de las apigeninas y kampferoles referidos a sus totales (Tabla 87-92).

Si se representa las relaciones de cada apigenina con respecto al total de apigeninas en cada una de las localidades de muestreo, se aprecia que durante todo el año la apigenina dominante en las hojas es Ap-7 mientras que en los tallos es la Ap-4', excepto en verano donde Ap-7 vuelve a ser la mayoritaria.

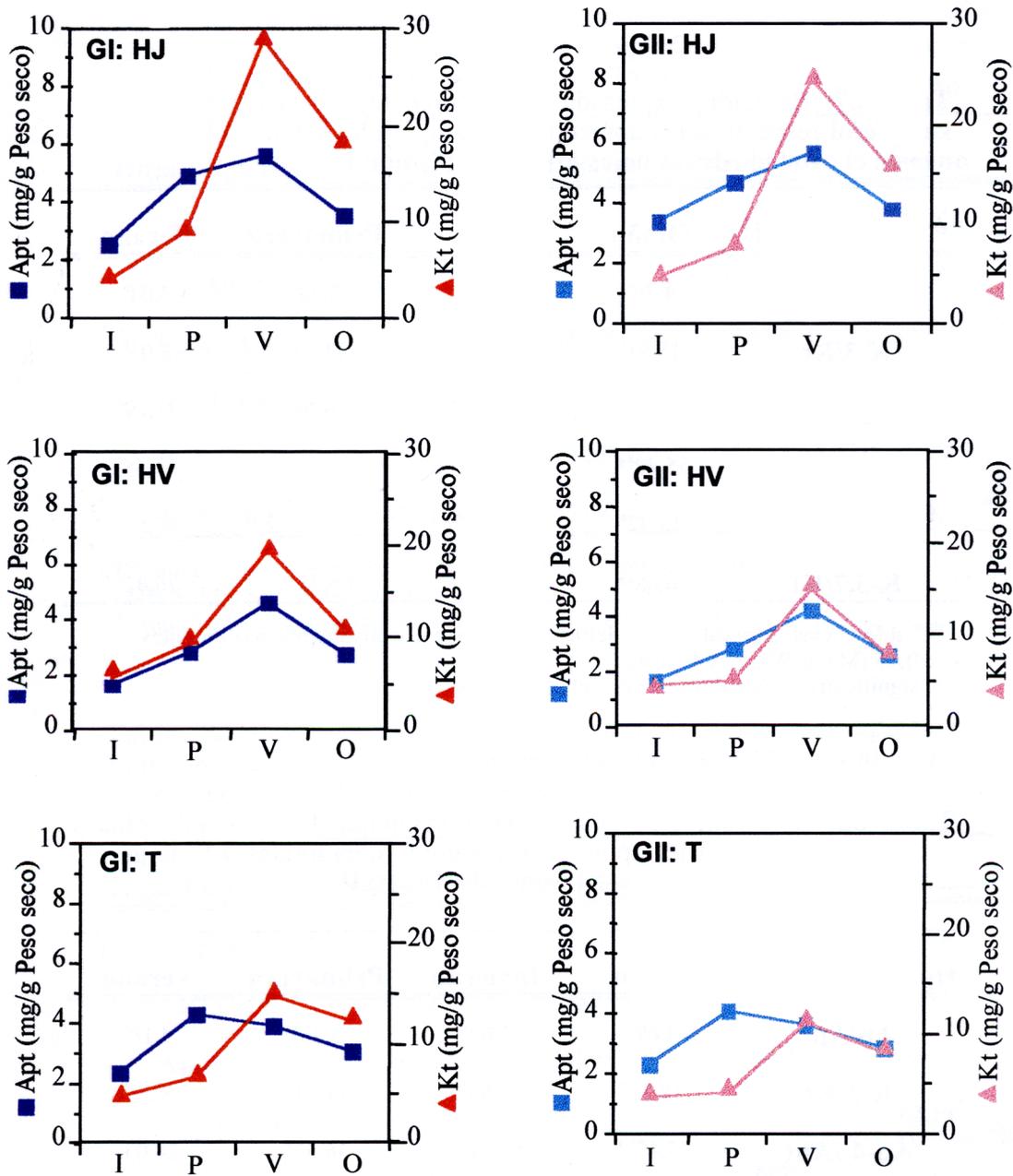
La apigenina sin metilar no presenta ninguna variación significativa entre estaciones y en consecuencia, tampoco se observan diferencias entre grupos en ninguna de las muestras analizadas. Por el contrario, las apigeninas metiladas presentan una marcada variación estacional, así, el mayor aporte de Ap-4' es durante el invierno en hojas jóvenes y viejas, mientras que en tallos la inducción de la síntesis se encuentra desplazada hacia la primavera. Además, se aprecian diferencias significativas entre los grupos, observándose siempre mayor porcentaje (más del 3%) en las muestras del Grupo II, a excepción de la estación estival.

Durante el verano, y en todas las muestras, la síntesis de las apigeninas está desplazada hacia Ap-7. El Grupo I posee mayor cantidad de esta apigenina, apreciándose diferencias significativas entre grupos en otoño e invierno en las hojas jóvenes, en primavera en las hojas viejas y en otoño en los tallos.

En el caso de los kampferoles, el análisis de la secreción de K-3 en términos de kampferoles totales, pone de manifiesto que su síntesis es estimulada en los tres órganos en otoño, y además, en tallos durante la primavera. Este flavonol en las hojas, tanto nuevas como viejas, es más potenciado en las poblaciones del Grupo II, encontrándose diferencias significativas durante el invierno en hojas jóvenes y en otoño en hojas viejas. Por el contrario, en tallos es más inducido en las poblaciones del grupo I, aunque no se aprecian diferencias significativas entre estos grupos en ninguna de las estaciones.

El K-3,4', es más inducido en hojas jóvenes, durante invierno y primavera, y en tallos durante el invierno y el verano. En hojas viejas no se observan diferencias estacionales para las poblaciones del Grupo II, pero en el grupo I se potencia su síntesis en Invierno y verano. Este flavonol contribuye con un porcentaje mayor en las poblaciones del Grupo II, donde se observan diferencias significativas en la primavera para las hojas jóvenes, en primavera y otoño en hojas viejas y en invierno, primavera y otoño en los tallos.

En cuanto al K-3,7 existe un mayor aporte en hojas jóvenes y tallos durante el verano. En hojas viejas el comportamiento es diferente en cada grupo, pues mientras en el Grupo I el mayor porcentaje se obtiene en primavera, en el Grupo II se encuentra en invierno y verano. El aporte de este flavonol es mayor en las localidades del Grupo I, detectándose diferencias significativas, en hojas jóvenes y tallos durante todo el año a excepción del verano; y en hojas viejas únicamente en primavera.



**Figura 18:** Distribución de la cantidad de Apigeninas totales (■Grupo I; □Grupo II) y Kamferoles totales (▲Grupo I; ▲Grupo II) a lo largo del año (invierno: I, primavera: P, verano: V, y otoño: O) en hojas jóvenes (HJ), hojas viejas (HV) y tallos (T) en cada uno de los grupos (GI: Grupo I y GII: Grupo II).

**Tabla 87:** Relación, expresada como porcentaje, de cada apigenina y kampferol respecto a las apigeninas y kampferoles totales a lo largo del año en el exudado de las hojas jóvenes del Grupo I.

<b>Hoja Joven (GI)</b>	<b>Otoño</b>	<b>Invierno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verano</b>
<b>Ap/Apt</b>	4,76 <sup>a</sup>	3,64 <sup>a</sup>	3,38 <sup>a</sup>	4,04 <sup>a</sup>
<b>K-3/Kt</b>	15,91 <sup>a</sup>	12,62 <sup>a*</sup>	11,11 <sup>a</sup>	8,03 <sup>b</sup>
<b>Ap-4'/Apt</b>	39,82 <sup>a*</sup>	50,27 <sup>b*</sup>	44,64 <sup>c</sup>	31,29 <sup>d</sup>
<b>Ap-7/Apt</b>	55,42 <sup>a*</sup>	46,09 <sup>b*</sup>	51,98 <sup>a</sup>	64,66 <sup>c</sup>
<b>K-3,4'/Kt</b>	13,42 <sup>a</sup>	25,88 <sup>b</sup>	22,06 <sup>c*</sup>	15,55 <sup>d</sup>
<b>K-3,7/Kt</b>	70,68 <sup>a*</sup>	61,50 <sup>b*</sup>	66,83 <sup>c*</sup>	76,42 <sup>d</sup>

<sup>abcd</sup>: diferencias entre estaciones, letras iguales= significativamente no diferentes  
 $p > 0,05$  (Mann-Whitney U-test).  
 \*: significativamente diferente con el otro grupo.

**Tabla 88:** Relación, expresada como porcentaje, de cada apigenina y kampferol respecto a las apigeninas y kampferoles totales a lo largo del año en el exudado de las hojas jóvenes del Grupo II.

<b>Hoja Joven (GII)</b>	<b>Otoño</b>	<b>Invierno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verano</b>
<b>Ap/Apt</b>	4,69 <sup>a</sup>	3,67 <sup>a</sup>	3,23 <sup>a</sup>	4,18 <sup>a</sup>
<b>K-3/Kt</b>	18,32 <sup>a</sup>	14,83 <sup>a*</sup>	11,51 <sup>a</sup>	8,22 <sup>b</sup>
<b>Ap-4'/Apt</b>	45,47 <sup>a*</sup>	53,11 <sup>b*</sup>	46,57 <sup>a</sup>	28,03 <sup>c</sup>
<b>Ap-7/Apt</b>	49,83 <sup>a*</sup>	43,22 <sup>b*</sup>	50,19 <sup>a</sup>	67,8 <sup>c</sup>
<b>K-3,4'/Kt</b>	15,15 <sup>a</sup>	28,79 <sup>b</sup>	25,01 <sup>c*</sup>	14,85 <sup>a</sup>
<b>K-3,7/Kt</b>	66,53 <sup>a*</sup>	56,38 <sup>b*</sup>	63,48 <sup>c*</sup>	76,93 <sup>d</sup>

<sup>abcd</sup>: diferencias entre estaciones, letras iguales= significativamente no diferentes  
 $p > 0,05$  (Mann-Whitney U-test).  
 \*: significativamente diferente a su homólogo en el otro grupo.

**Tabla 89:** Relación, expresada como porcentaje, de cada apigenina y kampferol respecto a las apigeninas y kampferoles totales a lo largo del año en el exudado de las hojas viejas del Grupo I.

<b>Hoja Vieja (GI)</b>	<b>Otoño</b>	<b>Invierno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verano</b>
<b>Ap/Apt</b>	5,08 <sup>a</sup>	2,79 <sup>a</sup>	2,38 <sup>a</sup>	4,76 <sup>a</sup>
<b>K-3/Kt</b>	18,20 <sup>a*</sup>	5,63 <sup>b</sup>	5,71 <sup>b</sup>	8,59 <sup>b</sup>
<b>Ap-4'/Apt</b>	41,92 <sup>a*</sup>	42,50 <sup>a</sup>	37,37 <sup>b*</sup>	32,61 <sup>c</sup>
<b>Ap-7/Apt</b>	53,0 <sup>a</sup>	54,71 <sup>a</sup>	60,25 <sup>b*</sup>	62,63 <sup>b</sup>
<b>K-3,4'/Kt</b>	13,89 <sup>a*</sup>	18,33 <sup>b</sup>	12,71 <sup>a*</sup>	15,98 <sup>b</sup>
<b>K-3,7/Kt</b>	67,91 <sup>a</sup>	76,04 <sup>b</sup>	81,58 <sup>c*</sup>	75,43 <sup>b</sup>

<sup>abcd</sup>: diferencias entre estaciones, letras iguales= significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

\*: significativamente diferente a su homólogo en el otro grupo.

**Tabla 90:** Relación, expresada como porcentaje, de cada apigenina y kampferol respecto a las apigeninas y kampferoles totales a lo largo del año en el exudado de las hojas viejas del Grupo II.

<b>Hoja Viejas (GII)</b>	<b>Otoño</b>	<b>Invierno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verano</b>
<b>Ap/Apt</b>	4,66 <sup>a</sup>	2,61 <sup>a</sup>	2,86 <sup>a</sup>	5,17 <sup>a</sup>
<b>K-3/Kt</b>	12,33 <sup>a*</sup>	7,05 <sup>b</sup>	8,45 <sup>bc</sup>	9,37 <sup>c</sup>
<b>Ap-4'/Apt</b>	44,84 <sup>a*</sup>	44,68 <sup>a</sup>	43,55 <sup>b*</sup>	31,71 <sup>c</sup>
<b>Ap-7/Apt</b>	50,5 <sup>a</sup>	52,7 <sup>ac</sup>	53,59 <sup>bc*</sup>	63,13 <sup>d</sup>
<b>K-3,4'/Kt</b>	16,93 <sup>a*</sup>	16,75 <sup>a</sup>	20,62 <sup>a*</sup>	17,07 <sup>a</sup>
<b>K-3,7/Kt</b>	70,74 <sup>a</sup>	76,20 <sup>b</sup>	70,92 <sup>a*</sup>	73,56 <sup>b</sup>

<sup>abcd</sup>: diferencias entre estaciones, letras iguales= significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

\*: significativamente diferente a su homólogo en el otro grupo.

**Tabla 91:** Relación, expresada como porcentaje, de cada apigenina y kampferol respecto a las apigeninas y kampferoles totales a lo largo del año en el exudado de los tallos del Grupo I.

<b>Tallo (GI)</b>	<b>Otoño</b>	<b>Invierno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verano</b>
<b>Ap/Apt</b>	7,10 <sup>a</sup>	4,63 <sup>b</sup>	5,34 <sup>ab</sup>	5,81 <sup>a</sup>
<b>K-3/Kt</b>	23,9 <sup>a</sup>	14,95 <sup>b</sup>	20,37 <sup>c</sup>	14,06 <sup>b</sup>
<b>Ap-4'/Apt</b>	44,86 <sup>a*</sup>	51,45 <sup>b</sup>	55,74 <sup>c</sup>	46,65 <sup>a</sup>
<b>Ap-7/Apt</b>	48,03 <sup>a*</sup>	43,92 <sup>b</sup>	38,91 <sup>c</sup>	47,54 <sup>a</sup>
<b>K-3,4'/Kt</b>	17,65 <sup>a*</sup>	26,07 <sup>bc*</sup>	24,4 <sup>b*</sup>	24,69 <sup>c*</sup>
<b>K-3,7/Kt</b>	58,46 <sup>ab*</sup>	58,98 <sup>b*</sup>	55,22 <sup>c*</sup>	61,25 <sup>a</sup>

<sup>abcd</sup>: diferencias entre estaciones, letras iguales= significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

\*: significativamente diferente a su homólogo en el otro grupo.

**Tabla 92:** Relación, expresada como porcentaje, de cada apigenina y kampferol respecto a las apigeninas y kampferoles totales a lo largo del año en el exudado de los tallos del Grupo II.

<b>Tallo (GII)</b>	<b>Otoño</b>	<b>Invierno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verano</b>
<b>Ap/Apt</b>	7,26 <sup>a</sup>	3,88 <sup>b</sup>	4,73 <sup>ab</sup>	6,28 <sup>ab</sup>
<b>K-3/Kt</b>	21,53 <sup>a</sup>	14,53 <sup>b</sup>	19,44 <sup>a</sup>	14,20 <sup>b</sup>
<b>Ap-4'/Apt</b>	50,12 <sup>a*</sup>	53,78 <sup>b</sup>	57,9 <sup>c</sup>	45,44 <sup>a</sup>
<b>Ap-7/Apt</b>	42,62 <sup>a*</sup>	42,34 <sup>a</sup>	37,38 <sup>b</sup>	48,28 <sup>c</sup>
<b>K-3,4'/Kt</b>	24,36 <sup>a*</sup>	32,55 <sup>b*</sup>	34,26 <sup>b*</sup>	26,65 <sup>a*</sup>
<b>K-3,7/Kt</b>	54,11 <sup>a*</sup>	52,91 <sup>a*</sup>	46,30 <sup>b*</sup>	59,15 <sup>c</sup>

<sup>abcd</sup>: diferencias entre estaciones, letras iguales= significativamente no diferentes  $p>0,05$  (Mann-Whitney U-test).

\*: significativamente diferente a su homólogo en el otro grupo.

## **IV.7.- EFECTO ANTIHERBÍVORO DEL EXUDADO DE *C. ladanifer*.**

### **IV.7.1. Modulación de la actividad $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa por flavonoides contenidos en el exudado de *C. ladanifer*.**

#### ***IV.7.1.1.- Efecto del exudado sobre la actividad $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.***

La actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa se midió utilizando el ensayo acoplado que se indica en Materiales y Métodos (apartado III.7.1.2). En la Figura 19 se muestra como se realizaron las medidas de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa. Primeramente, antes de disparar la reacción con ATP se registró una línea base (LB) para comprobar que la absorción de la mezcla a 340nm está alrededor de 1,5 y que no se registra variación de absorción en función del tiempo. Cuando se añade ATP se observa una caída de la señal que indica que el sistema de enzimas acopladas funciona perfectamente. La señal se registró durante unos minutos, hasta obtener una pendiente a partir de la cual se pudo medir la actividad de las vesículas de retículo sarcoplásmico selladas.

La secuencia de pendientes, Figura 19 (Panel A), muestra el efecto del exudado sobre la velocidad de actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de vesículas RS perfectamente selladas. De manera genérica, se registró el efecto de añadir de forma secuencial 30 $\mu\text{g/ml}$  de exudado hasta llegar a una concentración final de 180 $\mu\text{g/ml}$ . En esta figura se muestra el efecto de las concentraciones añadidas a la cubeta de 30 y 120 $\mu\text{g/ml}$  de exudado representadas como  $F_1$  y  $F_2$  respectivamente, observándose que la pendiente se incrementa al aumentar la concentración del exudado, lo que indica que se estimula la actividad ATPasa de las membranas de RS. Puesto que en vesículas de RS selladas, la actividad ATPasa se encuentra fuertemente inhibida por el gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que se establece a través de la membrana de RS (véase la introducción), estos resultados

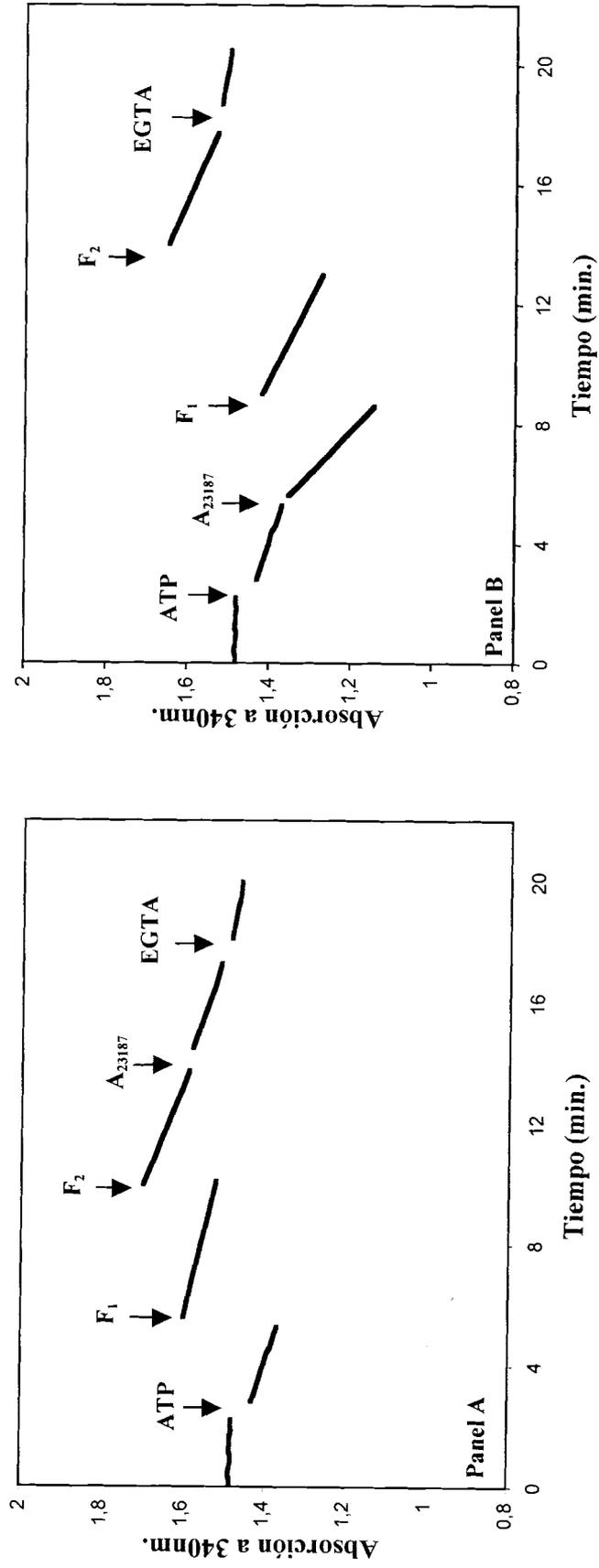
sugieren que se produce un notable aumento de la permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  de las membranas de RS por acción del exudado. Este punto se ha cuestionado experimentalmente más adelante.

La secuencia de pendientes, Figura 19 (Panel B), muestra el efecto del exudado sobre la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de vesículas RS permeabilizadas. En este caso, la calcimicina se añadió antes del exudado, observándose que la pendiente disminuye al aumentar la concentración del exudado. Esta disminución de la pendiente implica inhibición de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa. Por último, se añade EGTA con el fin de medir la actividad independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , para la que se obtuvo un valor promedio de  $0,3 \pm 0,1$  UI/mg proteína de RS.

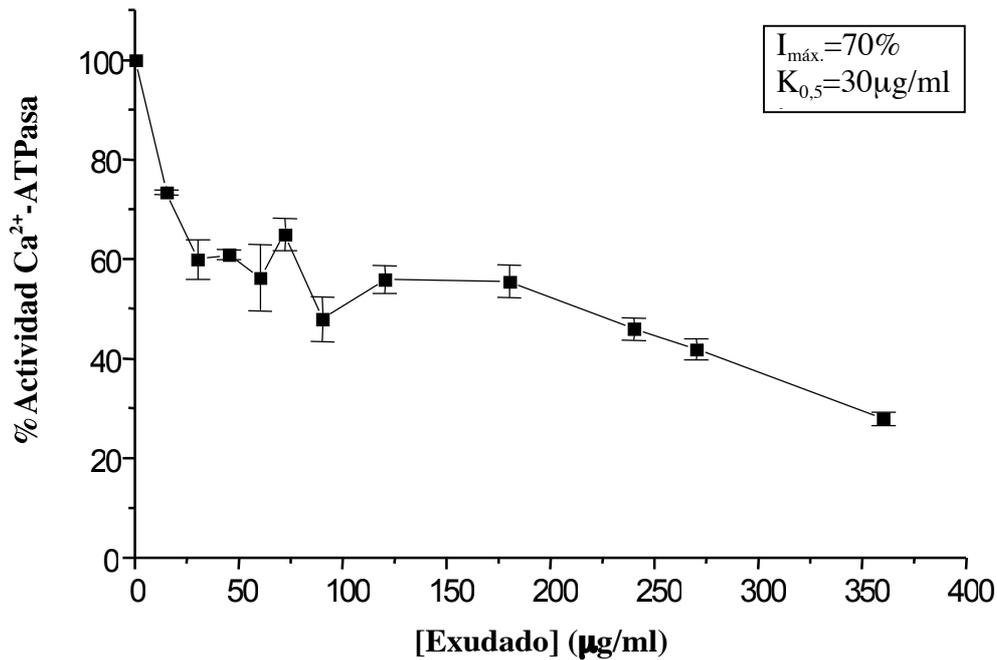
Estos resultados se pasaron a UI/mg proteína de RS, se restó la actividad independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y se calcularon como porcentaje relativo respecto al control (actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa sin exudado), representándose frente a la concentración de exudado. Así, la Figura 20 muestra la dependencia de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de RS con la concentración de exudado en presencia de calcimicina. En esta figura puede observarse que el exudado inhibe la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, de forma monótonamente dependiente con la concentración de exudado añadido al medio.

De estos resultados cabe destacar la baja concentración a la que este exudado es activo, presentado una  $K_{0,5}$  muy baja. La cinética de inhibición presenta una  $K_{0,5}$  para el exudado de  $30 \mu\text{g/ml}$ . Experimentalmente se comprobó que con una sola adición de  $360 \mu\text{g/ml}$  de exudado se alcanza un 70% de inhibición de la actividad de la proteína, idéntica a la determinada a esta concentración en la titulación con exudado mediante adiciones sucesivas de menor concentración.

La Figura 21 muestra la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de RS sellado en función de la concentración de exudado. En ella puede observarse que en vesículas perfectamente selladas, es decir, que generan y mantiene un gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , la actividad se incrementa de forma monótona al aumentar la concentración de exudado. De ello podría inferirse que existe pérdida significativa de gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  un punto que se ha cuestionado en los experimentos presentados en el apartado IV.7.1.4.

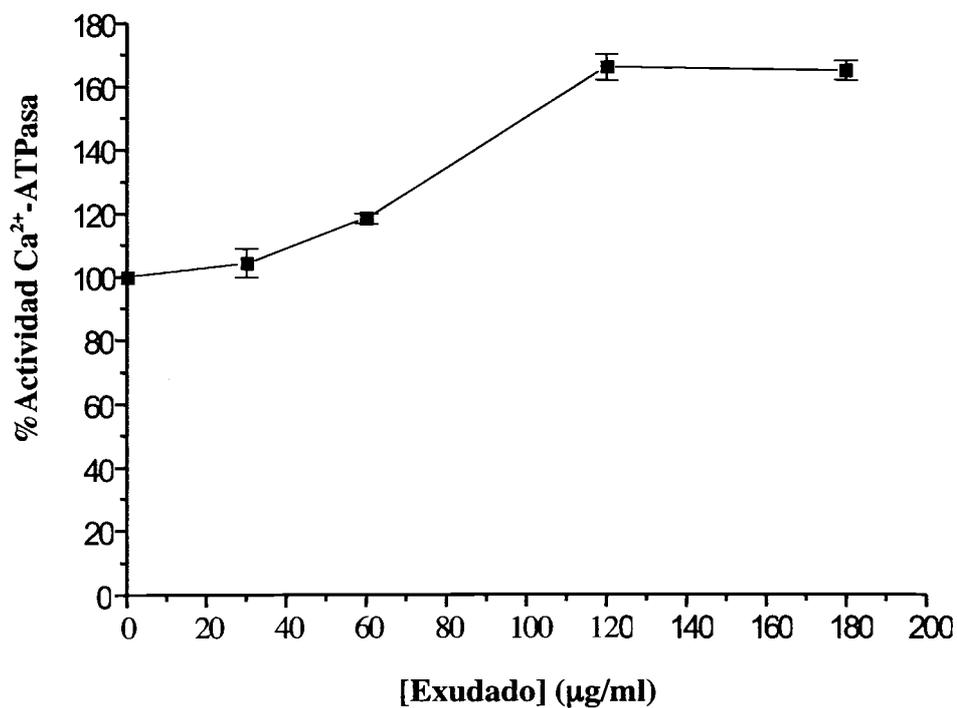


**Figura 19:** Efecto del exudado de las hojas de *Cistus ladanifer* sobre la velocidad de actividad  $Ca^{2+}$ -ATPasa de vesículas RS en ausencia (Panel A) y en presencia (Panel B) de calcimicina ( $A_{23187}$ ).  $F_1$  y  $F_2$  representan las concentraciones añadidas a la cubeta de 30 y 120 $\mu$ g/ml de exudado, respectivamente.



**Figura 20:** Efecto de la concentración de Exudado de *Cistus ladanifer* sobre la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de vesículas RS en presencia de calcimicina.

La actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se determinó en un medio que contiene tampón Tes/Tris 0,1M, pH7 a 25°C, KCl 0,1M, MgCl<sub>2</sub> 3mM, 50µg de PK, 50µg de LDH, NADH 0,25mM y PEP 0,42mM y con una concentración de proteína de 3µg/ml.



**Figura 21:** Efecto de la concentración de Exudado de *Cistus ladanifer* sobre la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de vesículas RS en ausencia de calcimicina.

La actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se determinó en un medio que contiene tampón Tes/Tris 0,1M, pH7 a 25°C, KCl 0,1M, MgCl<sub>2</sub> 3mM, 50µg de PK, 50µg de LDH, NADH 0,25mM y PEP 0,42mM y con una concentración de proteína de 3µg/ml.

#### ***IV.7.1.2.- Efecto de mezcla de flavonoides sobre la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa.***

Con el fin de buscar los compuestos del exudado responsables de la inhibición de la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se estudió esta actividad con un grupo de compuestos mayoritarios en el exudado, y que son los siguientes flavonoides: apigenina, 3-*O*-metilkampferol, 4'-*O*-metilapigenina, 7-*O*-metilapigenina, 3,4'-di-*O*-metilkampferol, 3,7-di-*O*-metilkampferol. Primeramente, se probó con una mezcla de estos flavonoides que asemeja a la proporción en la que estos compuestos están en el exudado de las hojas jóvenes durante la primavera, cuya proporción es: 0,57% Ap / 4,27% K-3 / 14,47% Ap-4' / 19,1% Ap-7 / 13,4% K-3,4' / 48,15% K-3,7.

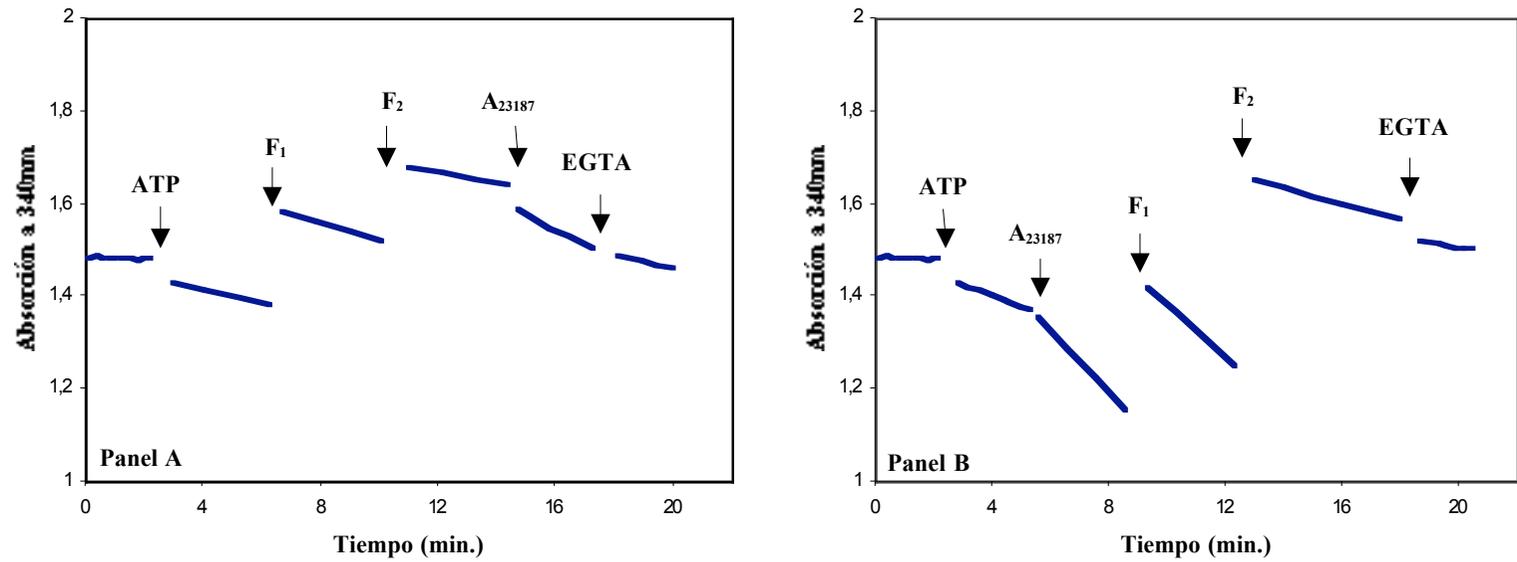
En el Figura 22 se muestra las medidas realizadas para determinar la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa en presencia de una mezcla de flavonoides.

La secuencia de pendientes, Figura 22 (Panel A), muestra el efecto de la mezcla sobre la velocidad de actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de vesículas RS perfectamente selladas. Se registró el efecto de añadir de forma secuencial 6,06µg/ml de mezcla de flavonoides hasta llegar a una concentración final de 33,33µg/ml.

En esta Figura se muestran el efecto de las concentraciones añadidas a la cubeta de 12 y 27µg/ml de la mezcla de flavonoides representadas como F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>, respectivamente, observándose que la pendiente se mantenía constante. Por consiguiente, la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa no se ve alterada por estas concentraciones de flavonoides. A continuación se añade calcimicina, un ionóforo que permite la salida de Ca<sup>2+</sup> eliminando el gradiente del ion a través de las membranas de RS y se mide la actividad de RS permeabilizado.

La secuencia de pendientes, Figura 22 (Panel B), muestra el efecto de la mezcla sobre la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de vesículas RS permeabilizadas. En este caso, la calcimicina se añadió antes de la mezcla de flavonoides, observándose que la pendiente disminuye al aumentar la concentración de flavonoides. Esta disminución de la pendiente implica inhibición de la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa.

Por último, se añade EGTA con el fin de medir la actividad independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , para la que se obtuvo un valor promedio.

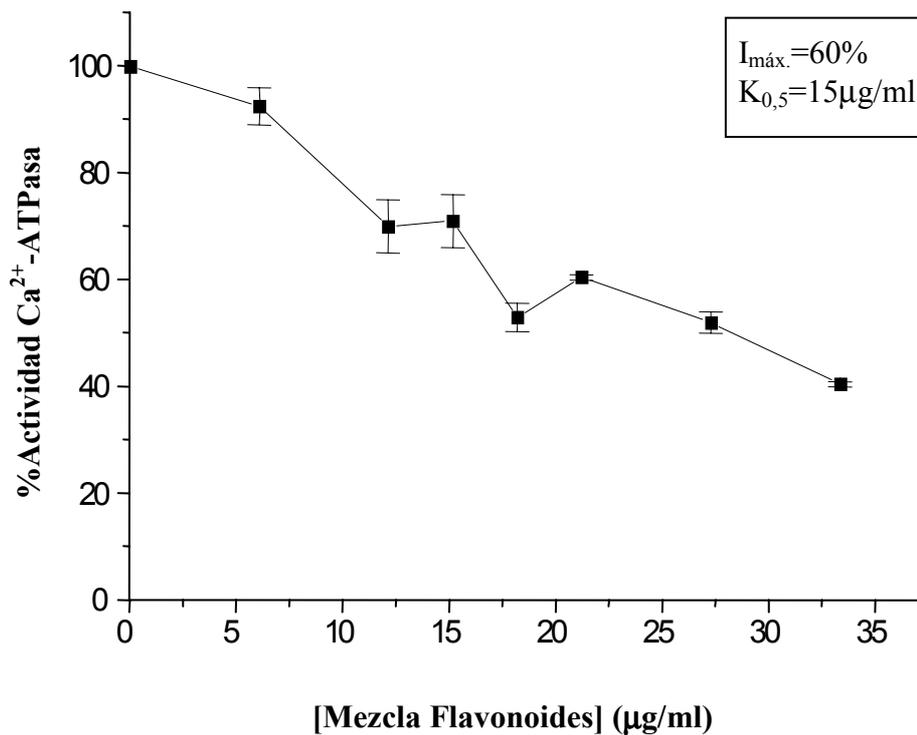


**Figura 22:** Efecto de la mezcla de flavonoides sobre la velocidad de actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de vesículas RS en ausencia (Panel A) y en presencia (Panel B) de calcimicina (A<sub>23187</sub>). F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> representan las concentraciones añadidas a la cubeta de 6,06 y 33,33µg/ml de mezcla de flavonoides, respectivamente.

Estos resultados se pasaron a UI/mg proteína de RS, se restó la actividad independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y se calcularon como porcentaje relativo respecto al control (actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en ausencia de la mezcla de flavonoides), representándose frente a la concentración de flavonoides. Así, la Figura 23 muestra la dependencia de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de RS con la concentración de flavonoides en presencia de calcimicina. En esta figura puede observarse que la mezcla inhibe la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, de forma monótonamente dependiente con la concentración de flavonoides añadida al medio, hasta una concentración de  $33\mu\text{g/ml}$  a partir de la cual no se pudo ensayar experimentalmente debido a la turbidez que estos flavonoides producen al precipitar.

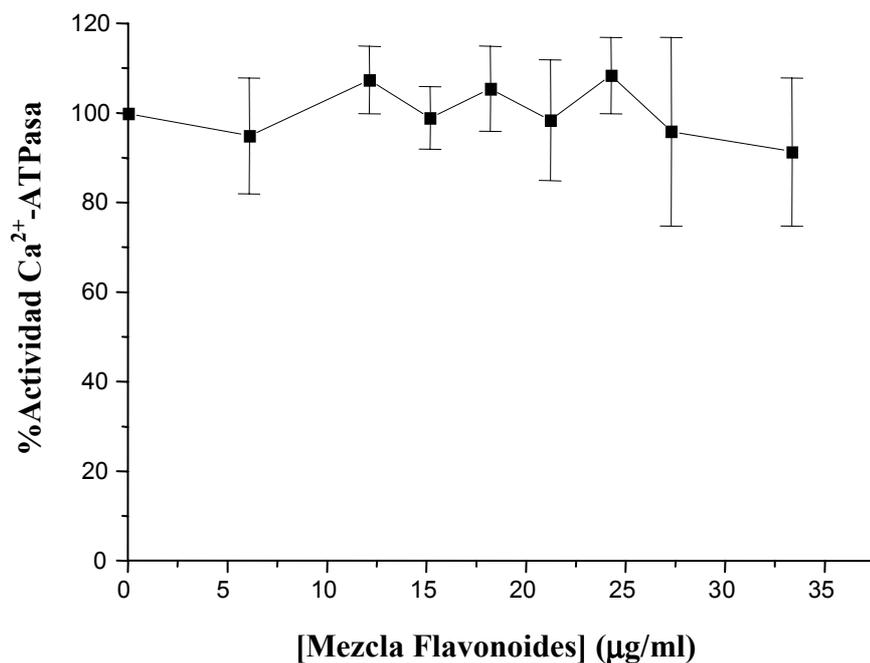
De estos resultados cabe destacar la baja concentración a la que esta mezcla es activa, presentado una  $K_{0,5}$  muy baja. La cinética de inhibición presenta una  $K_{0,5}$  para la mezcla de flavonoides de  $15\mu\text{g/ml}$ . Experimentalmente se comprobó que con una sola adición de  $33,33\mu\text{g/ml}$  de flavonoides se alcanza un 60% de inhibición de la actividad de la proteína, un valor idéntico al alcanzado tras varias adiciones de menor cuantía.

La Figura 24 muestra la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de RS sellado en función de la concentración de flavonoides. En ella puede observarse que en vesículas perfectamente selladas, es decir, en presencia de gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , la actividad no se ve significativamente alterada. De ello podría inferirse que no hay pérdida significativa de gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  un punto que se ha cuestionado en los experimentos presentados en el apartado IV.7.1.4.



**Figura 23:** Efecto de la concentración de mezcla de Flavonoides de *Cistus ladanifer* sobre la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de vesículas RS en presencia de calcimicina.

La actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se determinó en un medio que contiene tampón Tes/Tris 0,1M, pH7 a 25°C, KCl 0,1M, MgCl<sub>2</sub> 3mM, 50µg de PK, 50µg de LDH, NADH 0,25mM y PEP 0,42mM y con una concentración de proteína de 3µg/ml.



**Figura 24:** Efecto de la concentración de Mezcla de Flavonoides de *Cistus ladanifer* sobre la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de vesículas RS en ausencia de calcimicina.

La actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se determinó en un medio que contiene tampón Tes/Tris 0,1M, pH7 a 25°C, KCl 0,1M, MgCl<sub>2</sub> 3mM, 50µg de PK, 50µg de LDH, NADH 0,25mM y PEP 0,42mM y con una concentración de proteína de 3µg/ml.

#### ***IV.7.1.3.- Efecto de la concentración de cada flavonoides sobre la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa.***

##### *IV.7.1.3.1.- Modulación por apigenina y derivados metilados.*

La actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se midió utilizando el ensayo acoplado que se indica en Materiales y Métodos (apartado III.7.1.2). Los resultados obtenidos se pasaron a UI/mg proteína de RS, se restó la actividad independiente de Ca<sup>2+</sup> y se calcularon como porcentaje relativo respecto al control (actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa sin flavona), representándose frente a la concentración de cada apigenina. La Figura 25 (Panel A) muestra la dependencia con la concentración de flavona de la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de RS en presencia de calcimicina.

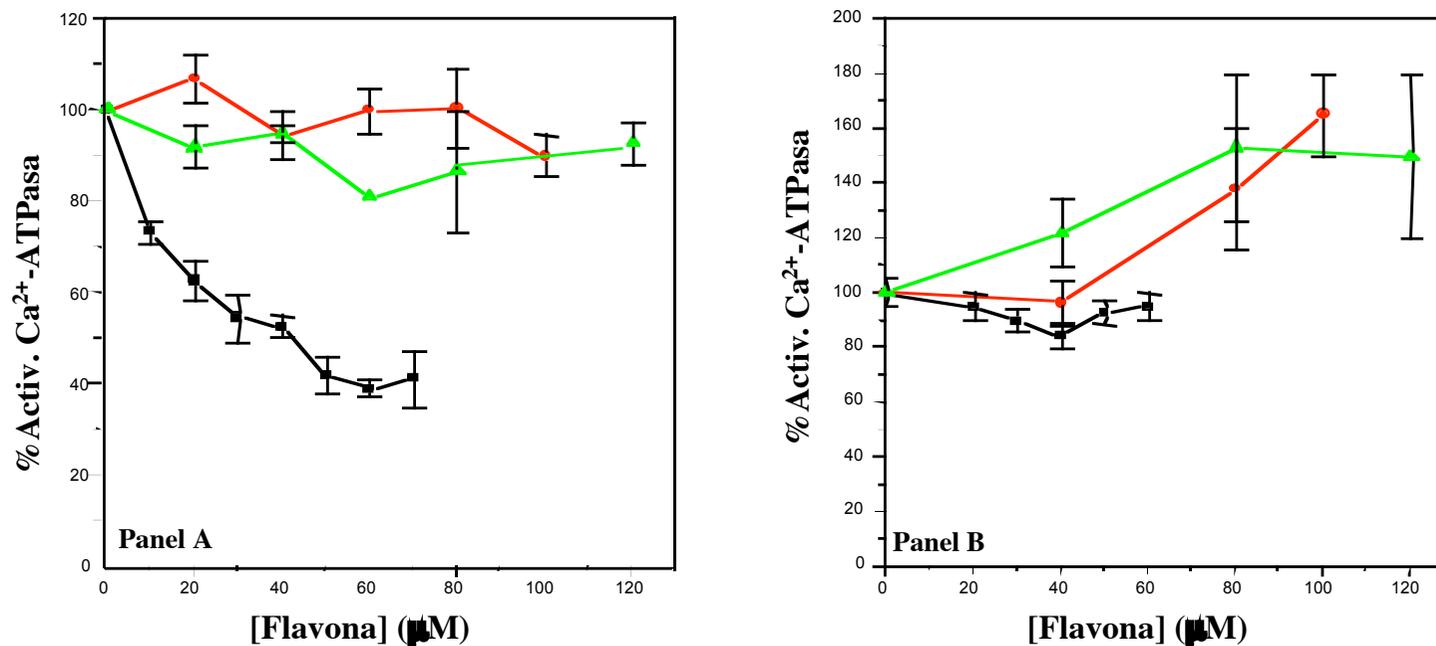
En esta figura puede observarse que la apigenina inhibe la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, de forma monótonamente dependiente con la concentración de apigenina añadida al medio, hasta una concentración de 50µM a partir de la cual no se observa incremento significativo en la inhibición. Los resultados se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$\% \text{Activ. Ca}^{2+}\text{-ATPasa} = 100 - [ (I_{\text{máx}} \cdot [\text{Ap}]) / K_{0,5} + [\text{Ap}] ] ;$$

de lo que se puede deducir que la interacción de apigenina con la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se realiza por un proceso simple por unión a sitios inhibidores con un valor de constante de disociación definida (K<sub>0,5</sub>). De estos resultados cabe destacar la baja concentración a la que este compuesto es activo, presentado una K<sub>0,5</sub> muy baja (del orden de µM). La cinética de inhibición presenta una K<sub>0,5</sub> para apigenina de 20µM. Experimentalmente se comprobó que con una sola adición de 70µM de apigenina se alcanza un 60-70% de inhibición de la actividad de la proteína, un valor de inhibición idéntico al alcanzado tras varias adiciones de menor cuantía, que sumadas dan 70µM de apigenina. Estos parámetros cinéticos se han obtenido mediante ajuste por regresión no lineal de los datos para este proceso de inhibición.

En los resultados obtenidos de las medidas realizadas para determinar la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en presencia de Ap-4' y Ap-7, se observó un comportamiento diferente al que presenta apigenina sin metilar. En esta misma figura, al contrario de apigenina puede observarse que la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa no es significativamente alterada al añadir Ap-4' ó Ap-7 al medio de ensayo.

La Figura 25 (Panel B) muestra la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de RS sellado en función de la concentración de flavona. En ella puede observarse que en vesículas perfectamente selladas, es decir, en presencia de gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , la actividad en presencia de apigenina, no se ve significativamente alterada. De ello podría inferirse que no hay pérdida significativa de gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  un punto que se ha cuestionado en los experimentos presentados en el apartado IV.1.7.4. En presencia de Ap-4' y Ap-7 se observa que en ausencia de calcimicina la actividad se incrementa significativamente a partir de una concentración superior a  $80\mu\text{M}$ . De ello podría inferirse que estos flavonoides provocan pérdida de gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 25:** Efecto de la concentración de flavonas sobre la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de vesículas RS en presencia (**Panel A**) y ausencia (**Panel B**) de calcimicina. Siendo -■-: Apigenina, -●-: 4'(O)-metil-Apigenina y -▲-: 7(O)-metil-Apigenina.

La actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se determinó en un medio que contiene tampón Tes/Tris 0,1M, pH7 a 25°C, KCl 0,1M, MgCl<sub>2</sub> 3mM, 50μg de PK, 50μg de LDH, NADH 0,25mM y PEP 0,42mM y con una concentración de proteína de 3μg/ml.

#### IV.7.1.3.2.- Modulación por 3-O-metilkampferol, 3,4'-di-O-metilkampferol y 3,7-di-O-metilkampferol.

Al igual que para los flavonoides anteriores, la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa en presencia de 3-O-metilkampferol, 3,4'-di-O-metilkampferol ó 3,7-di-O-metilkampferol se midió utilizando el ensayo acoplado que se indica en Materiales y Métodos, y se siguió el mismo procedimiento en el análisis de resultados. En la Figura 26 (Panel A y Panel B) se representa la dependencia con la concentración de flavonol de la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de RS permeabilizadas y selladas, respectivamente.

Como puede observarse en la Figura 26 (Panel A), 3-O-metilkampferol presenta el mismo comportamiento que apigenina. En presencia de calcimicina, K-3 inhibe la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de forma monótonamente dependiente con la concentración añadida al medio, hasta una concentración de 100µM a partir de la cual no se observa incremento significativo en la inhibición. Los resultados también se ajustaron a la misma ecuación descrita para la apigenina:

$$\% \text{Activ. Ca}^{2+}\text{-ATPasa} = 100 - [ (I_{\text{máx}} \cdot [\text{K-3}]) / K_{0,5} + [\text{K-3}]]$$

de lo que se puede deducir que la interacción de K-3 con la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se realiza por un proceso simple por unión a sitios inhibidores, presentando una K<sub>0,5</sub> mayor que para apigenina. La cinética de inhibición presenta una K<sub>0,5</sub> para K-3 de 60µM. La única diferencia que presenta K-3 frente a la apigenina, es que este flavonoide no presenta una inhibición tan fuerte como la apigenina, llegando a ser del 50% y necesitando para ello una concentración mayor, que llega a ser de 100µM.

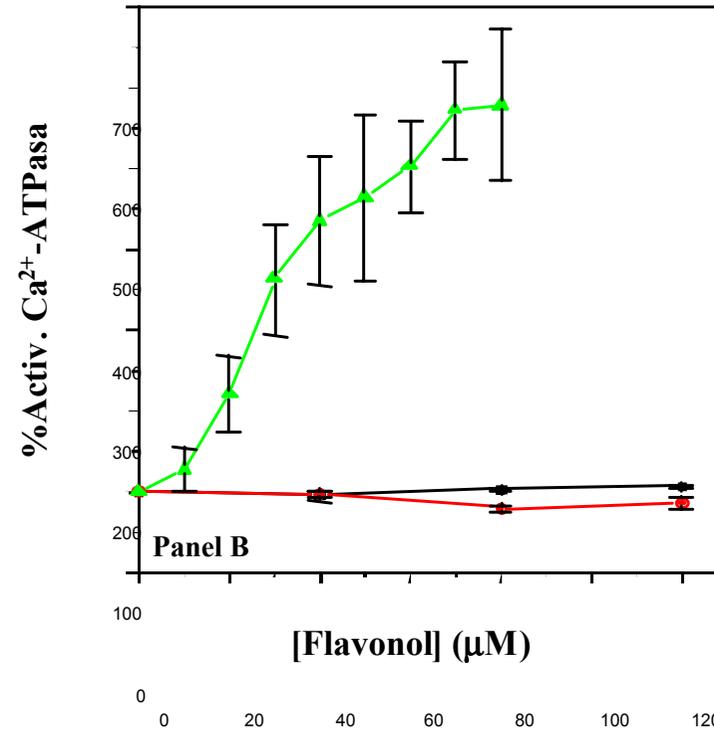
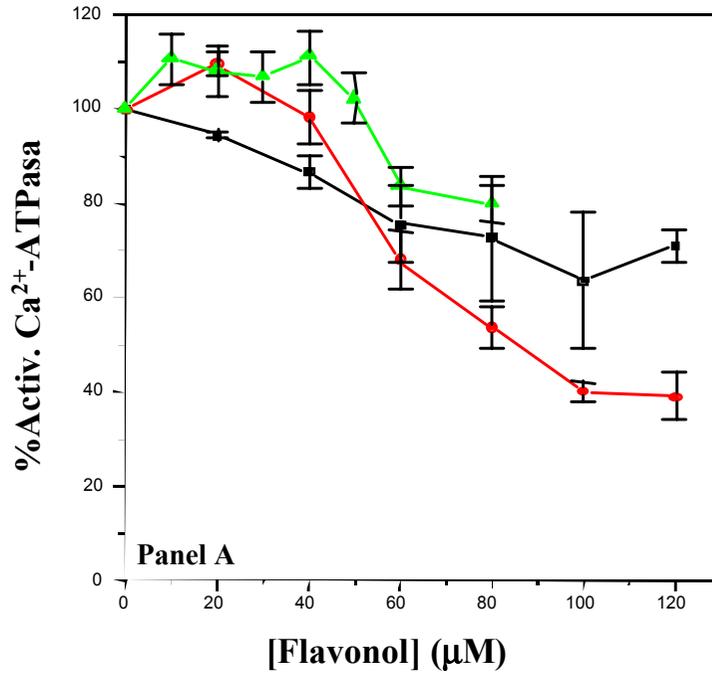
Como puede observarse en la Figura 26 (Panel A), 3,4'-di-O-metilkampferol presenta efectos muy diferente a los anteriores, presentando un comportamiento bifásico en vesículas permeabilizadas, lo que recuerda a la modulación de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa por anestésicos locales (Gutierrez-Merino y col., 1989). Así, en esta figura se observa que la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa en presencia de calcimicina no se ve alterada al añadir K-3,4' al medio de ensayo hasta llegar a una concentración de 40µM, a partir de la cual, la

actividad es inhibida de forma monótonamente dependiente con la concentración, llegando a ser del 60% con una concentración de 100 $\mu$ M a partir de la cual no se observa incremento significativo. En este caso la cinética de inhibición de K-3,4' presenta una  $K_{0,5}$  de 60 $\mu$ M coincidiendo con la que presenta K-3, pero a diferencia de éste, K-3,4' presenta un 20-30% más de inhibición de la actividad.

Al contrario de los flavonoles anteriores, 3,7-di-*O*-metilkampferol presenta el mismo comportamiento que Ap-4' y Ap-7. De los resultados representados en la Figura 26 (Panel A) se observa que la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa en presencia de calcimicina no es fuertemente alterada al añadir K-3,7 al medio de ensayo.

En cambio, cuando la actividad se registra en ausencia de calcimicina, Figura 26 (Panel B), se observa que ésta se incrementa de forma monótona al aumentar la concentración de K-3,7, indicando que este flavonoide provoca pérdida de gradiente de Ca<sup>2+</sup>. La única diferencia con Ap-4' y Ap-7, es que este flavonoide presenta una mayor potencia, ya que con una concentración de 20 $\mu$ M consigue duplicar la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, mientras que con una concentración de 120 $\mu$ M de Ap-4' ó Ap-7 no se llega a duplicar esta actividad.

Cuando se registra la actividad en ausencia de calcimicina en función de la concentración de K-3 y K-3,4', Figura 26 (Panel B), ésta no se ve alterada significativamente. De ello puede inferirse que no hay pérdida significativa de gradiente de Ca<sup>2+</sup>, punto que se ha cuestionado en los experimentos presentados más adelante.



**Figura 26:** Efecto de la concentración de flavonoles sobre la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de vesículas RS en presencia (**Panel A**) y ausencia (**Panel B**) de calcimicina. Siendo - ■ - : 3(O)-metil-Kampferol, - ● - : 3,4'(O)-dimetil-Kampferol y - ▲ - : 3,7(O)-dimetil-Kampferol.

La actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa se determinó en un medio que contiene tampón Tes/Tris 0,1M, pH7 a 25°C, KCl 0,1M,  $\text{MgCl}_2$  3mM, 50µg de PK, 50µg de LDH, NADH 0,25mM y PEP 0,42mM y con una concentración de proteína de 3µg/ml.

#### ***IV.7.1.4.- Efecto de los flavonoides sobre los niveles de $Ca^{2+}$ en vesículas de RS en condiciones de estado estacionario.***

Se ha estudiado la posible variación inducida por el exudado y los flavonoides en los niveles de  $Ca^{2+}$  alcanzados en condiciones de estado estacionario en vesículas de RS. Para ello se ha utilizado el indicador de iones metálicos arsenazo III.

La titulación con EGTA para hallar la equivalencia entre descenso de absorbancia y nmoles de  $Ca^{2+}$  capturado, indica una relación de 10 mDO por cada  $(11\pm 1,6)$  nmoles de  $Ca^{2+}$  capturado (véase Materiales y Métodos, apartado III.7.1.4; Figura 6).

El nivel de acumulación de  $Ca^{2+}$  obtenido en muestras experimentales ha sido de  $(81,4\pm 17,6)$  nmoles de  $Ca^{2+}$ /mg de proteína, nivel que entra dentro del intervalo de acumulación publicado por otros autores, que oscila entre 80 y 100 nmoles de  $Ca^{2+}$ /mg de proteína (Meissner, 1975; Fernandez-Salguero y col., 1990).

En la Tabla 93 se muestra el tanto por ciento respecto al control del nivel de acumulación de  $Ca^{2+}$  acumulado por estas vesículas en presencia de distintas concentraciones del exudado. En ella observamos que las vesículas pierden capacidad de acumulación de  $Ca^{2+}$  a medida que aumenta la concentración de exudado en el medio de ensayo.

Como puede observarse en la Tabla 94 donde se muestra el tanto por ciento respecto al control sin flavonoides del nivel de  $Ca^{2+}$  acumulado por estas vesículas, Ap, K-3 y K-3,4' no producen pérdida de gradiente de  $Ca^{2+}$ , mientras que con Ap-4', Ap-7 y K-3,7 el nivel de acumulación de  $Ca^{2+}$  se ve alterado, disminuyendo hasta casi un 30% el nivel de  $Ca^{2+}$  acumulado. Luego, de estos resultados puede deducirse que el tratamiento de vesículas RS con exudado y con los flavonoides Ap-4', Ap-7 y K-3,7 disminuye significativamente la capacidad de acumulación de  $Ca^{2+}$  por las mismas.

**Tabla 93:** Nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en vesículas de retículo sarcoplásmico en presencia del exudado de *Cistus ladanifer* y expresado como porcentaje relativo al  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en ausencia de dicho exudado (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína).

<b>% de acumulación de <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>	
<b>Control</b>	100%
<b>Exudado (30<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	98%
<b>Exudado (180<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	100%
<b>Exudado (360<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	85,5%
<b>Exudado (450<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	74,6%
<b>Exudado (540<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	35%
<b>Exudado (720<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	28%
<b>Exudado (2160<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	33%

**Tabla 94:** Nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en vesículas de retículo sarcoplásmico en presencia de los flavonoides estudiados y expresado como porcentaje relativo al  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en ausencia de dichos flavonoides (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína).

<b>% de acumulación de <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>	
<b>Control</b>	100%
<b>Ap (60<math>\mu\text{M}</math>)</b>	100%
<b>Ap-4' (100<math>\mu\text{M}</math>)</b>	72,3%
<b>Ap-7 (100<math>\mu\text{M}</math>)</b>	73,2%
<b>K-3 (60<math>\mu\text{M}</math>)</b>	100%
<b>K-3,4' (60<math>\mu\text{M}</math>)</b>	100%
<b>K-3,7 (60<math>\mu\text{M}</math>)</b>	72%

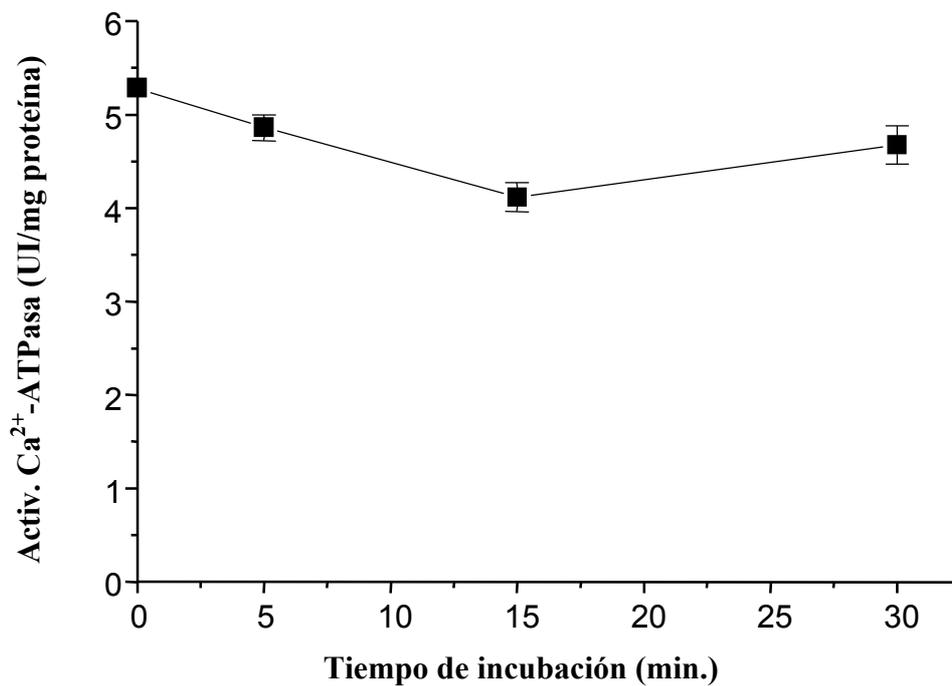
***IV.7.1.5.- Estabilidad de la actividad  $Ca^{2+}$ -ATPasa en vesículas de RS tratadas con flavonoides.***

Se trataron vesículas de RS en el medio de ensayo descrito en Materiales y Métodos (apartado III.7.1.2), a 25°C con una concentración de 40µM para apigenina. Se realizaron tres ensayos con diferentes periodos de incubación de 5, 15 y 30 minutos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27. En ella puede observarse que la inhibición con apigenina, de la actividad en presencia de calcimicina tiene lugar rápidamente, en menos de 5 minutos y se mantiene al menos durante 30 minutos.

Este mismo experimento se repitió para los flavonoides que inhiben la actividad  $Ca^{2+}$ -ATPasa en vesículas permeabilizadas, como K-3 y K-3,4', obteniéndose para estos los mismos resultados.

Esto sugiere que el proceso de interacción de estos flavonoides, Ap, K-3 y K-3,4', con la  $Ca^{2+}$ -ATPasa, tiene lugar rápidamente y se mantiene durante al menos 30 minutos.



**Figura 27:** Dependencia con el tiempo de incubación de la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de vesículas RS permeabilizadas en presencia de [Ap]=40μM.

La actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se determina en medio que contiene tampón Tes/Tris 0,1M, pH 7 a 25°C, KCl 0,1M, MgCl<sub>2</sub> 3mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1mM, 50μg de PK, 50μg de LDH, 0,25mM y PEP 0,42mM y con una concentración de proteína de 3mg/ml. A tiempo 0 el valor obtenido es la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa sin Apigenina.

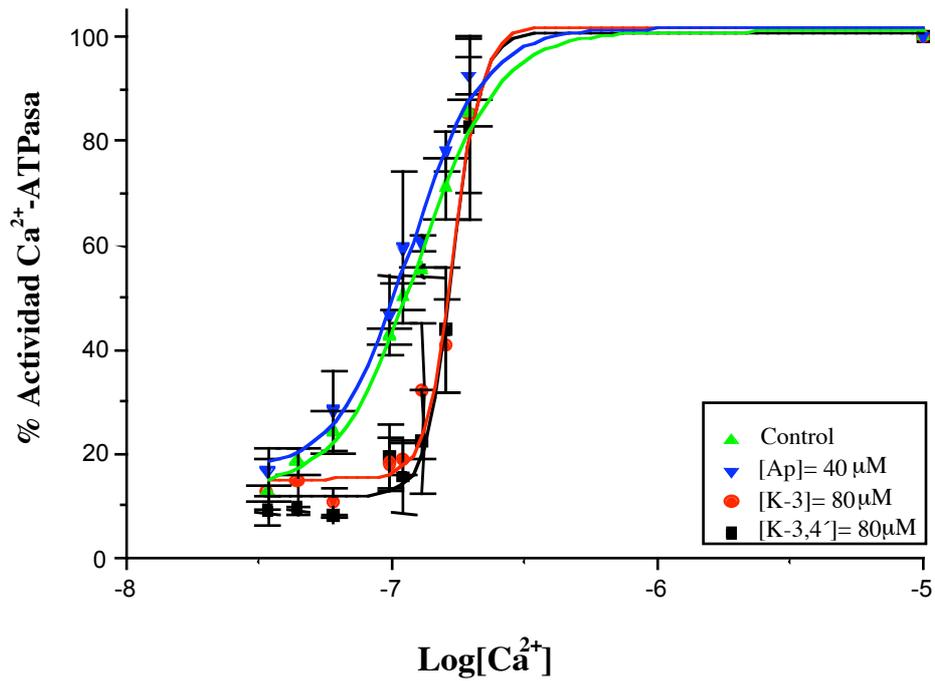
#### **IV.7.1.6.- Efecto de apigenina, 3-O-metilkampferol y 3,4'-di-O-metilkampferol sobre la dependencia de $\text{Ca}^{2+}$ de la actividad $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.**

Hemos estudiado el efecto de concentraciones de  $40\mu\text{M}$  de Ap y  $80\mu\text{M}$  de K-3 y K-3,4' que inhiben la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de RS entre un 60-70%, sobre la dependencia de esta actividad con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre, ajustada utilizando tampones  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos con RS permeabilizado, normalizados al 100% de actividad a saturación de  $\text{Ca}^{2+}$  para cada conjunto de datos experimentales se muestran en la Figura 28 y se han analizados utilizando la ecuación de Hill. Estos resultados muestran que la afinidad de la enzima por  $\text{Ca}^{2+}$ , a pH 7,  $25^\circ\text{C}$  y en presencia de  $40\mu\text{M}$  de apigenina no se ve alterada. Por tanto, la inhibición de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa por apigenina se realiza mediante un proceso no competitivo con  $\text{Ca}^{2+}$ .

Por el contrario, en presencia de  $80\mu\text{M}$  de K-3 ó K-3,4', la afinidad de la enzima por  $\text{Ca}^{2+}$ , a pH 7,  $25^\circ\text{C}$  se ve alterada, desplazando la  $K_{0,5}$  desde un valor de  $0,1\mu\text{M}$  para el control hasta un valor de  $0,2\mu\text{M}$  para K-3 y K-3,4'.

El análisis de la curva de saturación con  $\text{Ca}^{2+}$  en estos casos muestran que, la pendiente se hace mayor en presencia de estos flavonoles, de lo que puede inferirse que aunque la enzima necesita mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  para activarse, una vez llegada a una concentración determinada ( $0,1\mu\text{M}$ ), la afinidad de la proteína por  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta más fuertemente, haciéndose más cooperativa. Por tanto, estos resultados sugieren que K-3 y K-3,4' desplazan a la enzima hacia el estado  $E_2$  (que no une  $\text{Ca}^{2+}$ , véase introducción). El resultado funcional es un aumento del umbral de  $\text{Ca}^{2+}$  para la estimulación de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y, por tanto, para iniciar la relajación muscular en presencia de K-3 y de K-3,4'.

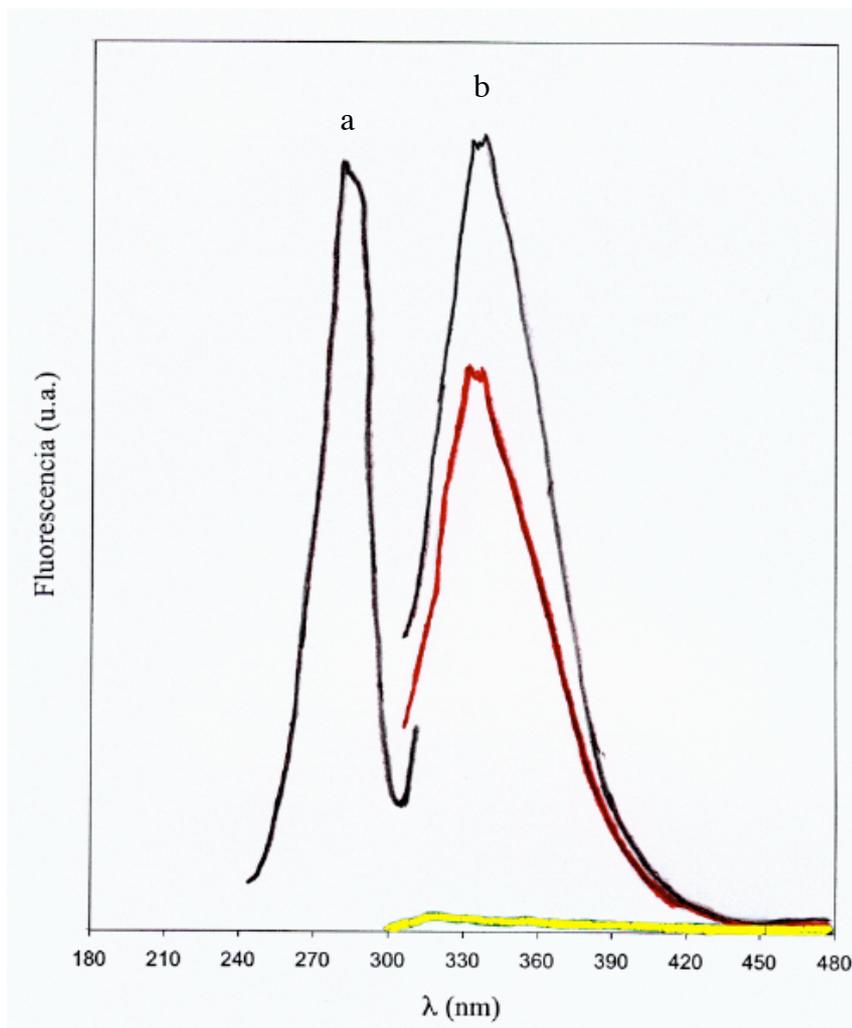


**Figura 28: Dependencia con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en presencia de flavonoides.** La actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa se determinó en un medio que contiene tampón Tes/Tris 0,1M, pH 7 a 25°C, KCl 0,1M,  $\text{MgCl}_2$  3mM, 50 $\mu\text{g}$  de LDH, 50 $\mu\text{g}$  de PK, NADH 0,25mM y PEP 0,42mM y con una concentración de proteína de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

#### ***IV.7.1.7.- Interacción de los flavonoides con la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de RS.***

Los resultados obtenidos en los estudios cinéticos expuestos anteriormente sugieren la modulación de la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de RS y, por tanto, del transporte activo de Ca<sup>2+</sup> a través de estas membranas, es mediante la interacción de los flavonoides estudiados con la proteína. Por su relevancia, esta posibilidad ha sido cuestionada más detenidamente. A tal fin hemos realizado estudios de fluorescencia intrínseca.

La Figura 29 muestra los espectros de fluorescencia de emisión y excitación de RS y de RS más 3μM de apigenina.



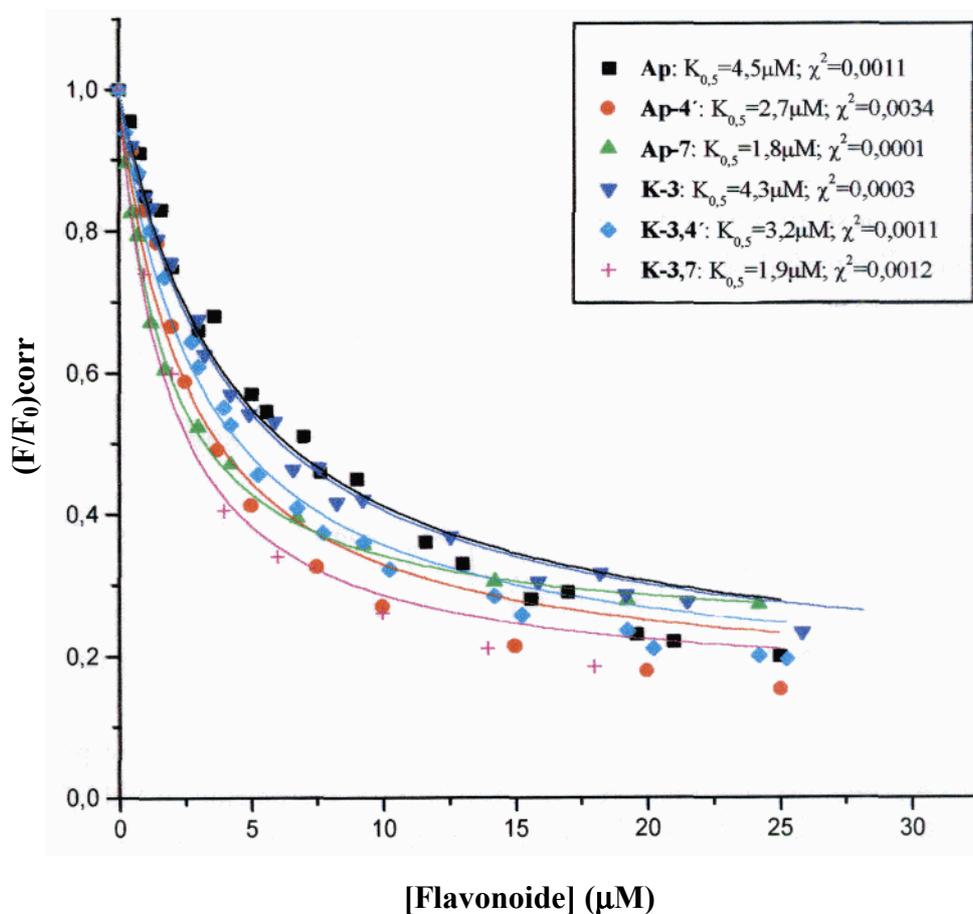
**Figura 29:** Longitudes de onda de excitación y emisión a 280nm y 335nm, respectivamente. Línea negra: Espectro de emisión de RS (a) y espectro de excitación de RS (b). Línea roja: Espectro de emisión de RS en presencia de Apigenina 3mM. Línea amarilla: Espectro de emisión (Raman) del tampón.

*IV.7.1.7.1.- Efecto de los flavonoides sobre la fluorescencia intrínseca de las membranas de RS.*

Se ha medido la dependencia de la fluorescencia intrínseca de RS con la concentración de cada uno de los flavonoides estudiados. La Figura 30 muestra el efecto de la concentración de los flavonoides a pH7 sobre la fluorescencia intrínseca de RS. Estos resultados muestran que estos flavonoides producen una fuerte extinción de esta fluorescencia, saturándose entre el 75 y 85% de extinción para los diferentes flavonoides estudiados.

Teniendo en cuenta que los agentes que extinguen la fluorescencia intrínseca de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa a través de la bicapa lipídica alcanzan el 80% de extinción de esta fluorescencia (London y Feigenson, 1981; East y Lee, 1982), estos resultados sugieren que existe una interacción directa de estos flavonoides con la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de RS.

Como puede observarse en la Figura 30, la extinción de fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de RS con K-3,7 es más fuerte que con Ap y K-3, quedando los demás flavonoides en una posición intermedia. Consecuentemente, Ap-4', Ap-7, K-3,4' y K-3,7 van a presentar mayor coeficiente de partición en la membrana de RS que Ap y K-3. Esto podría ser debido a que un grupo metilo más, tanto en Ap como en K-3, incrementa su hidrofobicidad y, por tanto, se integran con mayor facilidad en la membrana. Pero también podría ser debido a interacción diferencial con la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de los diferentes flavonoides estudiados. En este resultado, cabe destacar que son precisamente Ap-4', Ap-7 y K-3,7, el grupo de flavonoides que provocan pérdida de gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras el resto, Ap, K-3 y K-3,4', presentan un comportamiento diferente cuando actúan como inhibidores de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.

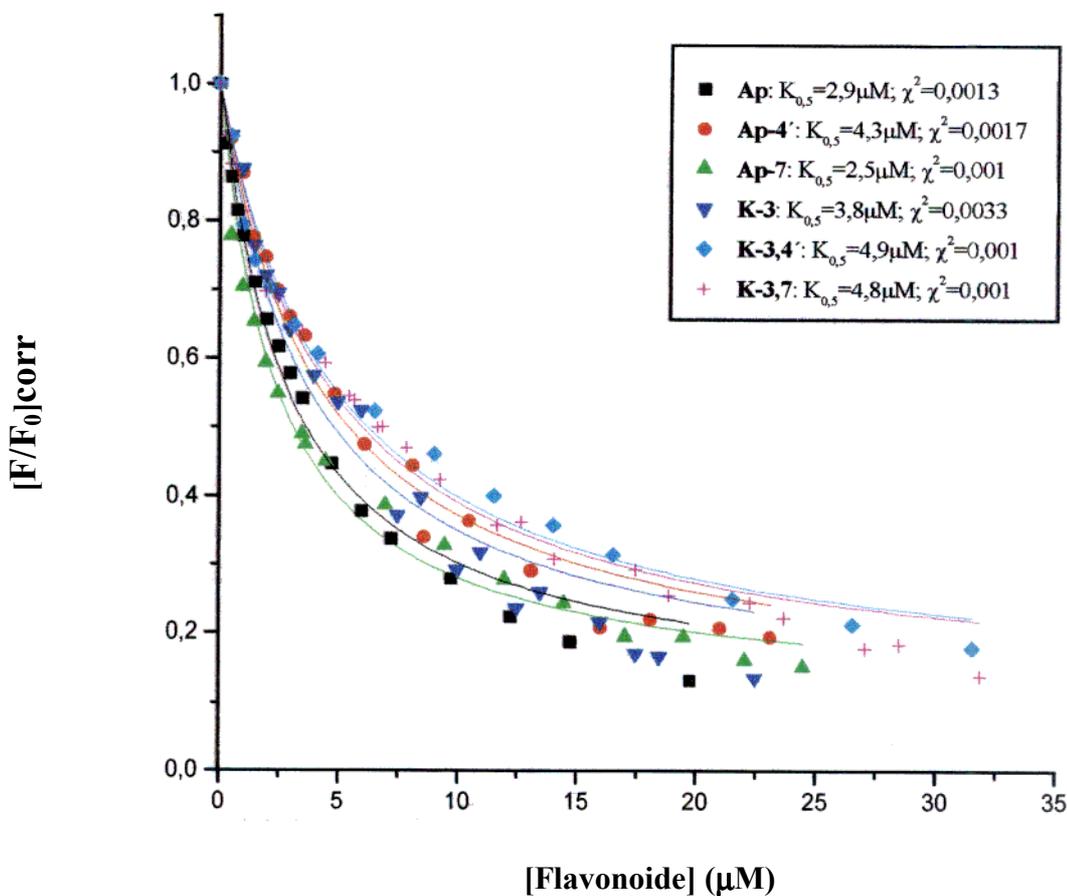


**Figura 30: Dependencia de la fluorescencia intrínseca de RS (50µg/ml) con la concentración de flavonoides.** Las medidas de fluorescencia se realizaron en tampón 0,1M Tes/0,1M KCl y 3mM MgCl<sub>2</sub> [pH 7], con longitudes de onda de excitación y de emisión de 280nm y 335nm, respectivamente. Las líneas continuas corresponden al ajuste por regresión no lineal a la ecuación siguiente:  $(F/F_0) = 1 - E_{lim} \cdot \{[I]/K_{0,5} + [I]\}$ , donde [I] es la concentración de flavonoide,  $E_{lim}$  es la extinción de fluorescencia a saturación del flavonoide y  $K_{0,5}$  es la concentración de flavonoide a la que se produce el 50% del máximo de extinción de fluorescencia. Los datos se ajustan satisfactoriamente con un valor de  $E_{lim}$  igual a un (75-85)% de extinción de fluorescencia.

#### *IV.7.1.7.2.- Efecto de los flavonoides sobre la fluorescencia de liposomas.*

Para verificar que estos flavonoides se incorporan verdaderamente en la membrana y que la extinción de fluorescencia intrínseca de RS no es simplemente producto de adsorción de los flavonoides a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, se realizaron titulaciones de liposomas (Fosfatidilcolina + 10% octil-Trp) con cada uno de los flavonoides. La Figura 31 muestra el efecto de la concentración de los flavonoides a pH 7 sobre la fluorescencia de estos liposomas. Las medidas fueron realizadas con diferentes concentraciones de flavonoide en un medio Tes 0,1M, KCl 0,1M y  $\text{Mg}^{2+}$  3mM a pH 7.

Los resultados obtenidos muestran que todos los flavonoides estudiados producen una fuerte extinción de esta fluorescencia, llegando a ser del 80-90% a saturación, un valor similar al obtenido en las titulaciones de fluorescencia intrínseca de RS. Por tanto, la extinción de la fluorescencia de las membranas de RS es debida a la incorporación de estos flavonoides en la bicapa lipídica.



**Figura 31: Dependencia de la fluorescencia de liposomas (Fosfatidilcolina + 10% octilTrp) con la concentración de flavonoides.** Las medidas de fluorescencia se realizaron en tampón 0,1M Tes/0,1M KCl y 3mM MgCl<sub>2</sub> [pH 7], con longitudes de onda de excitación y de emisión de 280 nm y 335 nm, respectivamente. Las líneas continuas corresponden al ajuste por regresión no lineal a la ecuación siguiente:  $(F/F_0)=1- E_{lim} \cdot \{[I]/K_{0,5}+[I]\}$ , donde [I] es la concentración de flavonoide,  $E_{lim}$  es la extinción de fluorescencia a saturación del flavonoide y  $K_{0,5}$  es la concentración de flavonoide a la que se produce el 50% del máximo de extinción de fluorescencia. Los datos se ajustaron satisfactoriamente con un valor de elim. Igual a un (95-100)% de extinción de fluorescencia.

La Tabla 95 muestra la relación entre la  $K_{0,5}$  de la extinción de fluorescencia intrínseca de las membranas de retículo sarcoplásmico y la  $K_{0,5}$  de la extinción de fluorescencia de liposomas para cada uno de los flavonoides estudiados. Puesto que a mayor tendencia a particionar en la bicapa lipídica, menor es el valor de  $(K_{0,5})_{lip}$ , el coeficiente  $(K_{0,5})_{lip}/(K_{0,5})_{RS}$  para cada flavonoide es una medida de la tendencia del flavonoide a particionar en la membrana de RS relativa a la tendencia a particionar en una bicapa lipídica. Si observamos la Tabla 95 podemos distinguir dos comportamientos diferentes; Ap y K-3, que muestran una  $(K_{0,5})_{RS}$  mayor que  $(K_{0,5})_{lip}$ , y por tanto, una relación  $(K_{0,5})_{lip}/(K_{0,5})_{RS}$  menor que 1, y Ap-4', Ap-7, K-3,4' y K-3,7 que muestran el caso opuesto, y por tanto, una relación  $(K_{0,5})_{lip}/(K_{0,5})_{RS}$  mayor que 1. Estos resultados sugieren que los flavonoides más metilados (Ap-4', Ap-7, K-3,4' y K-3,7), se incorporan con mayor facilidad a la membrana de RS que a una bicapa lipídica pura, apoyando la hipótesis de que, interaccionan más fuertemente con la  $Ca^{2+}$ -ATPasa.

**Tabla 95:** Relación entre  $K_{0,5}$  de la extinción de fluorescencia intrínseca de las membranas de retículo sarcoplásmico y  $K_{0,5}$  de la extinción de fluorescencia de liposomas para cada uno de los flavonoides estudiados.

<b>Flavonoide</b>	<b><math>(K_{0,5})_{RS}</math></b>	<b><math>(K_{0,5})_{lip}</math></b>	<b><math>(K_{0,5})_{lip}/(K_{0,5})_{RS}</math></b>
<b>Ap</b>	4,5	2,9	0,6
<b>Ap-4'</b>	2,7	4,3	1,6
<b>Ap-7</b>	1,8	2,5	1,4
<b>K-3</b>	4,3	3,8	0,9
<b>K-3,4'</b>	3,2	4,9	1,5
<b>K-3,7</b>	1,9	4,8	2,5

$(K_{0,5})_{RS}$ : concentración de flavonoide a la que se produce el 50% de extinción de fluorescencia intrínseca de las membranas de RS.

$(K_{0,5})_{lip}$ : concentración de flavonoide a la que se produce el 50% de extinción de fluorescencia de liposomas.

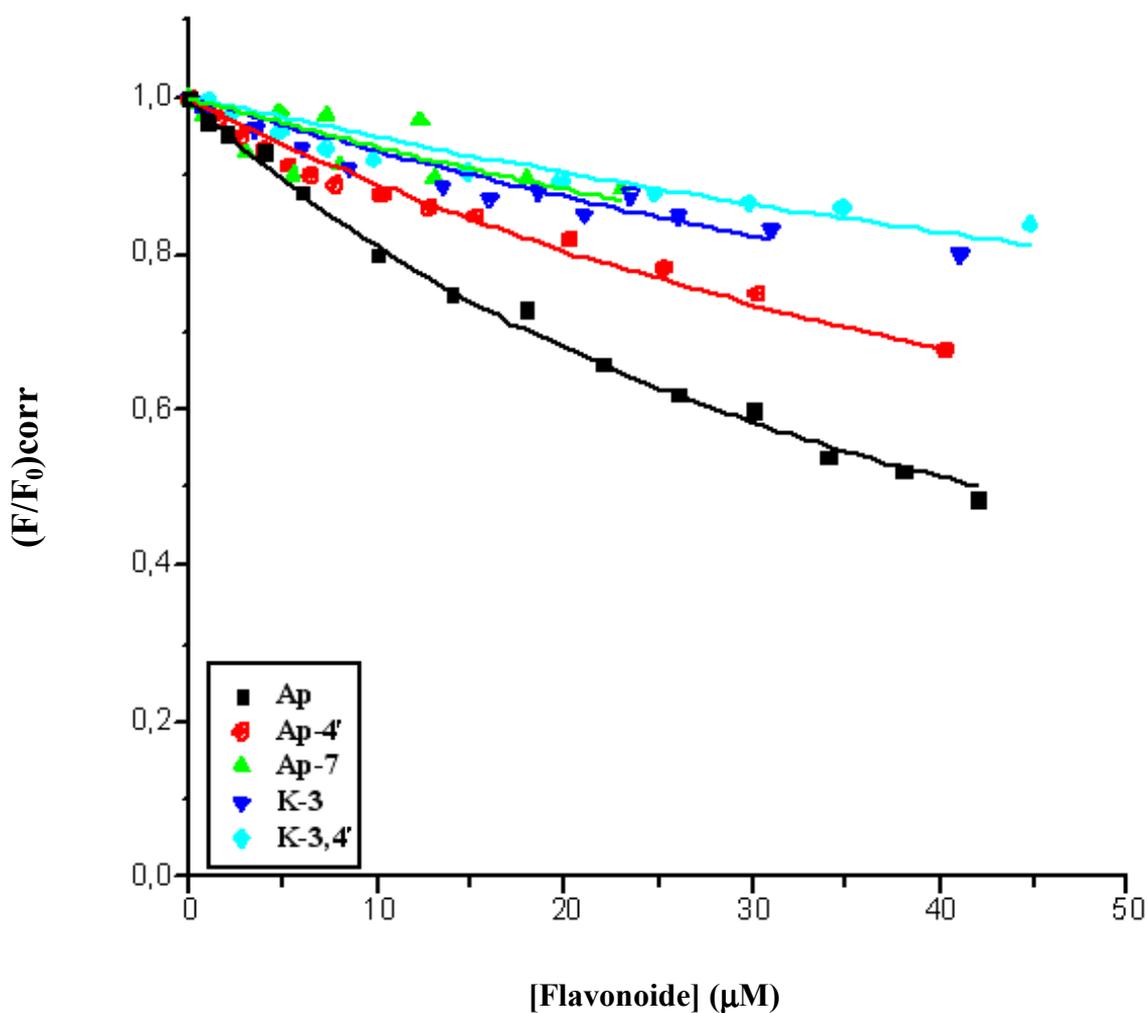
#### *IV.7.1.7.3.- Efecto de los flavonoides sobre la fluorescencia de L-Trp.*

Se ha titulado la fluorescencia intrínseca de L-Trp con cada uno de los flavonoides estudiados. La Figura 32 muestra el efecto de la concentración de los flavonoides a pH 7 sobre la fluorescencia de L-Trp (10 $\mu$ M). Las medidas fueron realizadas con diferentes concentraciones de flavonoide en un medio Tes 0,1M, KCl 0,1M, Mg<sup>2+</sup> 3mM a pH 7.

K-3,7 no se representa en la figura a causa del ruido que mostraba debido a la baja solubilidad que presenta este compuesto en el medio acuoso.

Estos resultados muestran que los flavonoides estudiados producen una débil extinción de esta fluorescencia. El flavonoide que produce mayor extinción, es Ap que sólo alcanza el 30% de extinción de esta fluorescencia a una concentración de 50 $\mu$ M.

Por tanto, la fuerte extinción de la fluorescencia observada para octil-Trp incorporado en liposomas es consecuencia de un fuerte incremento de la concentración local del flavonoide en la bicapa lipídica, consecuencia de una favorable partición en esta fase con respecto a la fase acuosa.

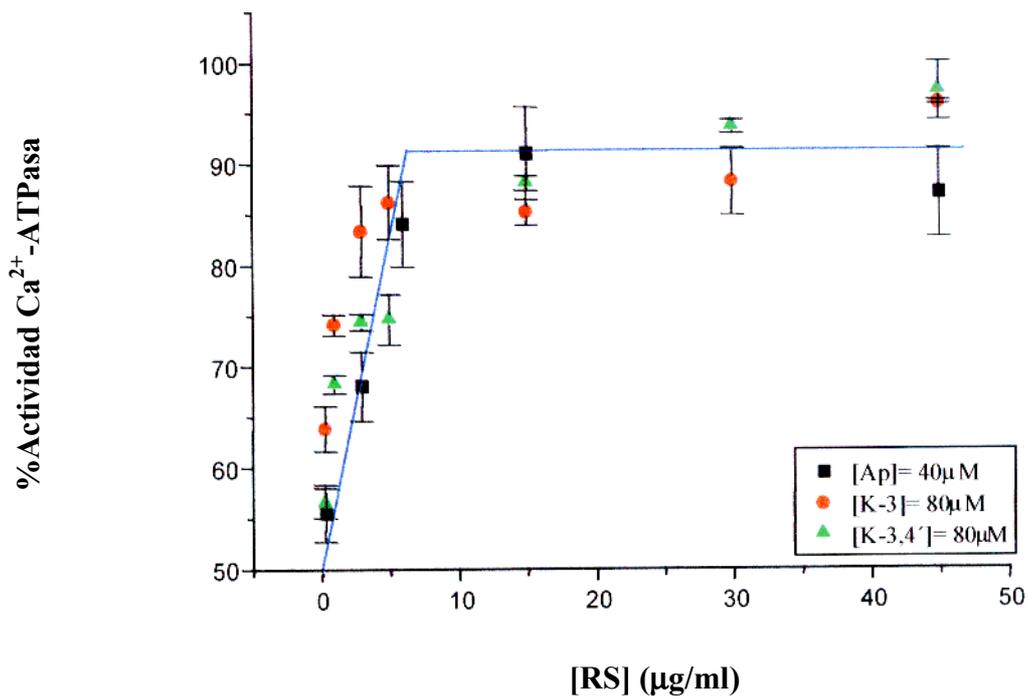


**Figura 32: Dependencia de la fluorescencia de L-Trp (10μM) con la concentración de flavonoides.** Las medidas de fluorescencia se realizaron en tampón 0,1M Tes/0,1M KCl y 3mM MgCl<sub>2</sub> [pH 7], con longitudes de onda de excitación y de emisión de 280 nm y 335 nm, respectivamente. Las líneas continuas corresponden al ajuste por regresión no lineal a la ecuación siguiente:  $(F/F_0)=1-E_{lim} \cdot \{[I]/K_{0,5}+[I]\}$ , donde [I] es la concentración de flavonoide,  $E_{lim}$  es la extinción de fluorescencia a saturación del flavonoide y  $K_{0,5}$  es la concentración de flavonoide a la que se produce el 50% del máximo de extinción de fluorescencia.

#### **IV.7.1.8.- Efecto de la concentración de RS sobre la inhibición de la actividad $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa por apigenina, 3-*O*-metilkampferol y 3,4'-di-*O*-metilkampferol.**

Los resultados de los ensayos sobre fluorescencia intrínseca nos indican que la inhibición de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa por Ap, K-3 y K-3,4' se lleva a cabo mediante la interacción directa con esta enzima. Para conocer si esta inhibición es debida a la interacción de la proteína con la concentración de flavonoides de la fase acuosa o con la concentración de la fase lipídica, se midió la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en presencia de calcimicina con diferentes concentraciones de RS tratadas con 40 $\mu\text{M}$  Ap, 80 $\mu\text{M}$  K-3 y 80 $\mu\text{M}$  K-3,4'.

Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 33. En ella se puede observar que Ap, K-3 y K-3,4' muestran el mismo comportamiento. Los tres flavonoides presentan dependencia lineal de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa con la concentración de RS llegando a aproximadamente al (90-100)% de actividad. Considerando la concentración total de lípidos a la concentración de RS a la que se produce la saturación del efecto (8-10 $\mu\text{g}$  proteína/ml aproximadamente igual a 8-10 $\mu\text{M}$  de lípidos), se puede deducir que la inhibición de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es debida a la interacción de estos flavonoides con la proteína a través de la fase acuosa y no de la fase lipídica. Con una concentración de RS menor a 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$  las membranas llegan al punto de saturación de flavonoide quedando una cantidad despreciable de flavonoide libre en la fase acuosa. A medida que aumentamos la concentración de RS disminuye la concentración de flavonoide en la fase acuosa y en paralelo se produce una menor inhibición de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, hasta una concentración de RS de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , a partir de la cual la actividad llega a su máximo manteniéndose prácticamente constante.



**Figura 33: Dependencia con la concentración de RS de la inhibición por Apigenina, 3-*O*-Metilkampferol y 3,4'-Di-*O*-metilkampferol.** La actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se determinó en un medio que contiene tampón Tes/Tris 0,1M, pH 7 a 25°C, KCl 0,1M, MgCl<sub>2</sub> 3mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1mM, 50µg de PK, 50µg de LDH, NADH 0,25mM y PEP 0,42mM.

**IV.7.2.- Estudios preliminares de la actividad insecticida de los flavonoides del exudado de *C. ladanifer*. Bioensayo sobre *Galleria mellonella*.**

En los bioensayos realizados para comprobar la actividad del exudado y de la fracción de flavonoides de las hojas de *C. ladanifer* sobre las larvas de *Galleria mellonella*, se observó que estos compuestos añadidos a la dieta de estas larvas resultaban tan tóxicos que llegaba a producirles la muerte. En la Tabla 96 se presenta la mortalidad media acumulada en el tiempo que dura el experimento (dos semanas) por el tipo de dieta o tratamiento. En todas las evaluaciones, el promedio de mortalidad registrado en la dieta con cipermetrina o con flavonoides fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ), que el observado en la dieta testigo. La mortalidad de las larvas en la dieta con exudado fue similar a la registrada en la dieta con flavonoides, pero este promedio no resultó lo suficientemente mayor que el obtenido en la dieta testigo como para ser significativamente diferente.

Los resultados indican que el exudado incorporado a la dieta en una proporción de 2mg/g no provocó mortalidad significativamente diferente a la observada en la dieta testigo, durante el periodo normal de desarrollo del tercer estadio larvario de *G. mellonella*. En cambio, la incorporación de 2mg/g de flavonoides en la dieta tiene un efecto tóxico sobre las larvas de *G. mellonella*, ya que en las cuatro repeticiones realizadas se registró una mortalidad del 60% de las larvas.

**Tabla 96:** Promedio de larvas muertas en cada tratamiento.

Tratamientos	Nº larvas muertas				Media
	1ªrepetición	2ªrepetición	3ªrepetición	4ªrepetición	
<b>Testigo</b>	2	7	5	4	<b>4,5<sup>a</sup></b>
<b>Cipermetrina</b>	14	15	15	13	<b>14,25<sup>b</sup></b>
<b>Exudado</b>	10	5	6	4	<b>6,25<sup>ac</sup></b>
<b>Flavonoides</b>	9	13	8	6	<b>9<sup>c</sup></b>

<sup>a,b,c</sup> : Diferencias entre tratamientos, letras coincidentes = significativamente no diferentes  $p > 0,05$  (ANOVA).

## DISCUSIÓN

---

## **FUNCIÓN ALELOPÁTICA.**

Las plantas compiten con otras plantas por luz, agua y nutrientes. La producción, acumulación y liberación de metabolitos secundarios, que inhiben la germinación o desarrollo de otras plantas es una de las estrategias complejas que han evolucionado para aumentar la supervivencia de la planta. En la actualidad se han realizado suficientes experiencias como para indicar que en un número considerable de casos, se ejercen efectos alelopáticos entre plantas superiores. Las sustancias químicas implicadas son generalmente productos derivados del metabolismo secundario, encontrándose las toxinas implicadas en alelopatía en hojas y tallos (Grant, 1964; Bieber y Hoveland, 1968; Ballester y col., 1979; Smith, 1989). Se ha llegado a aislar e identificar diferentes compuestos con acción alelopática (*aleloquímicos*), siendo furanocumarinas, cumarinas simples, piranocumarinas, ácido cinámico y sus derivados, catecol, hidroxiacetofenonas, flavonoles y proantocianidinas los que mayor capacidad de inhibición presentaban (Datta y Chatterjee, 1980; Ballester y col., 1982; Kil y Yim, 1983; Odén y col., 1992; Nilsson y col., 1993; Pellisier, 1993; Macías y col., 1993; Li y col., 1993; Viles y Reese, 1996). Aunque el modo de acción de estos compuestos en el mecanismo de alelopatía no se conoce, sí se ha demostrado que compuestos fenólicos como los flavonoides pueden interferir en la formación del adenosín trifosfato (ATP) en la mitocondria (Stenlid, 1970, 1976) y pueden inhibir o interaccionar con el modo de acción de las hormonas de otras plantas como las auxinas (Jacobs y Rubery, 1988; Brunn y col., 1992). Igualmente flavonoides como quercetina y naringenina actúan como inhibidores del transporte de electrones mitocondrial y suprimen la hidrólisis de  $Mg^{2+}$ -ATPasa, y el kampferol inhibe el fotosistema II (Einhellig, 2001).

Pero las plantas también necesitan defensas contra herbívoros y microorganismos. Y son de nuevo, los metabolitos secundarios, a veces incluso los mismos compuestos que poseen propiedades alelopáticas, los que juegan un importante papel en este sentido. Esto es debido a que mientras algunos productos naturales están específicamente dirigidos a un grupo de organismos, otros muestran un espectro más amplio, actuando sobre objetivos moleculares básicos y comunes para todas las células. Así, se ha demostrado que alcaloides con propiedades alelopáticas pueden, además, interaccionar

con neuroreceptores, con el DNA y otras enzimas relacionadas, pueden inhibir la síntesis de proteínas, desestabilizar membranas e incluso inhibir la transcriptasa inversa. La propiedad multifuncional atribuidos a estos compuestos puede extenderse a diferentes estructuras químicas como pueden ser alcaloides y flavonoides, que además de presentar propiedades alelopáticas (Einhellig, 2001), inhiben la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (Shoshan y MacLennan, 1981). Esto ofrece a la planta una medida de defensa ante un amplio rango de organismos como herbívoros, bacterias y virus, pero a la vez, prestan a la planta que los produce, un mecanismo de interferencia frente a otras plantas que no sintetizan dichos compuestos (Wink, 2000).

En estudios previos (Chaves y Escudero, 1997) se ha puesto de manifiesto que el exudado de *C. ladanifer* presenta actividad alelopática. Igualmente en estos estudios, se aprecia que los compuestos que inhibían fuertemente la germinación no eran los flavonoides, sino otros compuestos que forman parte del exudado, que bien podían ser compuestos fenólicos simples. La mezcla de estos flavonoides, sin embargo, ejercían un efecto negativo en el desarrollo de las plántulas.

Por una parte, en este trabajo, se ha profundizado sobre el conocimiento de la actividad alelopática de esta especie; y de los ocho flavonoides identificados en el exudado de *C. ladanifer* (Chaves y col., 1998), solamente presentan actividad alelopática dos flavonoles (3-*O*-metilkampferol y 3,7-di-*O*-metilkampferol) y la flavona 4'-*O*-metilapigenina. Su actividad no está relacionada directamente con la inhibición en la germinación, pero sí afectan al tamaño de la raíz, de cotiledones y retrasan el nacimiento de cotiledones. El retraso en la velocidad de germinación y crecimiento de radícula es importante para el establecimiento de todas las especies en condiciones naturales, afectando a la oportunidad de la planta para establecerse, pues no aprovecha bien las condiciones favorables como pueden ser las primeras lluvias y pudiendo originar también dificultades en la penetración de la raíz en el suelo. Este proceso se potencia aún más en ecosistemas pobres en nutrientes, como son aquellos en los que se desarrolla *C. ladanifer*, donde la competencia es aún mayor, y además la falta de nutrientes puede aumentar la susceptibilidad al déficit de agua.

Es de destacar, que ninguno de los flavonoides ensayados por separado ejerce efecto sobre el tamaño de cotiledones, sin embargo, aparecen cotiledones más pequeños cuando actúan a la vez 3-*O*-metilkampferol y 3,7-di-*O*-metilkampferol, resultando así más eficaz la presencia conjunta de los dos flavonoles, y consecuentemente se necesitará menor concentración de cada uno de ellos para producir efecto negativo sobre el desarrollo de las plántulas.

Los resultados obtenidos son consistentes con otros trabajos previos, donde se ha demostrado la influencia de otros flavonoides como Formononetina 7-*O*-glucósido, Hesperitina 7-rutinosido y Taxifolina 3-arabinosido, en el tamaño y crecimiento de raíces y cotiledones de plántulas de mostaza, rábano y tomate (Inderjit y Dakshini, 1991, 1992, 1994; Castaneda y col., 1992). Además, las concentraciones a las que eran efectivos, 1, 0,5 y 0,1mM coinciden con las ensayadas en el presente trabajo. Sin embargo, otros trabajos muestran que algunos flavonoides pueden incluso afectar directamente a la germinación. Este es el caso de un flavonoide aislado de *Tithonia diversifolia* que inhibe la germinación de semillas de *Raphanus sativa*, *Cucumis sativus* y *Allium cepa*. (Baruah y col., 1994)

El efecto de los flavonoides y en general de los compuestos fenólicos en las diferentes funciones fisiológicas no está claro. Aún menos, cómo actúan estos compuestos en la germinación y crecimiento de las plántulas. Pueden interferir en la formación de adenosín trifosfato (ATP) en la mitocondria (Stenlid, 1970, 1976) y en el modo de acción de hormonas de otras plantas como las auxinas (Jacobs y Rubery, 1988; Brunn y col., 1992), pero es necesario seguir profundizando en este aspecto.

Como se ha comentado con anterioridad, la fracción de exudado de *C. ladanifer* que mayor actividad alelopática presenta es la constituida por compuestos diferentes a los flavonoides (Chaves y Escudero, 1997). Con el objeto de seguir profundizando, en este estudio se ha determinado la naturaleza química de estos compuestos y se ha cuantificando igualmente su actividad alelopática. Se ha puesto en evidencia que al menos once compuestos (ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido butírico y/o metilpropionato, ácido 3-hidroxi-butírico, ácido hidroxicinámico, ácido p-anísico, ácido cinámico, azuleno, ácido 4-hidroxi-benzoico y ácido ferúlico) poseen dicha actividad,

aunque con diferente potencia. Dos de ellos, metil-propionato y ácido butírico inhiben fuertemente la germinación incluso a concentraciones muy bajas. Estos compuestos también están presentes en el exudado a una baja concentración. El resto de los compuestos; ácido ferúlico, ácido hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, ácido 3-hidroxibutírico y azuleno no afectan a la germinación directamente, pero sí afectan negativamente al desarrollo de las plántulas. El ácido cinámico y el ácido hidroxicinámico afectan muy negativamente al tamaño de la raíz y cotiledones, el ácido cinámico también inhibe la germinación y el nacimiento de cotiledones y el ácido hidroxicinámico sólo el nacimiento de cotiledones. Este efecto negativo sobre el desarrollo de las plántulas, puede tener consecuencias igualmente negativas que sobre la germinación, pues como se ha comentado anteriormente, el crecimiento de la radícula es importante para el establecimiento de todas las especies en condiciones naturales, afectando a la oportunidad de las plantas para establecerse.

La concentración a la que son efectivos estos compuestos son consistentes con trabajos de otros autores (Kuiters, 1989; Li y col., 1993) donde se pone de manifiesto que la actividad de algunos ácidos fenólicos como el ácido cinámico tienen el mismo efecto y actividad sobre la germinación de semillas y crecimiento de plántulas que el encontrado en nuestra experiencia. La concentración efectiva de estos ácidos fenólicos para inhibir el crecimiento de las plántulas o la germinación está entre 1 y 0,1mM. Por el contrario, estos mismos autores ponen en evidencia que el ácido ferúlico inhibe la germinación a 1mM, pero en nuestra experiencia no afecta a la germinación a las concentraciones ensayadas, sino que sólo inhibe el crecimiento de las plántulas. El trabajo de Blum y Rebbeck (1989) reportó que el ácido ferúlico inhibe el tamaño de la raíz, pero estas eran más gruesas, proponiendo que este compuesto puede estimular la iniciación de raíces secundarias. Este fenómeno tampoco es observado en nuestros ensayos, al igual que el efecto estimulador de promover la germinación a bajas concentraciones (Milborrow, 1984). Se ha demostrado que el efecto de estos compuestos puede variar dependiendo de las especies ensayadas (Haugland y Brandsaeter, 1996) y este comportamiento puede ser debido a diferencias en el tamaño de las semillas, permeabilidad, captación diferencial y metabolismo.

Por otra parte, algunos ácidos fenólicos, además de inhibir directamente la germinación de semillas, pueden afectar al tamaño de raíces y cotiledones (Blum y Rebeeck, 1989; Kuiters, 1989; Lyu y col., 1990; Wacker y col., 1990) y además se ha demostrado (Li y col., 1993) que los ácidos fenólicos inhiben más la elongación de raíces que de tallos. En nuestro estudio este fenómeno se observa con ácido cinámico y ácido hidroxicinámico, existiendo además una alta relación dependiente de la concentración ( $r^2=0,98$  y  $0,92$ , respectivamente). Pero no ocurre lo mismo con el ácido ferúlico y ácido 4-hidroxibenzoico. El ácido ferúlico no inhibe este parámetro y sí el tamaño de los cotiledones y el ácido 4-hidroxibenzoico, aunque sí lo inhibe es más efectivo en el tamaño de cotiledones. Por el contrario el azuleno, de naturaleza no fenólica, destaca por ejercer un fuerte efecto en el tamaño de la raíz, pero sin embargo los cotiledones no resultan afectados.

Usualmente los compuestos que presentan actividad alelopática derivan de varias fuentes y determinar su origen es bastante complejo. Pero es lógico pensar que el efecto alelopático que pueden ejercer, está determinado por la acción conjunta de todos ellos. En este estudio se demuestra que la acción conjunta de todos o parte de ellos, es más activa que cuando actúan por sí solos. En este trabajo se pone en evidencia que la mezcla de estos compuestos, incluso de aquellos que tienen un efecto negativo muy débil sobre el desarrollo de las plántulas, sinergizan el comportamiento alelopático. Este efecto se potencia cuando está presente el ácido cinámico y el ácido hidroxicinámico. Aunque no se ha realizado un examen riguroso de la interacción de fenoles, Li y col. (1993) han demostrado el sinergismo en la acción de ácidos fenólicos como cafeico, ferúlico y cinámico. El poner de manifiesto este sinergismo positivo tiene una gran relevancia pues implicaría que probablemente no es necesaria una concentración alta de estos compuestos en el medio donde ejercen su acción para ser activos, estos compuestos en sí, pueden potenciar la acción de otros compuestos. De hecho, en suelo se han identificado y cuantificado diferentes compuestos con actividad alelopática y en la mayoría de los casos a concentraciones muy bajas (Blum y col., 1989; Lyu y col., 1990; Lehman y col., 1994, Inderjit y Dakshini, 1991, 1992), pero este efecto sinérgico puede compensar la baja concentración presente en este medio.

Se está profundizando en el conocimiento sobre la función y modo de acción de estos compuestos. Ni el pH, ni la presión osmótica de las disoluciones empleadas parecen ser responsables del efecto negativo observado (Rikala y Jozefek, 1990; Nilsson, 1993). Jaderlund y col. (1996) defienden otras teorías como que en la presencia de estos compuestos las plantas consumen menos agua, provocándose una disfunción en las raíces. La acción de los compuestos fenólicos podría estar implicada en la bajada de la integridad de la membrana, alteración de las vías enzimáticas, incluso se ha demostrado disminución en la producción de clorofila (Gallardo y col., 1998, Reigosa y col., 1999).

Actualmente es necesario profundizar en el conocimiento de la alelopatía. No es suficiente dar a conocer que los diferentes órganos de una especie posean compuestos con actividad alelopática, sino que estos tienen que pasar al suelo y ser activos allí. Con el objeto de aproximarnos a las condiciones naturales, se han realizado ensayos de los *aleloquímicos* sobre suelo. En estos ensayos hay que tener presente que son muchos los factores que influyen en la capacidad alelopática de estos compuestos, ya que junto con la posible alteración de su actividad, tenemos que tener en cuenta las pérdidas o transformaciones que se producen desde la secreción de los mismos hasta la captación por parte del organismo receptor.

Los resultados obtenidos de los ensayos realizados en suelo ponen de manifiesto que la acción negativa que ejercen estos compuestos sobre la germinación y desarrollo de plántulas (tanto cuando se ensayan por separado, como cuando se cuantifica la acción conjunta de ellos) se potencia al actuar en el suelo. El comportamiento de compuestos como ferúlico, 4-hidroxibenzoico, hidroxicinámico, oxálico, metilmalónico y p-anísico, que en ensayos sobre papel no inhiben la germinación, sobre suelo muestran un efecto negativo, y compuestos como el cinámico, metilpropionáto y butírico, que presentan una actividad negativa sobre papel, incrementan su efecto en los ensayos realizados sobre suelo.

Se evidencia que la interacción que se produce entre estos compuestos y el medio dónde van a ejercer su acción, el suelo, conlleva a una mayor actividad negativa de los mismos. Nuevamente estos resultados ratifican la hipótesis de que no es necesaria

una concentración alta de compuestos en el suelo para que sean activos. Esto explicaría que muchos de estos compuestos que han sido detectados en suelo, se encuentran en concentraciones menores que las ensayadas en laboratorio y a las que ejercen un efecto negativo.

Por el contrario, cuando se analizan los efectos producidos sobre la longitud de raíces y cotiledones se observa que, tanto con los compuestos por separado como en las mezclas, la inhibición es atenuada cuando los ensayos son realizados en suelo. Esto puede ser debido a que las plántulas sembradas en suelo, van a tener disponible mayor concentración de nutrientes que las sembradas en papel.

Además de cuantificar la actividad de los *aleloquímicos* en el suelo, es necesario conocer si éstos, una vez secretados por la planta, pasan al suelo y están presentes allí para ejercer su acción. En otras palabras, es necesario comprobar si los suelos asociados a la especie que se estudia inhibe la germinación de otras especies, y si los compuestos detectados en las partes aéreas son detectados también en el suelo y permanecen en él lo suficiente como para ejercer su efecto.

Los resultados de los ensayos realizados en los suelos asociados a *C. ladanifer* ponen de manifiesto, que éstos, inhiben la germinación de *R. crispus*. La inhibición en la germinación y en el nacimiento de cotiledones, aunque de manera heterogénea entre los diferentes puntos de muestreo, se produce prácticamente durante todo el año, excepto en los meses correspondientes al verano. En otros estudios (Alías, 2002) se ha puesto en evidencia que existen diferencias estacionales tanto sobre la germinación y emergencia de cotiledones como sobre la biomasa de las plántulas sembradas en suelo de jara de diferentes localidades con diferentes condiciones climáticas, encontrándose inhibición significativa de estos parámetros principalmente en la estación de primavera en todas las localidades. Igualmente, en estos estudios se pone en evidencia la heterogeneidad existente en la respuesta alelopática entre los diferentes puntos de muestreo.

Si comparamos los porcentajes de germinación y cotiledones obtenidos en estos suelos con los obtenidos cuando el ensayo se realiza sobre papel o sobre suelo, se

observa que estos valores son más parecidos a los obtenidos en los ensayos sobre suelo que los obtenidos sobre papel. Este análisis nos indica, que el suelo, es un factor importante a tener en cuenta, a la hora de estudiar el potencial alelopático de una especie, ya que puede alterar el efecto de los compuestos alelopáticos. Por ello, autores como Inderjit y Weiner (2001), sugieren que la alelopatía sería mejor estudiada y contextualizada en términos de ecología química del suelo.

La inhibición que muestran los suelos asociados a *C. ladanifer* puede ser debido a dos causas: competencia por nutrientes, al ser suelos muy deficitarios en nutrientes, o a la presencia de compuestos con actividad alelopática en los suelos.

Al estudiar las características edafológicas de los suelos de jarales y compararlas con los suelos controles, se observa que no hay diferencias específicas entre los suelos que expliquen la inhibición en la germinación. La evolución a lo largo del año de las diferentes características edafológicas también es prácticamente la misma. Existen diferencias en el contenido de potasio que disminuye de forma más considerable en los suelos controles durante los meses de mayor precipitación. Este elemento es requerido por la vegetación en los primeros estadios de crecimiento. Teniendo en cuenta que en estos meses se produce la germinación de la mayoría de las especies herbáceas, esta disminución puede ser debida al mayor porcentaje de germinación en suelos controles que en jarales. Por otro lado, el pH disminuye en los suelos controles en Noviembre y en los jarales en Septiembre, Octubre y Noviembre. Pero la disminución del pH, tampoco es significativa como para poder deducir que el pH sea el factor responsable de la inhibición.

Si se analizan los fenoles totales en suelos, se observa que la cantidad detectada en suelos asociados a *C. ladanifer* es más alta que la cuantificada en los suelos control. Esta diferencia sugiere que los compuestos fenólicos del exudado de *C. ladanifer* son transportados hasta el suelo. Se podría pensar que estos compuestos se van acumulando en el suelo, sin embargo, muestran una marcada variación estacional. Esta variación cuantitativa del contenido fenólico en suelo a lo largo del año, puede estar causado por la degradación biótica o abiótica y/o por procesos como retención, transporte y transformación (Dalton y col., 1983; Dao, 1987; Blum y Shafer, 1988; Cheng, 1995).

La cantidad de compuestos fenólicos en el suelo puede alterar las características del suelo como pH, materia orgánica y nutrientes (Rice, 1984; Appel, 1993; Inderjit, 1996). Además, estas características a su vez influyen en la disponibilidad cualitativa y cuantitativa de los compuestos fenólicos (Dalton y col., 1993; Rice, 1984; Blum y col., 1997; Dalton, 1989). Así, Inderjit y Mallik (1996) demuestran que los compuestos fenólicos tienen potencial para crear condiciones pobres de nutrientes en términos de baja disponibilidad de ciertos nutrientes. Estos efectos podrían ser debidos a diferentes procesos como sorción, alteración microbiana de compuestos fenólicos, mineralización microbiana, etc. Estas condiciones alteradas de los suelos pueden afectar adversamente al crecimiento de plantas (Black, 1973). En bioensayos alelopáticos, es importante detectar si el/los efecto/s observados de compuestos alelopáticos es o son debidos al efecto directo de *aleloquímicos* o a la alteración de las condiciones del suelo. En este trabajo, no se muestra que el contenido de compuestos fenólicos en suelos asociados a *C. ladanifer* actúe alterando las características edafológicas del mismo, pero sí pueden estar relacionado con la inhibición de la germinación observada.

Si se comparan los valores de fenoles totales detectados en cada suelo con el porcentaje de germinación de *R. crispus* registrado en ellos, se observa mayor inhibición en el suelo S-1 en Septiembre, siendo éste, en el que se ha cuantificado mayor contenido de fenoles totales. Igualmente en el mes de Febrero se observa alta concentración de fenoles en los puntos muestreados y los tres presentan inhibición en la germinación y nacimiento de cotiledones. Pero esta relación no es tan simple y directa, pues existen meses con igual concentración de fenoles o menores y que muestran inhibición en la germinación, o al contrario, meses como los de verano, con alta concentración de fenoles y en los que no se aprecia inhibición directa ni retraso en la germinación.

Por otro lado, si analizamos los compuestos identificados por HPLC en cada uno de los suelos, se pone de manifiesto la presencia, en suelos de jarales, de tres flavonoides (apigenina, 3-*O*-metilkampferol y 3,7-di-*O*-metilkampferol), de tres ácido fenólicos (ácido hidroxibenzoico, ácido cinámico y ácido hidroxicinámico), un hidrocarburo (azuleno) y diez compuestos, aún sin identificar, pero presentes en el exudado.

Con los resultados obtenidos, no existe ningún compuesto al que se le pueda atribuir la acción de ser el responsable de la inhibición. Al igual que cuando se analiza los compuestos fenólicos totales, S-1 es en el que mayor cantidad se cuantifica. Estos compuestos ejercen efecto alelopático sobre la germinación de herbáceas, como se ha demostrado cuando se ha ensayado con ellos; pero de este estudio no podemos concluir que la presencia de estos en el suelo sea la única causa de la inhibición. Existen suelos de los meses correspondientes a la estación de verano donde la presencia de estos compuestos es patente y sin embargo no se detecta inhibición en la germinación.

Por otra parte la inhibición que muestran estos suelos podría deberse a la interacción de varios compuestos. Como muestra este estudio, el ácido cinámico y el ácido hidroxicinámico inhiben la germinación y afectan al tamaño de la raíz y las plántulas cuando se ensayan con ellos aisladamente, pero cuando actúan en presencia de otros compuestos potencian su acción negativa.

Pero además, probablemente otros factores ambientales, afectan a la actividad de estos compuestos, potenciándola o disminuyéndola. Se ha demostrado que las condiciones climáticas a las que puede estar sometida una especie, altera la capacidad fitotóxica de los compuestos implicados en la alelopatía influyendo en su síntesis (Chaves y Escudero, 1999; Baldwin, 1999), y pudiendo afectar también a su actividad. Así se han encontrado ácidos fenólicos que aumentan su fitotoxicidad al someterlos en ambientes con temperaturas e intensidades lumínicas altas (Glass, 1976; Hauson y col., 1983; Bhowmik y Doll, 1983; Einhellig y Eckrich, 1984). En trabajos realizados con *Cistus ladanifer*, compuestos como ácido ferúlico, hidroxicinámico, oxálico, metilmalónico, p-anísico, 3-hidroxibutírico y azuleno aumentan la capacidad de inhibición de la germinación bajo condiciones de fotoperiodo corto. Sobre el nacimiento de cotiledones, ácido hidrocínámico, metilmalónico, p-anísico, 3-hidroxibutírico, butírico y azuleno presentan una inhibición significativamente mayor bajo altas temperaturas y fotoperiodo largo. Sobre el desarrollo de las plántulas los resultados sugieren la posibilidad de que el fotoperiodo largo activa la capacidad inhibidora de la mayoría de estos compuestos presentes en el exudado (Alías, 2002; Chaves y col., 2002).

Es preciso destacar la variabilidad en la cantidad detectada tanto entre puntos de muestreo (variación espacial) como entre los meses (variación temporal). En estudios

realizados por otros autores (Inderjit y Dakshini, 1996; Inderjit, 1998) se pone de manifiesto igualmente la variación del contenido fenólico en suelo con respecto a la estación anual y lugar de muestreo. Por ejemplo, el floroglucinol varía en suelo de un lugar a otro desde 5 a  $10^{-3}$  mM (Inderjit y Dakshini, 1996).

Por tanto, es difícil determinar la concentración bioactiva exacta de estos compuestos en suelo bajo condiciones naturales, ya que pueden descomponerse, ser absorbidos por semillas y raíces, lavados, fijados a otros compuestos de los suelo o expuestos a la intervención microbiana (Dalton y col., 1983; Rice 1984; Blum y Shafer, 1988; Cheng, 1995). La concentración a la que son activos estos compuestos posiblemente esté muy por encima de la que se ha detectado en el suelo, como se ha comprobado y discutido en este trabajo debido a la interacción con los suelos. Probablemente no se requiera una concentración muy alta en el suelo para que ejerza su efecto alelopático, además, cada vez que llueve o caen hojas se van incorporando continuamente compuestos, efecto que puede resultar potenciado si la planta es perenne como es el caso de *Cistus ladanifer*.

El método de liberación de estos compuestos alelopáticos al medio puede seguir varias rutas. Una de ellas es la lixiviación producida por las lluvias (Inderjit y Dakshini, 1996), pero para ello es necesario que se produzcan precipitaciones regulares durante todo el año. Otro método es la liberación de estos compuestos durante la descomposición de los restos de las hojas. Bioensayos de Jaderlund y col., 1996; Huang y col., 1999, sugieren que los compuestos que afectan negativamente a la germinación y desarrollo de plántulas son solubles en agua y que podrían pasar al suelo por las lluvias o los primeros estadios de descomposición de las hojas. La alternancia de precipitaciones observada durante todo el año de muestreo propia del área mediterránea y la presencia de mayor contenido de compuestos fenólicos en los meses de mayor precipitación, apoyan la hipótesis de que las lluvias puede ser el factor principal de incorporación de compuestos al suelo.

Se ha cuantificado la variación de estos flavonoides en las hojas de *C. ladanifer*, así como los factores que inducen su síntesis (Chaves y Escudero, 1999, Chaves y col., 1993, 1997) demostrando que presentan marcadas variaciones estacionales. La máxima

concentración de estos compuestos en las hojas se produce durante el verano. La vía de incorporación de estos flavonoides al suelo no ha sido establecida, pero podría considerarse que fuese por lluvia. El arrastre de estos compuestos por precipitación, podría explicar la presencia de 3-*O*-metilkampferol y 3,7-di-*O*-metilkampferol mayoritariamente en Septiembre, ya que en el exudado su máxima concentración se obtiene en verano. En esta estación puede aparecer en el exudado de las hojas más de 30mg de flavonoides / g de peso seco de hoja, representando estos dos flavonoles más del 70% de los flavonoides. Aunque el verano no es la estación de lluvias, a finales de Junio y principios de Agosto, se produjeron, durante el año de experiencia, tormentas que pueden ser suficientes para arrastrar estos flavonoides al suelo (60mm en junio y 50mm en agosto, Centro Meteorológico Territorial en Extremadura, Instituto Nacional de Meteorología) .

La variabilidad que aparece entre los puntos de muestreos en la inhibición de la germinación y la falta de homogeneidad en la distribución de estos compuestos en el suelo pone de relieve la necesidad de profundizar en este estudio. Los datos en tiempo de permanencia en suelo son esenciales para determinar con exactitud la actividad alelopática de cualquier especie así como caracterizar otros factores ambientales, ya sean bióticos o abióticos, que inciden en la actividad alelopática de los compuestos detectados en el suelo.

En resumen, se puede afirmar, que en los suelos asociados a *C. ladanifer* se produce inhibición en la germinación de herbáceas, que los compuestos presentes en el exudado, de los cuales se ha demostrado que presentan actividad alelopática, pasan al suelo y ejercen su efecto en él, aunque hay que destacar que su mera presencia no implica inhibición, sino que es un cúmulo de factores que pueden ser tanto físicos, como químicos o biológicos. Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de relieve la necesidad de seguir profundizando en este estudio. Por ello, el interés de este trabajo no radica en determinar la cantidad de estos *aleloquímicos* en el suelo, sino de establecer la presencia de estos compuestos en el medio donde pueden ejercer su actividad, apoyando el potencial alelopático que puede presentar *Cistus ladanifer* y que

se hipotetizaba cuando se ensayó con el exudado de sus hojas (Chaves y Escudero, 1997).

## **FUNCIÓN ANTIHERBÍVORO.**

En los últimos años, los aceites esenciales han recibido especial atención como compuestos bioactivos potencialmente útiles contra insectos. La actividad insecticida de estos aceites ha sido demostrada contra cucarachas (Ahmad y col., 1995; Ngoh y col., 1997), mosquitos (Watanabe y col., 1993), garrapatas (Lwande y col., 1993) y moscas domésticas (Singh y Singh, 1991). Bultman y col. (1979) analizó 42 árboles tropicales africanos y sugirió que *aleloquímicos* volátiles de la madera podían ser los responsables más importantes de la resistencia natural de estas especies a *Coptotermes formosanus* Shiraki.

Recientemente, se ha demostrado, que dos flavonoides, aislados de *Alliaria petiolata*, presentan dos mecanismos distintos para inhibir la alimentación de diferentes *estadios* larvarios de *Pieris napi* oleracea. El flavonoide Alliarinoside inhibe la alimentación de estadios tempranos a través de un mecanismo feedback después de la ingestión (Frazier, 1991) mientras que Isovitexina-6-O- $\beta$ D-glucopiranosido actúa directamente como un repelente de alimentación que es percibido por los receptores gustativos del aparato bucal de larvas en estadios tardíos (Alan y col., 2001).

La actividad alimenticia empieza con el primer mordisco, seguido de tragar y continuar con la digestión. Esto sugiere que se denomine como supresores a aquellos compuestos que impiden la actividad de morder, y disuasorios a aquellos que impiden que el herbívoro vuelva a comer (Arinafril y Suwandi, 2001). Consecuentemente, una de las partes del herbívoro implicada en la acción de la alimentación serán los músculos esqueléticos faciales. Teniendo en cuenta que la actividad  $Ca^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico tiene un papel predominante en la relajación del músculo esquelético, estudiar el efecto de los flavonoides del exudado de *C. ladanifer* en la actividad de esta

enzima, puede contribuir a conocer la acción de los mismos como supresores o disuasorios de la alimentación, implicando con ello una función antiherbívoro

Los datos bibliográficos referentes a la interacción de flavonoides con  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa son escasos. Shoshan y MacLennan (1981) muestran que en vesículas de RS o en la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa purificada, quercetina inhibe las reacciones del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  incluyendo transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP, síntesis de ATP acoplado al eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y el intercambio ATP- $\text{P}_i$ , además de inhibir la velocidad de intercambio de ATP-ADP y la formación del estado  $\text{E}_2\text{-P}$ . En sus estudios para descubrir el mecanismo por el que este flavonoide inhibe el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , estos autores concluyen que el mayor efecto de quercetina es estabilizar la conformación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -Enzima que es capaz de aceptar un grupo fosfato del ATP pero éste no puede energizar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de las vesículas ni puede ser donado de nuevo al ADP.

En este trabajo se ha puesto de manifiesto que la exposición de vesículas de RS al exudado de hojas y tallos fotosintéticos de *Cistus ladanifer* y a seis flavonoides, tanto mezclados como cada uno de ellos por separado (apigenina, 4'-*O*-metilapigenina, 7-*O*-metilapigenina, 3-*O*-metilkampferol, 3,4'-di-*O*-metilkampferol y 3,7-di-*O*-metilkampferol), contenidos en el mismo exudado (Chaves y col., 1998), provoca una alteración de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.

Cuando se estudió el efecto del exudado sobre la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en vesículas permeabilizadas se comprobó que esta actividad era inhibida, llegando a ser del 70% y presentando una  $\text{K}_{0.5}$  de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Para determinar qué componentes del exudado son los que presentan este efecto se ensayó con una mezcla de compuestos que son mayoritarios en el exudado y que son los flavonoides, comprobándose que esta mezcla también inhibía esta actividad llegando a una inhibición máxima del 60% y presentando una  $\text{K}_{0.5}$  de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Este resultado sugirió realizar el estudio de cada uno de los flavonoides por separado.

La inhibición de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, en vesículas permeabilizadas, producida por apigenina, 3-*O*-metilkampferol y 3,4'-di-*O*-metilkampferol es un proceso rápido, siendo menor a 5 minutos. Por la cinética que presentan estos flavonoides en el

proceso de inhibición, se ha deducido que el mecanismo se realiza mediante una interacción simple Enzima-Flavonoide. Las medidas de fluorescencia intrínseca de RS corroboran este hecho. Los ensayos realizados con diferentes concentraciones de RS sugieren que esta inhibición se lleva a cabo mediante la interacción del flavonoide con sitios de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa accesible desde la fase acuosa. Cabe destacar la baja concentración a la que estos compuestos son efectivos, presentando una  $K_{0,5}$  de inhibición de  $20\mu\text{M}$  para apigenina y de  $60\mu\text{M}$  para 3-*O*-metilkampferol y 3,4'-di-*O*-metilkampferol mostrando una inhibición máxima del 70% para apigenina, 40% para 3-*O*-metilkampferol y 60% para 3,4'-di-*O*-metilkampferol. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Shoshan y MacLennan, 1981) los cuales calculaban una  $K_{0,5}$  de  $10\mu\text{M}$  para el flavonoide quercetina. El resto de flavonoides no presentaban este efecto de inhibición cuando el ensayo se realizaba en presencia de calcimicina.

En titulaciones con  $\text{Ca}^{2+}$  realizadas en este trabajo se ha comprobado que en este proceso de inhibición, apigenina no compite con  $\text{Ca}^{2+}$  por los sitios de alta afinidad de  $\text{Ca}^{2+}$  de la enzima, en tanto que 3-*O*-metilkampferol y 3,4'-di-*O*-metilkampferol, a una concentración de  $80\mu\text{M}$  de flavonoide, incrementan la  $K_{0,5}$  de activación por  $\text{Ca}^{2+}$  de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa desde  $0,1\mu\text{M}$  a  $0,2\mu\text{M}$ . Esto sugiere que estos flavonoles desplazan a la enzima hacia el estado  $E_2$  aumentando el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  basal en el músculo, y en consecuencia, aumentando el tono muscular.

Además, se comprobó que cuando el exudado se expone a vesículas de RS perfectamente selladas esta actividad resulta incrementada. Puesto que en vesículas de RS selladas la actividad ATPasa se encuentra fuertemente inhibida por el gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que se establece a través de la membrana de RS, este resultado sugiere que se produce un notable aumento de la permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  de las membranas de RS por acción del exudado. Para lo cual se midió el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en vesículas de RS en presencia del exudado, comprobándose que  $2,16\text{mg/ml}$  de exudado provocan una disminución en la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  por estas vesículas de casi un 70%. Por esto, se pasó a comprobar el efecto de cada uno de los flavonoides sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en vesículas de RS.

La exposición de vesículas de RS perfectamente selladas (ausencia de calcimicina), a 4'-*O*-metilapigenina, 7-*O*-metilapigenina y 3,7-di-*O*-metilkampferol presenta un proceso de estimulación de la actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, el cual puede racionalizarse en términos de un aumento de la permeabilidad de Ca<sup>2+</sup>, produciéndose una disipación del gradiente de Ca<sup>2+</sup>, bien por alteración de la bicapa lipídica o por interacción con canales de Ca<sup>2+</sup>, o en términos de producir un efecto desacoplante en la enzima, impidiendo la captura de Ca<sup>2+</sup> sin interrumpir la actividad ATPasa. En este sentido Shoshan y MacLennan (1981), han demostrado que el flavonoide quercetina produce una disminución de la capacidad de transporte de Ca<sup>2+</sup> de vesículas de RS. La disminución de los niveles de Ca<sup>2+</sup> acumulados cuando estas vesículas hidrolizan ATP en presencia de 4'-*O*-metilapigenina, 7-*O*-metilapigenina ó 3,7-di-*O*-metilkampferol no confirma la acción de inhibición del transporte de Ca<sup>2+</sup> dependiente de ATP a través de estas membranas, sólo se puede afirmar que se produce casi un 30% menos de acumulación de Ca<sup>2+</sup> en el interior de las vesículas. Para comprobar si esta disminución en la acumulación de Ca<sup>2+</sup> es debida o no a un efecto desacoplante por parte de estos flavonoides se realizaron ensayos de radioactividad en ausencia y presencia del 3,7-di-*O*-metilkampferol, para ello se midió el transporte de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> por RS en presencia de oxalato (resultados no mostrados). Los resultados de este experimento mostraron que 3,7-di-*O*-metilkampferol no inhibe el transporte de Ca<sup>2+</sup> dependiente de ATP, y por tanto lo que este flavonoide debe provocar es una disipación del gradiente de Ca<sup>2+</sup>, bien por alteración de la bicapa lipídica o por interacción con canales de Ca<sup>2+</sup>. Teniendo en cuenta que en 2,16mg/ml de este exudado hay 0,98mg/ml de 4'-*O*-metilapigenina, 7-*O*-metilapigenina y 3,7-di-*O*-metilkampferol podemos decir que la inhibición de acumulación de Ca<sup>2+</sup> por el exudado se debe además de por estos flavonoides por otros compuestos presentes en el exudado. Las medidas de fluorescencia intrínseca de RS en presencia de estos flavonoides confirman el hecho de la existencia de una interacción de estos flavonoides con la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa.

Estos resultados muestran una importante transcendencia en la fisiología de la contracción muscular, ya que las fibras musculares sometidas a concentraciones micromolares de apigenina, 4'-*O*-metilapigenina, 7-*O*-metilapigenina, 3-*O*-metilkampferol, 3,4'-di-*O*-metilkampferol y/o 3,7-di-*O*-metilkampferol verían

modificada su capacidad de contracción-relajación por alteración de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de RS, ya que esta es la proteína responsable de la relajación muscular al ser la encargada de retirar el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático (Fleischer y Inui, 1989). En consecuencia, los flavonoides del exudado de *C. ladanifer* son potentes agentes bioactivos en impedir la relajación del músculo esquelético y de ellos los más potentes en producir este daño son apigenina, 3,4'-di-*O*-metilkampferol y 3,7-di-*O*-metilkampferol.

Los resultados presentados en esta memoria son resultados obtenidos “in vitro” que para ser extrapolados y representar un modelo “in vivo”, sería necesario la realización de más experimentos, como estudiar la metabolización de estos compuestos antes de llegar al músculo. Pero a pesar de ello, los flavonoides agliconas son hidrofóbicos por naturaleza y pueden ser transportados a través de las membranas por difusión pasiva (Aisling y Nora, 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo, con liposomas de lecitina de huevo muestra que los flavonoides presentes en el exudado de *C. ladanifer* particionan fuertemente en la bicapa lipídica, pudiendo alcanzar rápidamente con ello, el espacio intracelular y penetrar dentro de tejidos vulnerables por medio de difusión lipídica. Por ello, se puede deducir que parte de estos flavonoides pueden ser asimilados en el tracto bucal debido su carácter hidrofóbico. Consecuentemente, no es necesaria la incorporación de estos flavonoides al torrente sanguíneo, permitiéndoles escapar de la potente acción del sistema de detoxificación. Así, la masticación por herbívoros de hojas de *C. ladanifer*, conllevaría la incapacidad de relajación del músculo esquelético facial del animal que lo hubiera ingerido. Pero además esta falta de relajación o tensión muscular sería inmediata, pudiendo provocar un rechazo por parte del herbívoro a seguir comiendo. Por tanto, el defecto fisiológico que estos flavonoides pueden causar sobre animales, podría conferir a la planta que los produce, *Cistus ladanifer*, una ventaja selectiva frente a las demás, pudiendo actuar estos compuestos como un mecanismo de defensa contra herbívoros.

La dosis umbral para que estos flavonoides sean efectivos, puede ser estimada para el volumen total del tejido expuesto a los flavonoides en la boca del herbívoro (aproximadamente de 10ml para un conejo adulto) y del total de flavonoides del exudado de las hojas de *C. ladanifer*. Como la composición del exudado presenta una

fuerte variación estacional (Chaves y col., 1997; y presente estudio), esta dosis va a depender de la estación en que el animal tome las hojas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las hojas jóvenes de *C. ladanifer* presentan una concentración máxima de flavonoides en verano, siendo de unos 30mg de flavonoides por gramo de hoja seca, y un mínimo en invierno de unos 7mg de flavonoide por gramo de hoja seca. Teniendo en cuenta una  $K_{0.5}$  de inhibición de actividad  $Ca^{2+}$ -ATPasa por la mezcla de flavonoides igual a 15 $\mu$ g/ml, una relación de 1,8 Peso seco/Peso fresco y un volumen aproximado de 10ml de tracto bucal expuesto, sólo serán necesarios 9mg en verano ó 36mg en invierno de hojas jóvenes frescas para producir disfunción en la relajación del músculo.

La composición del exudado además de presentar una variación cuantitativa de flavonoides a lo largo del año, también presenta una variación cualitativa. Teniendo en cuenta que 3,7-di-*O*-metilkampferol es el flavonoide más efectivo de todos los estudiados, cabe destacar que este compuesto es el flavonoide mayoritario en todas las estaciones y grupos, constituyendo una proporción del 60% en hojas y más de 45% en tallos. Presenta un mínimo en invierno aumentando en primavera para llegar a su máximo en verano y volver a descender en otoño. Tanto en las hojas jóvenes, como en viejas y tallos se observa que la cantidad de este flavonide es mayor en localidades con mayor temperatura y menor precipitación mostrando entre más de un 3% de diferencia entre grupos durante el verano y de más de un 6% durante el otoño en hojas jóvenes. Por todo ello, el aumento en concreto de este flavonoide durante el verano y la diferencia entre grupos, implicaría, que justamente cuando las condiciones son más adversas para el crecimiento, la planta presenta una mejor defensa contra herbívoros.

Para pequeños herbívoros como insectos, la cantidad de hojas de *C. ladanifer* necesaria para producir el mismo efecto, sería menor, siendo proporcional a la talla de la boca, pues la  $Ca^{2+}$ -ATPasa del músculo esquelético de insectos muestra gran homología funcional y estructural con la  $Ca^{2+}$ -ATPasa del músculo esquelético de conejo (Andersen, 1989).

Otra característica a tener en cuenta, con respecto a su efectividad ante los herbívoros, son las condiciones ambientales en las que se encuentra esta especie, pues no será la misma cantidad umbral necesaria para producir el efecto en una localidad sometida a temperaturas más altas y menor precipitación, que otra con temperaturas más bajas y mayor precipitación. Como se demuestra en este trabajo, el exudado de *Cistus ladanifer* varía de una localidad a otra dependiendo de las condiciones climáticas a las que esté sometida. Así en verano si el herbívoro se alimenta de hojas jóvenes, viejas o tallos, la cantidad a ingerir para sufrir los efectos, será menor en una de las localidades del Grupo I (altas temperaturas y baja precipitación) que en una del Grupo II (bajas temperaturas y alta precipitación), concretamente el herbívoro necesitaría tomar 7,8mg de hojas jóvenes frescas si estuviera en una de las localidades del Grupo I y 9mg si estuviera en una de las localidades del Grupo II.

Los resultados obtenidos de los ensayos de *Galleria mellonella* muestran que la fracción de flavonoides contenidos en el exudado puede llegar a ser tan tóxica para el insecto que la coma, que puede producirle la muerte. La concentración efectiva a la que estos flavonoides son activos es de 2mg de flavonoides por gramo de dieta, consiguiéndose con ella una mortalidad del 60% de las larvas. Cabe destacar que la concentración real a la que los flavonoides se encuentran en las hojas jóvenes de *C. ladanifer* es de alrededor de 11mg/g de hoja fresca durante otoño, de 4mg/g durante invierno y de 7mg/g durante primavera, sin que haya diferencia significativa entre los grupos, y de 19mg/g de hoja fresca durante verano en localidades del Grupo I y 16mg/g de hoja fresca durante verano en localidades del Grupo II. Consecuentemente, si *C. ladanifer* fuera comida por un insecto morfológica y fisiológicamente similar a *Galleria mellonella*, *C. ladanifer* se encontraría protegida durante todo el año ante el ataque de este insecto, y además, como se ha cuantificado en este trabajo, su protección aumenta en verano cuando precisamente el ataque de insectos puede ser más frecuente.

De este estudio no podemos relacionar esa muerte con la inhibición que producen los flavonoides sobre la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, pero otros ejemplos en la bibliografía, muestran que el flavonoide quercetina además de inhibir la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, (Shoshan y MacLennan, 1981) inhibe el crecimiento de determinados insectos

(Shaver y Lukefahr, 1969). Otros trabajos, muestran que glucósidos de apigenina que se encuentran en el floema de algunas especies, modifican la alimentación y el crecimiento de *Nilaparvata lugens* (Grayer y col., 1994). Cuando este insecto fue expuesto a tallos de arroz con altos niveles de flavonoides, su peso disminuyó y cuando fue alimentado con una dieta artificial que contenía 250 ó 500µg/ml, las larvas murieron después de 10 ó 5 días, respectivamente (Stevenson y col., 1996). Otros flavonoides, como kampferol y quercetin inhiben la alimentación de *Scolytus multistriatus* (Norris, 1977).

La relación estructura-actividad de estos compuestos no está aún clara, e incluso los resultados de diferentes estudios son contradictorios, algunas investigaciones muestran que la metoxilación y la sustitución por grupos hidroxilos de los flavonoides resultan en una disminución de la actividad (Elliger y col., 1980; Lane y col., 1985), mientras que otros trabajos muestran que flavonas con un grupo hidroxilo o metoxi son disuasorios de *Spodoptera exempta* pero las flavonas metiladas son aún más activas sobre *Spodoptera littoralis* que las hidroxiflavonas ( Simmonds, 2001).

Por otra parte, se puede caracterizar a las sustancias disuasorias (sabor amargo, venenos, mal olor, sustancias antinutricionales o tóxicas), que son esencialmente metabolitos secundarios, como una defensa química constitutiva o inducida (Ohgushi, 1992). Las defensas constitutivas dotan a la planta con protección permanente, mientras la defensa inducida es provocada sólo cuando la planta es atacada. A su vez, Leitao y col. (1999) caracterizan esta defensa química como cuantitativa o cualitativa. Así, distinguen entre la defensa cuantitativa como los taninos que reducen la palatabilidad o asimilación de nutrientes, y defensa cualitativa como compuestos que son muy tóxicos, incluso letales, después de que una pequeña cantidad sea consumida. Los ejemplos de defensa cualitativa incluyen compuestos como glucosinolatos (Louda y Mole, 1991), furanocumarinas (Berenbaum, 1991), glicósidos cianogénicos (Seigler, 1991) y alcaloides (Robinson, 1979). La defensa cuantitativa es considerada más costosa para la planta porque se requiere mayor cantidad de los compuestos para detener a los herbívoros. En este tipo de defensa, la mayoría de estos compuestos son fenoles, como los flavonoides que se han encontrado en tres géneros de la familia Asteraceae (Bohm y

Fong, 1990), y en los géneros *Agave* (Parmar y col., 1992), *Tillandsia* (Cabrera y col., 1995), y *Aeonium* (Stevens y col., 1995).

Aunque hace falta un estudio más profundo sobre la acción antiherbívoro de los constituyentes del exudado de *Cistus ladanifer*, sí podemos hacer una primera clasificación de la fracción de flavonoides del exudado. Siguiendo la catalogación de estos autores, *Cistus ladanifer* presentaría una defensa constitutiva, puesto que estos flavonoides están presentes en sus hojas durante todo el año, pero a la vez sería cualitativa, porque como se demuestra en este trabajo, estos flavonoides llegan a ser letales para larvas de *G. mellonella*.

En resumen, podemos concluir que los compuestos derivados del metabolismo secundario contenidos en el exudado de las hojas de *Cistus ladanifer* pueden desempeñar diferentes funciones, y en concreto los flavonoides, pueden actuar como filtro de luz ultravioleta (Chaves, 1994), como *aleloquímicos*: inhibiendo el desarrollo de plantas herbáceas, y como agentes antiherbívoros. Puesto que las plantas no pueden elegir sus competidores, la síntesis de compuestos multifuncionales podría considerarse como una estrategia adaptativa, dotando a las especies con una mayor capacidad competitiva.

## **CONCLUSIONES**

---

De la realización de este trabajo podemos concluir que:

- En el exudado de las hojas de *Cistus ladanifer* se han identificado los siguientes compuestos: ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido butírico y/o metilpropionato, ácido 3-hidroxi-butírico, ácido hidroxicinámico, ácido p-anísico, ácido cinámico, azuleno, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido ferúlico.
- Ninguno de los flavonoides presentes en el exudado de *C. ladanifer* afecta directamente a la germinación y nacimiento de cotiledones, sin embargo inhiben el tamaño de la raíz y cotiledones, y retrasan la germinación y nacimiento de cotiledones, siendo los flavonoides responsables 4'-*O*-metilApigenina, 3,7-di-*O*-metilKampferol y la mezcla de 3-*O*-metilKampferol y 3,7-di-*O*-metilKampferol.
- Asimismo, de los compuestos identificados en el exudado de *C. ladanifer*, el ácido ferúlico, ácido hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, ácido 3-hidroxi-butírico y azuleno no afectan a la germinación directamente, pero sí afectan negativamente al desarrollo de las plántulas. El ácido cinámico y el ácido hidroxicinámico afectan muy negativamente al tamaño de la raíz y cotiledones, el ácido cinámico también inhibe la germinación y el nacimiento de cotiledones, el ácido hidroxicinámico sólo el nacimiento de cotiledones. El metil-propionato y ácido butírico son los compuestos que más inhiben la germinación, nacimiento de cotiledones y el desarrollo de las plántulas incluso a concentraciones muy bajas. Por otra parte, se ha demostrado que la acción conjunta de estos compuestos muestra un efecto sinérgico en su acción negativa tanto en la germinación como desarrollo de las plántulas y la presencia del ácido cinámico e hidroxicinámico potencian la acción de los otros *aleloquímicos*. Pero además, la interacción que se produce entre estos compuestos y el suelo, conlleva a una mayor actividad negativa de los mismos sobre la germinación, deduciéndose de estos resultados que no es necesaria una concentración alta de los mismos para que sean activos.
- Los suelos asociados a *C. ladanifer* presentan una clara inhibición sobre semillas de *Rumex crispus*. Esto demuestra que el potencial alelopático de esta especie no solo se encuentra en sus hojas sino también en los suelos asociados.

- En este estudio se pone de manifiesto la presencia en suelos asociados a jarales de compuestos presentes en el exudado de *C. ladanifer*. Entre estos compuestos, se identificaron varios *aleloquímicos* como ácido hidroxibenzoico, ácido cinámico, ácido hidroxicinámico, Apigenina, 3-*O*-metilKampferol, 3,7-di-*O*-metilKampferol y azuleno. Se ha observado que la composición en el suelo de estos *aleloquímicos* varían cualitativa y cuantitativamente a lo largo del año. El mecanismo de transporte de estos compuestos desde las hojas hasta el suelo no se ha estudiado en este trabajo, pero se intuye que puede producirse por lixiviación de las lluvias, hecho que se pretende demostrar en trabajos posteriores.
- La efectividad de estos *aleloquímicos* en el suelo, no depende única y exclusivamente de su presencia en este medio, sino de otros factores aún no determinados que pueden ser abióticos como temperatura, luz, nutrientes, y/o bióticos como la interacción con otros organismos tales como: hongos y/o bacterias. Con la determinación de estos factores se podría afirmar que una de las funciones que puede desempeñar el exudado de *C. ladanifer* es la de actuar como agente alelopático, inhibiendo la germinación y desarrollo de plántulas herbáceas que compiten con esta especie por el mismo espacio. Este hecho ofrecería claras ventajas al facilitar la colonización de esta especie.
- Los flavonoides Apigenina, 3-*O*-metilKampferol y 3,4'-di-*O*-metilKampferol inhiben la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y consecuentemente el transporte activo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de membranas de retículo sarcoplásmico acoplado a ella. Esta inhibición es debida a una modificación de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa provocada por la interacción simple con estos flavonoides, siendo esta interacción a través de la fase acuosa. Además, se ha demostrado que esta inhibición de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa por Apigenina no altera la dependencia de esta actividad con  $\text{Ca}^{2+}$  mientras que si resulta alterada por 3-*O*-metilKampferol y 3,4'-di-*O*-metilKampferol. 4'-*O*-metilApigenina, 7-*O*-metilApigenina y 3,7-di-*O*-metilKampferol altera el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado a través de vesículas de retículo sarcoplásmico. La disminución de los niveles en estado estacionario de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulados cuando estas vesículas hidrolizan ATP en presencia de 4'-*O*-metilApigenina, 7-*O*-metilApigenina y 3,7-di-*O*-metilKampferol,

en condiciones en las que no hay inhibición significativa de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, es casi de un 30%. Los estudios de extinción de fluorescencia intrínseca por los flavonoides estudiados confirman que existe una interacción directa de estos flavonoides con la enzima a través de la fase lipídica.

- Por último, se puede concluir que debido a los efectos negativos que estos flavonoides pueden producir sobre los animales que los ingieran, como se ha observado en ensayos preliminares con *Galleria mellonella*, la presencia de estos flavonoides en hojas y tallos fotosintéticos de *Cistus ladanifer* prestará a este arbusto un mecanismo de protección frente a posibles herbívoros, siendo además un mecanismo que hace a la especie más competitiva frente a otras especies que no sintetizan dichos compuestos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- ABOU-ZAID, M.M., BENINGER, C.W. ARNASON, J.T. y NOZZOLILLO, C., 1993. The effect of one flavone, two catechins and four flavonols on larval growth and mortality of *Ostrinia nubilalis* (Hubner). *Biochemical Systematics and Ecology* **21**: 415-420
- ADAMS, N.R. (1995). *J. Anim. Sck.* **73**: 1509-1515.
- AHMAD, F.B.H., MACKEEN, M.M., ALI, A.M., MASHIRUN, S.R. y YAACOB, M.M. (1995). Repellency of essential oils against the domiciliary cockroach, *Periplaneta americana*. *Insect Science and its Application* **16**: 391-393.
- AHMED, M. y WARDLE, D.A. (1994). Allelopathic potential of vegetative and flowering ragwort (*Senecio jacobaea* L.) plants against associated pasture species. *Plant Soil* **164**: 61-68.
- AISSLING AHERNE, S. y NORA M. O'BRIEN, M.S. (2002). Dietary flavonol: chemistry, food content and metabolism. *Nutrition* **18**: 75-81.
- ALÍAS, J.C. (2002). Efecto de distintas variables ecológicas en la actividad de los compuestos alelopáticos de *Cistus ladanifer*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Badajoz, España.
- ALLEN, S.E. (1989). Chemical analysis of ecological materials. *Black-Well Scientific Publishers, London*.
- ANDERSEN, A.N. (1989). How important is seed predation to recruitment in stable populations of long-lived perennials? *Oecologia* **81**: 310-315.
- APPEL, H.M. (1993). Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation. *J. Chem. Ecol.* **19**: 1521-1552.
- ARAVIND, L., GALPERIN, M. y KOONIN, E.V. (1998). The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 127-129.
- ARINAFRIL y SUWANDI, 2001. Use of plant extracts as an environmentally friendly pest management methods. SEAG Symposium. Los Baños, The Philippines.
- BAAS, W.J. (1989). Causes and Consequenses of variation in growth rate and productivity of higher plants, pp: 313-340. In H. Lambers, M.L. Cambridge, H. Konings y T.L. Pons (eds). *SPB Academic Publishing, The Hague*.
- BALAKUMAR, T., VICENT, H.B., y PALIWAL, K. (1993). On the interaction of UV-B radiation (280-315 nm) with water stress in crop plants. *Physiol. Plantarum* **87**: 217-222.

- BALLESTER, A., VIEITEZ, A.M. y VIEITEZ, E. (1979). The allelopathic potential *Erica australis*, L. and *E. arborea*, L. *Bot. Gaz.* **140**(4): 433-436.
- BALLESTER, A., VIEITEZ, A.M. y VIEITEZ, E. (1982). Allelopathic potential of *Erica vagans*, *Calluna vulgaris*, *Daboecia cantabrica*. *J. Chem. Ecol.* **8**: 851-857.
- BANKOVA, V., IVANOVA, P., CHRISTOV, R., POPOV, S. y DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.T. (1995). Secondary metabolites of *Ceratophyllum demersum*. *Hydrobiologia* **315**: 59-61.
- BARBERÁ, C. (1989). Pesticidas Agrícolas, pp: 603-625. *Ed. Omega, Barcelona*.
- BARUAH, N.C., SARMA, J.C., BARUA, N.C., SARMA, S. y SHARMA, R.P. (1994). Germination and growth inhibitory sesquiterpene lactones and a flavone from *Tithonia diversifolia*. *Phytochemistry* **36**: 29-42.
- BELL, E.A. (1980). *The possible significance of secondary compounds in plants*, pp: 11-21, in E.A. Bell and B.V. Charlwood (eds.). *Secondary plant products. Springer-Verlag, New York*.
- BELLOT, F. (1978). El tapiz vegetal de la Península Ibérica. H. Blume (ed.), *Madrid*.
- BERENBAUM, M.R. (1991). Chapter 6 in Rosenthal, G.A. and Berenbaum, M.R. (eds.). *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites. Academic Press, San Diego, CA*.
- BERNAYS, E.A. y CHAPMAN, R.F. (1994). *Host Plant Selection by Phytophagous Insects. Chapman y Hall, New York*.
- BERNAYS, E.A. (2000). XXI-International Congress of Entomology, Brasil, Agosto 20-26, 2000.
- BEWLEY, J.D. y BLACK, M. (1994). *Seeds: Physiology of development and germination. Second Edition. Plenum Press. New York*.
- BHOWMIK, P.C. y DOLL, J.D. (1983). Growth analysis of corn and soybean response to allelopathic effects of weed residues at various temperatures and photosynthetic photon flux densities. *J. Chem. Ecol.* **9**(8): 1263-1280.
- BIEBER, G.L. y HOVELAND, C.S. (1968). Phytotoxicity of plant materials on seed germination of crownvetch, *Coronilla varia*, L. *Agro. J.* **60**: 185-188.
- BIRDSALL, B., KING, R.W., WHEELER, M.R., LEWIS, J., C.A., GOODE, S.R., DUNLAP, B. y ROBERTS, G.C.K. (1983). Correction for light absorption in fluorescence studies of protein-ligand interactions. *Anal. Biochem.* **132**: 353-361.

- BLACK, C.A. (1973). Soil-plant relationships. *Scientific Publishers, Jodhpur, India*.
- BLUM, U. y REBBECK, J. (1989). Inhibition and recovery of cucumber roots given multiple treatments of ferulic acid in nutrient culture. *J. Chem. Ecol.* **15**: 917-928.
- BLUM, U. y SHAFER, S.R. (1988). Microbial populations and phenolic acids in soil. *Soil Biol. Biochem.* **20**: 793-800.
- BLUM, U., GERIC, T.M. y WEED, S.B. (1989). Effects of mixture of phenolic acids on leaf area expansion of cucumber seedling grown in different pH Portsmouth A1 soil materials. *J. Chem. Ecol.* **15**(10): 2413-2423.
- BLUM, U., WEED, S.B. y DALTON, B.R. (1997). Influence of various soil factors on the effect of ferulic acid on leaf expansion of cucumber seedling. *Plant and Soil* **98**: 111-130.
- BOHM, B.A. y FONG, C. (1990). The Nonpolar Flavanoids of Wilkesia and Argyrochloa. *Phytochemistry* **29**(4): 1175-1178.
- BOLAÑOS, M.M. y GUINEA, E. (1949). Jarales y jaras. *Ares, Madrid*.
- BOX, J.D. (1983). Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.* **17**: 511-525.
- BOYOUCOS, G.J. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agron. J.* **54**: 464-465.
- BRANDL, C.J., GREEN, N.M., KORCZAK, B. y MACLENNAN, D.H. (1986). Two Ca<sup>2+</sup>-ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* **44**: 597-607.
- BRAUN-BLANQUET, MOLINIER, R. y WARNER, H. (1941). Prodrome des groupements vegetaux. *Montpellier, Francia*.
- BREDERODE, J.V. y KOOTEN, H.V. (1983). In situ identification, localization and quantification of flavones in petals and green leaves of *Silene pratensis* grown under different light regimes. *Plant Cell Reports* **2**: 144-147.
- BREDERODE, J.V., GENDEREN, H.H.V. y BERENDSEN, W. (1982). Morphological effects of the flavone isovitexin in a non-glycosylating genotype of *Silene pratensis* (Caryophyllaceae). *Experientia* **38**: 929-931.

- BRUNN, S.A., MUDAY, G.K. y HARWORTH, P. (1992). Auxin transport and the interactions of phytohormones. *Plant Physiol.* **98**: 101-113.
- BRYANT, J.P., CHAPIN, F.S. y KLEIN, D.R. (1983). Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* **40**: 357-368.
- BRYANT, J.P., REICHARDT, P.B. y CLAUSEN T.P. (1992). Chemically mediated interactions between woody plants and browsing mammals. *J. Range Manage* **45**: 18-24.
- BULTMAN, J.D., BEAL, R.H. y AMPONG, F.F.K. (1979). Natural resistance of some tropical african woods to *Coptotermes formosanus*. *Shiraki. For. Prod. J.* **29**: 46-51.
- CABEZAS, J. y ESCUDERO, J.C. (1989). Estudio termométrico de la provincia de Badajoz. *Ed: Dirección general de investigación, extensión y capacitación agrarias. Badajoz, España.*
- CABRERA, G.M., GALLO, M. y SELDES, A.M. (1995). A 3,4,-Seco-cycloartane Derivative from *Tillandsia usneoides*. *Phytochem.* **38**(1): 139-153.
- CARBALLEIRA, A. (1980). Phenolic inhibitors in *Erica australis* L. australis and in associated soil. *J. Chem. Ecol.* **6**(3): 593-596.
- CASTANEDA, P., GARCÍA, M.R., HERNANDEZ, B.E., TORRES, B.A., ANAYA, A.L., y MATA, R. (1992). Effects of some compounds isolated from *Celendendron mexicanum* Standl (Euphorbiaceae) on seeds and phytopathogenic fungi. *J. Chem. Ecol.* **18**: 1025-1036.
- CEN, Y.P. y BORNMAN, J.F. (1993). The effect of exposure to enhanced UV-B radiation on the penetration of monochromatic and polychromatic UV-B radiation in leaves of *Brassica napus*. *Physiol. Plantarum* **87**: 249-255.
- CLUZEAU, R.S., PATTERNELLE, M.Ch. y LHOUTELLIER, Cl. (2000). Index phytosantaire, pp: 644-680. *Ed. ACTA.*
- COOPER, S.M. y OWEN-SMITH, N. (1986). *Effects of plant spinescence an large mammalian herbivores.* *Oecologia* **68**: 446-455.
- CUENDA, A., HENAO, F. y GUTIÉRREZ-MERINO, C. (1990). Distances between functional site of the (Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>)-ATPase from sarcoplasmic using Ca<sup>2+</sup> as a spectroscopic ruler. *Eur. J. Biochem.* **194**, 663-670.

- CUENDA, A., HENAO, F., NOGUES, M. y GUTIERREZ-MERINO, C. (1994). Quantification and removal of glycogen phosphorylase and other enzymes associated with sarcoplasmic reticulum membrane preparations. *Biochem. Biophys. Acta.* **1194**: 35-43.
- CHAVES, N. (1991). Estudio sobre la variación estacional de la composición del ládano en *Cistus ladanifer* L. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Badajoz, España.
- CHAVES, N. (1994). Variación cualitativa y cuantitativa de los flavonoides del exudado de *Cistus ladanifer* L. como respuesta a diferentes factores ecológicos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura, Badajoz, España.
- CHAVES, N. y ESCUDERO, J.C. (1997). Allelopathic effect of *Cistus ladanifer* on seed germination. *Fun. Ecol.* **11**: 432-440.
- CHAVES, N. y ESCUDERO, J.C. (1999). Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors, pp: 267-285. In Inderjit, K.M.N. Dakshini and F.L. Chester (eds.). *Principles and Practices in Plant Ecology. Allelochemicals Interactions CRC Press. Boca Raton, Florida.*
- CHAVES, N., ALÍAS, J.C., SOSA, T. y ESCUDERO, J.C. (2002). Alelopathic potential of *Cistus ladanifer* chemicals in response to variations of light and temperature. *Chemoecology* **12**: 139-145.
- CHAVES, N., ESCUDERO, J.C. y GUTIÉRREZ-MERINO, C. (1997). Role of ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exudate. *J. Chem. Ecol.* **23**(3): 579-603.
- CHAVES, N., ESCUDERO, J.C., y GUTIERREZ-MERINO, C. (1993). Seasonal variation of exudate of *Cistus ladanifer*. *J. Chem. Ecol.* **19**(11): 2577-2591.
- CHAVES, N., RÍOS, J.L., GUTIÉRREZ, C., ESCUDERO, J.C., y OLÍAS, J.M. (1998). Analysis of secreted flavonoids of *Cistus ladanifer* L. by high-performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *J. Chrom. A.* **799**: 111-115.
- CHEEKE, P.R. (1995). Endogenous Toxins and Mycotoxins in Forage Grasses and Their Effects on Livestock. *J. Anim. Sci.* **73**: 909-918.
- CHENG, H.H. (1995). Characterization of the mechanisms of allelopathic: Modeling and experimental approaches, pp: 132-141. In Inderjit, K.M.N. Dakshini and F.A. Einhellig (eds.). *Allelopathy: organisms, processes, and applications. American Chemical Society, Washington, DC.*

- CHOU, C.H. y KUO, Y.L. (1986). Allelopathic research of subtropical vegetatio in Taiwan. Allelopathic exclusion of understorey by *Leucaena leucophylla* (Lam) de Wit. *J. Chem. Ecol.* **12**: 1431-1448.
- CHU, C.H. y MULLER, C.H. (1972). Allelopathic mecanisms of *Arctostaphylos glandulosa* var. *zacaensis*. *Am. Midl. Natur.* **88**: 324-347.
- DALTON, B.R. (1989). Physicochemical and biological processes affecting the recovery of exogenously applied feluric acid from tropical forest soils. *Plant and Soil* **115**: 13-22.
- DALTON, B.R. (1999). The occurrence and behaviorof plant phenolic acids in soil environments and their potential involvement in allelochemical interference interactions: Methodological limitations in establishing conclusive proof of allelopathy, pp: 57-74. In Inderjit, K.M.N. Dakshini and F.L. Chester (eds.). *Principles and Practices in Plant Ecology. Allelochemicals Interactions CRC Press. Boca Raton, Florida.*
- DALTON, B.R., BLUM, U. y WEED, S.B. (1983). Allelophatic substance in ecosystems: Effectiveness of sterile soil components in altering recovery of ferulic acid. *J. Chem. Ecol.* **9**: 1185-1201.
- DALTON, B.R., WEED, S.B. y BLUM, U. (1987). Plant phenolic acids in soils: a comparison of extraction procedures. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **51**: 1515-1538.
- DAO, T.H. (1987). Sorption and mineralization of plant phenolic acids in soil, pp: 358-370. In G.R. Waller (ed.). *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry. American Chemical Society, Washington, D.C.*
- DATTA, S.C. y CHATTERJEE, A.K. (1980). Allelopathy in *Polygonum orientale*: inhibition of seed germination and seedling growth of mustard. *Comp. Physiol. Ecol.* **5**(2): 54 -59.
- DE LIÑÁN, C. (2000). Vadenecum de productos fitosanitarios y nutricionales, pp: 628-637. *Ed. Agrotécnicas.*
- DE MEIS, L. y VIANNA, A.L. (1979). Emergg interconversion by the Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPasa of the sarcoplsmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* **48**: 275-292.
- DEL MORAL, R. y MULLER, C.H. (1970). The allelopathic effects of *Eucalyptus camaldulensis*. *Am. Midl. Nat.* **83**: 254-282
- DEWICK, P.M. (1988). Isoflavonoids, pp: 125-209. In J.B. Harborne (ed.). *The Flavonoids. Advances in Research since 1980, Chapman and Hall, New York.*

- EAST, J.M. y LEE, A.G. (1982). Lipid selectivity of the calcium and magnesium ion dependent ATPase, studied with fluorescence quenching by brominated phospholipid. *Biochem.* **21**: 4144-4151.
- EBASHI, S. y LIPMANN, F. (1962). Adenosine triphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle. *J. Cell Biol.* **14**: 389-400.
- EINHELLIG, F.A. (2001). The physiology of allelochemical action: Clues and views. *First European Allelopathy Symposium*, pp: 3-25, Vigo, España. Junio 21-23, 2001.
- EINHELLIG, F.A. y ECKRICH, P.C. (1984). Interaction of temperature and ferulic acid stress on grain sorghum and soybeans. *J. Chem. Ecol.* **10**: 161-170.
- ELLIGER, C.A., CHAN, B.C. y WAISS, A.C.Jr. (1980). Flavonoid as larval growth inhibitors-structural factors governing toxicity. *Naturwissenschaften* **67**: 358-360.
- ESCUADERO, B. (1987). Modulación de la actividad (Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>)-ATPase y el transporte de Ca<sup>2+</sup> de retículo sarcoplásmico de músculo esquelético de conejo por anestésicos locales. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Badajoz, España.
- FEENY, P.P. (1970). Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology* **51**: 565-581.
- FERNANDEZ-SALGUERO, P., HENAO, F., LAYNEZ, J. y GUTIERREZ-MERINO (1990). Modulation of the sarcoplasmic reticulum (Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>)-ATPase by pentobarbital. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1022**: 33-40.
- FLEISCHER, S. y INUI, M. (1989). Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Biophysics and Biophysical Chemistry* **18**: 333-364.
- FRANCISCO-ORTEGA, J., ELLIS, R.H., GONZÁLEZ-FERIA, E. y SANTOS-GUERRA, A. (1994). Overcoming seed dormancy in ex situ plant germplasm conservation programmes: an example in the endemic *Argyranthemum* (Asteraceae: Anthemideae) species from the Canary Islands. *Biodi. Cons.* **3**: 341-353.
- FRANCO, J.A. (1971). Flora de Portugal (Continente e Açores) Vol I y II. Umbelíferae. *Lisboa, Portugal*.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1980). Estructure of sarcoplasmic reticulum. *Fed. Proc.* **39**: 2403-2409.

- FRAZIER, J.L. (1991). How animals perceive secondary plant compounds, pp: 89-134. In G.A. Rosenthal y M.R. Berenbaum (eds). *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites. Academic Press, New York.*
- GALLARDO, T.M., MARTIN, B.B. y MARTIN, D.F. (1998). Inhibition of water fern *Salvinia minima* by cattail (*Typha domingensis*) extracts and by 2-chlorophenol and salicylaldehyde. *J. Chem. Ecol.* **24**(9): 1483-1490.
- GALLET, C. (1994). Allelopathic potential in bilberry- Spruce Forests: Influence of Phenolic compounds on spruce seedlings. *J. Chem. Ecol.* **20**(5): 321-352.
- GARCÍA-MARQUEZ, E. y ESCUDERO, J.C. (1991). Influencia de diferentes temperaturas sobre la germinación de *Cistus ladanifer*. III Jornadas de Ecología Terrestre. León, España.
- GARCIA-MARTIN, D. y GARCIA-VALLEJO, C. (1969). Contribution a la connaissance de l'huile essentielle de *Cistus ladanifer* var *maculatus* Dun (Ciste commun-jara d'Espagne). *Parf. Cosm. e Savon* **12**: 283-290.
- GERSHENZON, J. (1984). *Phytochemical Adaptations to Stress. Plenum.* B.N. Timmermann, pp: 273-320. In C. Steelink y F.A. Loewus (eds.), *New York.*
- GLASS, A.D.M (1974). Mechanisms of regulation of plant growth. Ed. R.L Bielecki pp: 159-164. *Royal Society of New Zealand, Wellington.*
- GOES, E.S.R. (1968). Um estudo em montado de sobro. Relações entre o solo e a vegetação no Plioceno a sul do Tejo. Publ. da D.G.S.F.A. XXIX a XXXII: 62-105.
- GOTTSTEIN, A. y GROSS, D. (1992). Phytoalexins of woody plants. *Trees* **6**: 55-68.
- GRANT, E.A. (1964). Influence of plant extracts on germination and growth of eight forage species. *J. Br. Grass Soc.* **19**: 191-197.
- GRAYER, R.J. y HARBORNE, J.B. (1994). A survey of antifungal compound from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry* **37**: 19-31.
- GRAYER, R.J., HARBORNE, J.B., KIMMINS, F.M. STEVENSOKN, P.C. y WIJAYAGUNASEKERA, H.N.P. (1994). Phenolics in rice phloem sap as sucking deterrents to the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Acta Hort.* **381**: 691-694.
- GROSS, G.G. (1981). The Biochemistry of Plants, Secondary Plant Products, pp: 301-316. In E.E. Conn (ed). *7 Academic Press, New York.*

- GRUBB, P.J. (1992). A positive distrust in simplicity-lessons from plant defences and from competition among plants and among animals. *Journal of Ecology* **80**: 585-610.
- GUTIÉRREZ, Y. (2001). Modulación de Ca<sup>2+</sup>ATPasas por peroxinitrito. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Badajoz, España.
- GUTTERMAN, Y. (1994a). Strategies of seed dispersal and germination in plants inhabiting deserts. *Bot. Rev.* **60**: 373-425.
- GUTTERMAN, Y. (1994b). Seed dispersal and germination strategies of *Spergularia diandra* compared with some other desert annual plants inhabiting the Negev desert of Israel. *Israel. J. Plant Sci.* **42**: 261-274.
- GUTTERMAN, Y. (1994c). Long-term seed influences on seed germinability of the desert annual, *Mesembryanthemum nodiflorum* L. *Israel. J. Plant Sci.* **42**: 197-205.
- HARBORNE, J.B. (1967). Comparative Biochemistry of the Flavonoids. *Academic Press, New York*.
- HARBORNE, J.B. (1985). Introducción a la bioquímica ecológica. *Alhambra, Madrid*.
- HARBORNE, J.B. (1988). Introduction to Ecological Biochemistry. *Academic Press. London*.
- HARBORNE, J.B. y GRAYER, R.J., 1994. Flavonoid and insects. In Harborne, J.B. (Ed.), The Flavonoid, Advances in Research Since, 1986. *Chapman y Hall. London, UK*, pp: 589-618.
- HARE, J.D. (2002). Seasonal variation in the leaf resin components of *Mimulus aurantiacus*. *Biochem. Syst. Ecol.* **30**: 709-720.
- HASSELBACH, W. (1964) Relaxing factor and relaxation of muscle. *Prog. Biophys. Biophys. Chem.* **14**: 167-222.
- HASSELBACH, W. y MAKINOSE, M. (1961). Die Calciumpumpe der "Erschlaffungsgrana" des Muskels und ihre Abhängigkeit vor der ATP-spaltung. *Biochem. Z.* **333**: 518-528.
- HASSELBACH, W. y OETLIKER, H. (1983). Energetics and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Ann. Rev. Physiol.* **45**: 325-339.
- HAUGLAND, E. y BRANDSAETER, L.O. (1996). Experiments on bioassay sensitivity in the study of allelopathy. *J. Chem. Ecol.* **22**(10): 1845-1859.
- HAUSON, A.D., DITZ, K.M., SINGLETARY, G.W. y LELANG, T.J. (1983). Gamine accumulation in leaves of barley grown under high temperature stress. *Plant Physiol* **71**: 896-904.

- HENAO, F., DE FORESTA, B., ORLOWSKI, S., CUENDA, A., GUTIÉRREZ-MERINO, C. y CHAMPEIL, P. (1991). Kinetic characterization of the normal and procaine-perturbed reaction cycles of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Eur. J. Biochem.* **202**: 559-556.
- HERRERA, C.M. (1984). Tipos morfológicos y funcionales en plantas del matorral mediterráneo del sur de España. *Studia Oecologica* **V**: 7-34.
- HOSTETTMANN, K., DOMON, B., SCHAUFELBERGER, D. y HOSTETTMANN, M. (1984). On Line High-Performance liquid chromatography: Ultraviolet Visible spectroscopy of phenolic compounds in plant extracts using post column derivatization. *J. Chromatography* **283**: 137-147.
- HOWE, H.F. y WESTLEY, L.C. (1988). *Ecological Relationships of Plants and Animals*. Oxford University Press, New York.
- HUANG P.M., WANG, M.C. y WANG, M.K. (1999). Catalytic transformation of phenolic compounds in the soils, pp: 287-306. In Inderjit, K.M.N. Dakshini and F.L. Chester (eds.). *Principles and Practices in Plant Ecology. Allelochemicals Interactions* CRC Press. Boca Raton, Florida.
- INDERJIT (1996). Plant Phenolics in Allelopathy. *The Botanical Review* **62**(2): 186-202, April-June.
- INDERJIT (1998). Influence of *Pluchea lanceolata* (Asteraceae) on selected soil properties. *Am. J. Bot.* **85**(1): 64-69.
- INDERJIT y DAKSHINI, K.M.M. (1991). Hesperetin 7-rutinoside (hesperidin) and taxifolin 3-arabinoside as germination and growth inhibitors in the soils associated with the weed, *Pluchea lanceolata* (DC) C.B. Clarke (Asteraceae). *J. Chem. Ecol.* **17**: 1585-1591.
- INDERJIT y DAKSHINI, K.M.M. (1992). Formononetin 7-O-glucoside, an additional inhibitor from the soil associated with the weed, *Pluchea lanceolata* (DC) C.B. Clarke (Asteraceae). *J. Chem. Ecol.* **18**: 713-718.
- INDERJIT y DAKSHINI, K.M.M. (1994). Allelopathic effects of *Pulchea lanceolata* (Asteraceae) on characteristics of foru soils and growth of mustard and tomato. *Am J. Bot.* **81**: 799- 804.
- INDERJIT y DAKSHINI, K.M.M. (1995). Quercetin and quercetrin from *Pluchea lanceolata* and their effect on growth of asparagus bean, pp: 86-95. In Inderjit, K.M.N. Dakshini and F.A. Einhellig (eds.). *Allelopathy: organisms, processes, and applications*. American Chemical Society, Washington, DC.
- INDERJIT y DAKSHINI, K.M.M. (1996). Allelopathic potential of *Pluchea lanceolata*: comparative study of cultivated fields. *Weed Sci.* **44**: 393-396.

- INDERJIT y MALLIK, A.U. (1997). Effect of phenolic compounds on selected soil properties. *Forest Ecology and Management* **92**: 11-18.
- INDERJIT y WEINER (2001). Multifaceted approach to study allelochemicals in an ecosystem, pp: 101-106. *Firs European Alleloathy Simosium*. Vigo, España. Junio 21-23, 2001.
- ISMAN, M.S. y DUFFEY, S.S. (1982). Toxicity of tomato phenolic compounds to the fruitworm, *Heliothis zea*. *Entom. Experimentlis et Applicata* **31**: 370-376.
- JACOBS, M. y RUBERY, P.H. (1988). Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* **241**: 346-367.
- JADERLUND, A., ZACKRISSON, O. y NILSSON, M.Ch. (1996). Effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) litter on seed germination and early seedling growth of four boreal tree species. *J. Chem. Ecol.* **22**(5): 973-986.
- JAMES, L.F., NIELSEN, D.B. y PANTER, K.E. (1992). Impact of poisonous plant on the livestock industry. *J. Range Manage* **45**: 3-8.
- JOHNSON, A.E., MOLYNEUX, R.J. y MERRILL, G.B. (1985). Chemistry of toxic range plants. Variation in pyrrolizidine alkaloid content of Senecio, Amsinckia and Crotalaria species *J. Agric. Food Chem.* **33**: 50-55.
- JULKUNEN-TIITTO, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agricul. and Food Chemistry* **33**: 213-217.
- KARBAN, R. y MYERS, J.H. (1989). Induced plant responses to herbivory. *Annual Review Ecol. Systemat.* **20**: 331-348.
- KIL, B.S. y YIM, Y.J. (1983). Allelopathic effects of *Pinus densiflora* on undergrowth of red pine forest. *J. Chem. Ecol.* **9**(8): 1135-1151.
- KLEMENS, M.R., ANDERSEN, J.P. y GRISHAM, C.M. (1986). Occluded calcium sites in soluble sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **26**: 1495-1498.
- KRISCHIK, V.A., GOTH, R.W. y BARBOSA, P. (1991). Generalized plant defense effects on multiple species. *Oecología* **85**: 562-571.
- KROLLMANN, P. y GULZ, P. (1983). Seed lipids from *Cistus* L. *Zafanzenphysiol* **116**: 469-474.
- KUITERS, A.T. (1989). Effects of phenolic acids on germination and early growth of herbaceous woodland plants. *J. Chem. Ecol.* **15**: 467-479.

- LACKOWICZ, J.R. (1983). Principles of Fluorescence Spectroscopy, pp 44-45. *Plenum Press, New York / Londres.*
- LACKOWICZ, J.R. (1986). Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Plenum Press, New York.*
- LANE, G.A., BIGG, D.R., RUSSELL, G.B., SUTHERLAND, O.R.W., WILLIAMS, E.M., MAINDONALD, J.H. y DONNELL, D.J., (1985). Isoflavonoid feeding deterrents for *Costeytra zealandica*. Structure-activity relationship. *J. Chem. Ecol.* **11**: 1713-1735.
- LARCHER, W. (1977). Ecofisiología vegetal. *Ed. Omega. Barcelona.*
- LEHMAN, M.E., BLUM, U. y GERIG, T.M. (1994). Simultaneous effects of ferulic and p-coumaric acids on cucumber leaf expansion in split-root experiments. *J. Chem. Ecol.* **20**: 1773-1782.
- LEITAO, G.G., MENSOR, L.L., AMARAL, L.F.G., FLORIANO, N., LIMEIRA, V.L.G., MENEZES, F.D. y LEITAO, S.G. (1999). Plant Polyphenols 2, pp. 883-895. Gross GG, Hemingway R.W. y Yoshida T. (eds.). *Kluwer Academic, New York.*
- LEVIN, D.A. (1973). The role of trichomes in plant defense. *Q. Rev. Biol.* **48**: 3-15.
- LI, J., INOUE, M., NISHIMURA, H., MIZUTANI, J. y TSUZUKI, E. (1993). Interactions of trans-cinnamic acid, its related phenolic allelochemicals, and abscisic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. *J. Chem. Ecol.* **19**(8): 1775-1787.
- LIENER, I.E. (1980). Miscellaneous toxic factors. In IE (Ed). Toxic Constituents of plant Foodstuffs pp: 429-467. *Academic Press.* London.
- LINCOLN, D.E. (1985). Host plant protein and phenolic resin effects on larval growth and survival of butterfly. *J. Chem. Ecol.* **11**: 1459-1467.
- LINCOLN, D.E. y WALLA, M.D. (1986). Flavonoids from *Diplacus aurantiacus* leaf resin. *Biochem. Syst. Ecol.* **14**: 195-198.
- LINDROTH, R.L. y BATZLI, G.O. (1984). Plant phenolics as chemical defenses: effects of natural phenolics on survival and growth of prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *J. Chem. Ecol.* **10**: 229-244.
- LONDON, E. y FEIGENSON, G.M. (1981). Fluorescence quenching in model membranes, 2. Determination of local lipid environment of the Ca<sup>2+</sup> from sarcoplasmic reticulum. *Biochem.* **20**: 1939-1948.

- LOPES-BORGES, A.E. (1988). Estudo da bio-ecologia de *Cistus ladanifer* L. (Esteva)-sua importancia em Portugal. Instituto Nacional de Investigaçao Agrária. Estação Forestal Nacional.
- LOUDA, S. y MOLE, S. (1991). Chapter 4. In G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum (eds). Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites. *Academic Press, San Diego, C.A.*
- LUNDBERG, P. y PALO, R.T. (1993). Resource use, plant defenses, and optimal digestion in ruminants. *Oikos* **68**: 224-228.
- LWANDE, W., NDAKALA, A.L., HASSANALI, L., MOREKA, E., NDUNGU, M., AMIANI, H., GIYU, P.M., MALONZA, M.M. y PUNYUA, D.K. (1999). Gynandropsis gynadra essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) repellents. *Phytochemistry* **50**: 401-405.
- LYU, S.W., BLUM, U., GERIC, T.U. y O'BRIEN, T.E. (1990). Effects of mixtures of phenolic acid on phosphorus uptake by cucumber seedlings. *J. Chem. Ecol.* **16**(8): 2559-2567.
- MACÍAS, F.A., GALINDO, J.C.G., MASSANET, J.M., RODRIGUEZ-LUIS, F. y ZUBIA, E. (1993). Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves. *J. Chem. Ecol.* **19**(7): 1371-1379.
- MACLENNAN, D.H. (1970). Purification and properties of an ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **245**: 4508-4518.
- MACLENNAN, D.H. y GREEN, N.M. (2000). Structural biology. Pumping ions. *Nature* **405**: 633-634.
- MACLENNAN, D.H., BRANDL, C.J., KORCZAK, B. y GREEN, N.M. (1985). Amino acid sequence of a  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* **316**: 696-700.
- MAKINOSE, M. (1969). The phosphorylation of the membranal protein of the sarcoplasmic vesicles during active calcium transport. *Eur. J. Biochem.* **10**: 74-82.
- MAKKAR, H.P.S., DAWRA, R.K. y SINGH, B. (1988). Changes in tannin content, polymerisation and protein precipitation capacity in oak (*Quercus incana*) leaves with maturity. *J. Sci. Food Agric.* **44**: 301-307.
- MAKKAR, H.P.S., DAWRA, R.K. y SINGH, B. (1991). Tannin levels in leaves of some oak species at different stage of maturity. *J. Sci. Food Agric.* **54**: 513-519.
- MARKHAM, K.R. (1982). Techniques of Flavonoids Identification. *Academic Press, London.*
- MEISSNER, G. (1975). Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **389**: 51-68.

- MERINO, J.M. (1995). Estudio sobre relaciones estructura-función en la  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico del músculo esquelético. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Badajoz, España.
- MILBORROW, B.V. (1984). Inhibitors, pp. 77-110. M.B. Wilkins (ed.). *Advanced Plant Physiology*. Pitman Publishing, London.
- MINTZ, E., LACAPERE, J.J. Y GUILLAIN, F. (1990). Reversal of the sarcoplasmic reticulum ATPase cycle by substituting various cations for magnesium. Phosphorylation and ATP synthesis when  $\text{Ca}^{2+}$  replaces  $\text{Mg}^{2+}$ . *J. Biol. Chem.* **265**: 18762-18768.
- NGOH, S.P., CHOO, L.E., PANG, F.Y., HUANG, Y. KINI, M.R. y HO, S.H. (1998). Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American cockroach. *Periplaneta americana* L. *Pestic. Sci.* **54**: 261-268.
- NICOLAI, V. (1988). Phenolic and mineral content of leaves influences decomposition in European forest ecosystems. *Oecologia* **75**: 575-579.
- NILSSON, M.C., HÖGBERG, P., ZACKRISSON, O. y FENGYOU, W. (1993). Allelopathic effects by *Empetrum hermaphroditum* on development and nitrogen uptake by roots and mycorrhizae of *Pinus silvestris*. *Can. J. Bot.* **71**: 620-628.
- NORRIS, D.M. (1977). Role de repellents and deterrents in feeding of *Scolytus multistriatus*, pp: 215-230. In Hedin, P.A. (Ed), *Host-Plant Resitence to Pests, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Chicago*.
- NUÑEZ, E. (1989). ECOLOGÍA DEL JARAL DE *CISTUS LADANIFER* L. TESIS DOCTORAL. FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA, BADAJOZ, ESPAÑA.
- ODEN, P.C., BRANDTBERG, P.O., ANDERSON, R., GREG, R., ZACKRISSON, O. Y NILSSON, M.C. (1992). *Isolation and characterization of a germination inhibition from leaves of empetrum hermaphroditum hagerup*. *Scandinavian. J. Forestry research* **7**: 497-502.
- OHGUSHI, T. (1992). Effects of re-source distribution on animal-plant interactions pp.199-241. Hunter, M.D., Ohgushi, T. and Price, P.W. (eds). *Academic Press, San Diego*.
- PANAGOPOULOS, I., BORNMAN, J.F. y BJÖRN, L.O. (1992). Response of sugar beet plants to ultraviolet-B (280-320 nm) radiation and Cercospora leaf spot disease. *Physiol. Plant.* **84**: 140-145.
- PANDJI, C., GRIMM, C., WRAY, V., WITTE, L. y PROKSCH, P. (1993). Insecticidal constituents from four species of the Zingiberaceae. *Phytochemistry* **43**: 415-431.

- PARMAR, V.S., JHA, H.N., GUPTA, A.K. y PRASAD, A.K. (1992). Agamanone, a Flavanone from *Agave americana*. *Phytochemistry* **31**(7): 2567-2568.
- PASCUAL, T. URONES, J.G. y BASABE, P (1974). Flavonoides del *Cistus ladanifer* L. *An. Quim.* **70**: 155-157.
- PASCUAL, T. URONES, J.G. y GONZALEZ, M. (1977). Terpenoides monohidroxilados de la gomorresina de *Cistus ladanifer* L. *An. Quim.*, **73**: 1024-1028.
- PASCUAL, T., VARA, A., URONES, J.G. y SAN FELICIANO, A. (1972). Estudio de la gomorresina de *Cistus ladanifer* L. *Quimica* **68**: 727-732.
- PEDERSEN, P.L. y CARAFOLI, E. (1987). Ion motive ATPases: I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 146-150.
- PELLISSIER, F. (1993). Allelopathic inhibition of spruce germination. *Acta Oecologica* **14**(2): 211-218.
- PÉREZ-GARCÍA, F. (1997). Germination of *Cistus ladanifer* seed in relation to parent material. *Plant Ecol.* **133**: 57-62.
- PRICE, M.L., STROMBERG, A.M. y BUTLER, L.G. (1979). Tannin content as a function of grain maturity and drying conditions in several varieties of *Sorghum bicolor* (L) Moench. *J. Agric. Food Chem.* **27**: 1270-1274.
- PRICE, P.W., WARING, G.L., JULKUNEN-TIITTO, R., TAHVANAINEN, J., MOONEY, H.A. y CRAIG, T.P. (1989). Carbon-nutrient balance hypothesis in within species phytochemical variation of *Salix lasiolepis*. *J. Chem. Ecol.* **15**: 1117-1131.
- PROKSCH, P. y GÜLZ, P.G. (1984). Methylated flavonoids from *Cistus ladanifer* and *Cistus palhinhae* and their taxonomic implications. *Phytochemistry* **23**(2): 470-471.
- PROKSCH, P., GÜLZ, P.G y BUDZIKIEWICZ, H. (1980). Further oxygenated compounds in the essential oil of *Cistus ladanifer* L (Cistaceae). *Z. Naturforsch.* **35c**: 529-532.
- PUTNAM, A.R. y TANG, C.S. (1986). Allelopathy: State of the science, pp: 1-19, in A.R. Putnam & C.S.Tang (eds.). *The science of allelopathy*. John Wiley, New York.
- RAWN, J.D. (1989) Bioquímica, cap. 33, pp: 1102-1103. Ed. McGraw Hill-Interamericana de España.
- REED, J.F. y CUMMINGS, R.W. (1945). *Soil Science* **59**: 97-104.

- REIGOSA, M.J. y SANCHEZ-MOREIRAS, A. (1999). Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Rev. Plant Sci.* **18**: 877-608.
- RHOADES, D.F. (1970). Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites, pp: 3-54. In Rosenthal, G.A. y Janzen, D.H. (eds). *Academic Press, New York*.
- RHOADES, D.F. y CATES, R.G. (1976). Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. *Recent advances in Phytochemistry* **10**: 168-213.
- RICE, E.L. (1984). Allelopathic. *Academic Press, Orlando, Florida*.
- RIKALA, R. y JOZEFEK, H.J. (1990). Effects of dolomite lime and wood ash on peat substrate and development of tree seedlings. *Silvia Fenn.* **24**(4): 323-334.
- RIVAS-GODAY y RIVAS-MARTINEZ, P. (1967). Matorrales y tomillares de la Península Ibérica comprendidos en la clase Ononodo-Rosmarinetea. *Madrid*.
- ROBINSON, T. (1979). Chapter 11. In G.A. Rosenthal G.A. and Janzel, D.H. (eds.). Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites. *Academic Press, New York*.
- ROSENTHAL, G.A. y BERENBAUM, M.R. (1991). Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites. *Academic Press, New York*.
- SAITO, A., SEITER, S., CHE, A., y FLEISCHES, S. (1984). *J. Cell. Biol.* **99**: 875-885.
- SCARPA, A., BALDADARE, J. e INESI, G. (1972). The effect of calcium ionophres on fragmented sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* **60**: 735-743.
- SCHELS, H., ZINSMEISTER, H.D. y PFLEGER, K. (1977). Mass spectrometry of silylated flavonoid glycosides. Part.1. Mass spectrometric of silylated flavonol O-glycosides. *Phytochemistry* **16**(7): 1019- 1023.
- SCHELS, H., ZINSMEISTER, H.D. y PFLEGER, K. (1978). Mass spectrometry of silylated flavonoid glycosides. Part.1. Mass spectrometric of silylated flavone and flavanone glycosides. *Phytochemistry* **17**(3): 523-526.
- SEIGLER, D.S. (1991). Chapter 2. In G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum (eds.). Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites. *Academic Press, San Diego, C.A.*
- SERRANO, R. KIELLAND-BRADT, M.C. y FINK, G.R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature* **319**: 689-693.

- SHAVER, T.N. y LUKEFAHR, M.J. (1969). Effect of flavonoid pigments and gossypol on growth and development of the bollworm, tobacco budworm and pink bollworm. *J. Econ. Entomol.* **62**: 643-646.
- SHIGHEKAWA, M. y PEARL, L.J. (1976). Activation of calcium transport in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by monovalent cations. *J. Biol. Chem.* **251**: 6947-6952.
- SHOSHAN, V. y MACLENNAN, D.H. (1981). Quercetin interaction with the  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **256**: 887-892.
- SIEGELMAN, H.W. (1964). Physiological studies on phenolic compounds, pp: 437-456. In J.B. Harborne (ed). Biochemistry of phenolic compounds. *Academic Press, New York*.
- SIMMONDS, M.S.J. (2001). Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry* **56**: 245-252.
- SIMMONDS, M.S.J. (2003). Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry* **64**: 21-30.
- SIMMONDS, M.S.J., BLANEY, W.M., MONACHE, F.D. y BETTOLO, G.B.M. (1990). Insect antifeedant activity associated with compound isolated from species of *Lonchocarpus* and *Tephrosia*. *J. Chem. Ecol.* **16**: 365-374.
- SINGER, S.J. y NICHOLSON, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731.
- SINGH, D. y SINGH, A.K. (1991). Repellent and insecticidal properties of essential oils against housefly, *Musca domestica* L. *Insect. Sci. Applic.* **12**: 487-491.
- SINGLETON, V.L. y ROSSI, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American J. Enol. Viticulture* **16**: 144-158.
- SMITH, A.E. (1989). The potential allelopathic characteristics of bitter sneeze weed (*Helenium amarum*). *Weed Sci.* **37**: 665-669.
- SOIL CONSERVATION SERVICE (1972). Soil survey laboratory methods and procedures for collecting soil sample. *USDA-Washington*.
- SOSA, T. (2000). Contribución al estudio del potencial alelopático de *Cistus ladanifer* L.: Identificación de *allelochemicals* en el exudado y determinación de su actividad en el suelo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Badajoz, España.

- STENLID, G. (1970). Flavonoid as inhibitors of the formation of adenosine triphosphate in planta mitochondria. *Phytochemistry* **9**: 2251-2268.
- STENLID, G. (1976). Effects of substituents in the A-ring on the physiological activity of flavones. *Phytochemistry* **15**: 911-927.
- STERNER, R.W. y HESSEN, D.O. (1994). Algal nutrient limitation and the nutrition of aquatic herbivores. *Annual Review Ecol. Systemat.* **25**: 1-29.
- STEVENS, J.F., HART, T. y WOLLENWEBER, E. (1995). The systematic significance of exudate flavonoids in *Aeonium*. *Phytochemistry* **39**(4): 805-813.
- STEVENSON, P.C., KIMMINS, F.M., GRAYER, R.J. y RAVEENDRANATH, S. (1996). Schaftosides from rice phloem as feeding inhibitors and resistance factors to brown planthoppers *Nilaparvata lugens*. *Entom. Experimentalis et Applicata* **80**: 246-249.
- STRASBURGER, E., NOLL, F., SCHENK, H. y SCHIMPER, A.F.W. (1994). Tratado de Botánica. Ed. *Marin Barcelona, España*.
- TAKAHAMA, U. (1988). Hydrogen peroxide-dependent oxidation of flavonoids and hydroxycinnamic acid derivatives in epidermal and guard cells of *Tradescantia virginiana*. L. *Plant Cell. Physiol.* **29**(3): 475-481.
- TOYOSHIMA, C., NAKASAKE, M., NOMURA, H. y OGAWA, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2,6Å resolution. *Nature* **405**: 647-655.
- TURNER, J.M. (1994). Sclerophylly: primarily protective? *Functional Ecology* **8**: 669-675.
- VILES, A.L. y REESE, R.N. (1996). Allelopathic potential of *Echinacea angustifolia* D.C. *Environmental and Experimental Botany* **36**(1): 39-43.
- VOGTH, T. y GÜLZ, P.G. (1991). Isocratic column liquid chromatographic separation of a complex mixture of epicuticular flavonoid aglycones and intracellular flavonol glycosides from *Cistus laurifolius* L. *J. Chrom.* **537**: 453-459.
- WACKER, T.L., SAFIR, G.R. y STEPHENS, C.T. (1990). Effects of ferulic acid on *Glomus fasciculatum* and associated effects on phosphorus uptake and growth of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *J. Chem. Ecol.* **16**: 901-909.

- WALKLEY, A. y BLACK, T.A. (1934). An examination of the Degtareff method for determining organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* **37**: 5-15.
- WALLER, G.R. (1987). Allelochemicals: Role in agriculture and forestry. ACS Symposium Series 330. *American Chemical Society, Washington, DC.*
- WARDLE, D.A., AHMED, M. y NICHOLSON K.S. (1991). Allelopathic influence of Nodding Thistle (*Carduus nutans* L.) seed on germination and radicle growth of pasture plants. *New Zealand J. Agricultural Research* **34**: 185-191.
- WARING, R.H., McDONALD, A.J.S., LARSSON, S., ERICSSON, T., WIREN, A., ARWIDSSON, E., ERICSSON, A. y LOHAMMAR, T. (1985). Differences in chemical composition of plants grown at constant relative growth rates with stable mineral nutrition. *Oecologia* **66**: 157-160.
- WATANABE, A.K., SHONO, Y., KAKIMIZU, A., MATSUO, N., SATO, A. y NISHIMURA, H. (1993). New mosquito repellent from *Eucalyptus camaldulensis*. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 2164-2166.
- WATANABE, M. (1993) Thermoregulation and habitat preference in two wing color forms of *Mnais* damselflies and *Calopteryx japonica* (Zygoptera: Calopterygidae). The Twelfth International Symposium of Odonatology. Osaka. Japan
- WEIDENBORNER, M. y JHA, H.C. (1993). Antifungal activity of flavonoids and their mixtures against different fungi occurring on grain. *Pestic. Sci.* **38**: 347-356.
- WEIDENBORNER, M., HINDORF, H., JHA, H.C. y TSOTSONOS, P. (1990). Antifungal activity of flavonoids against storage fungi of the genus *Aspergillus*. *Phytochemistry* **29**: 1103-1112.
- WEIDENBORNER, M., HINDORF, H., WELTZIEN, H.C., y JHA, H.C. (1992). An effective treatment of legume seeds with flavonoids and isoflavonoids against storage fungi of the genus *Aspergillus*. *Seed Sci. Technol.* **20**: 447-461
- WELCHER, F.J. (1966). Estandar methods of chemical analysis Vol. III. *A Van Nostrand Reinhold Co. Londres.*
- WHITE, T.C.R. (1993). The Inadequate Environment: Nitrogen and The Abundance of Animals. *Berlin: Springer-Verlag.*

- WINK, M., LATZ-BRÜNING, B. y SCHMELLER, T. (2000). Biochemical effects of allelopathic alkaloids, pp: 411-421. In Inderjit, K.M.N. Dakshini and F.L. Chester (eds.). *Principles and Practices in Plant Ecology. Allelochemicals Interactions CRC Press. Boca Raton, Florida.*
- WORTHING, Ch.R.M. y WALKER, S.B. (1987). The pesticide manual. A world compendium, pp: 1081-1102. *Ed. BOCP.*
- YAMADA, S. e IKEMOTO, N. (1980). Reaction mechanism of Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Substrates for phosphorylation reaction and back reaction and further resolution of phosphorylated intermediate. *J. Biol. Chem.* **255**: 3108-3119.
- ZAMORA, R., HÓDAR, J.A. y GÓMEZ, J.M. (1999). Plant-Herbivore Interaction: Beyond a Binary Vision, pp: 677-717. In Pugnaire, F.I. y Valladares, F. (eds). *Handbook Funct. Plant Ecol., Marcel Dekker, Inc., New York.*
- ZHENG, W.F., TAN, R.X., YANG, L. y LIU, Z.L. (1996). Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta Medica* **62**: 160-175.
- ZISKA, L.H., TERAMURA, A.H., SULLIVAN, J.H. y MCCOY, A. (1993). Influence of ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic and growth characteristics in field-grown cassava (*Manihot esculentum* Crantz). *Plant Cell Environ.* **16**: 73-79.