



TESIS DOCTORAL

Bases ecológicas para la producción de aceite esencial de jara pringosa (*Cistus ladanifer* L.)

Carlos Pérez Izquierdo

Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Sistemas Agroforestales

2022

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada “Bases ecológicas para la producción de aceite esencial de jara pringosa (*Cistus ladanifer* L.)”, ha sido realizada por Carlos Pérez Izquierdo bajo la dirección del Dr. Fernando Javier Pulido Díaz, Profesor Titular del área de Producción Vegetal del Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal 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.

Y para que así conste, firma la presente a 25 de Enero de 2022:

La conformidad del director de la tesis consta en el original en papel de esta Tesis Doctoral.

A mi familia

A Cristina

*“Confía en el tiempo,
que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades”*

(Miguel de Cervantes Saavedra)

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sentido agradecimiento a todas las personas que me han apoyado, animado y ayudado a realizar este trabajo.

En primer lugar, al Dr. Fernando Javier Pulido Díaz, por haber aceptado desde el primer momento la dirección de este trabajo. Gracias por haberme permitido incorporarme a su grupo de investigación, y por confiar en mí y haberme atendido y asesorado siempre que lo he necesitado.

A la Junta de Extremadura y al Fondo Social Europeo, por la concesión del contrato predoctoral que me permitió iniciar mi carrera investigadora. Por supuesto, también agradezco a la Universidad de Extremadura (Uex) y al CAEM (CICYTEX) haberme facilitado un lugar donde poder llevar a cabo estos trabajos.

Extiendo mi agradecimiento a todos los compañeros y trabajadores del CAEM y la Uex que me han acompañado durante todo este tiempo. Mención especial merecen María del Carmen Rodríguez Molina y Paula Serrano Pérez (mi prima), por haberse involucrado en este trabajo tanto profesional como emocionalmente. Gracias también a mi tía Elena, que me ha ayudado, aconsejado y animado en todo momento (es lo que tiene ir antes al matadero). Por supuesto, a los compañeros (que compañeros, ¡AMIGOS!) del equipo Plaganado (Raúl, Tara y Álvaro) por los buenos momentos compartidos mientras caminábamos entre encinas.

Gracias a Francisco María Vázquez Pardo, por haberme abierto las puertas de la "Orden" siempre que lo he necesitado. Al IMIDA, y en especial a María José Jordán Bueso, por haberme acogido en Murcia como a uno más, y darme un curso intensivo pero efectivo de Cromatografía de Gases.

A mis padres, por su esfuerzo y apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida. A mis hermanos (Leticia, Manuel, Héctor y David), abuelos, tíos, primos, sobrinos, amigos, por ayudarme a ser lo que soy.

Y por último, pero no por ello menos importante, a Cristina, la persona más importante de mi vida. Gracias por haber estado siempre a mi lado como pareja, y también como TÉCNICO DE CAMPO claro (nos quedaremos con nuestros buenos momentos en Gata/Hurdes, pero obviando el tema Cilleros y los desbroces de Guijo). Gracias por todo de verdad, te estaré infinitamente agradecido, sin ti, creo que no lo hubiera conseguido.

A todos vosotros, GRACIAS.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE TABLAS.....	15
ÍNDICE DE IMÁGENES	17
RESUMEN.....	19
ABSTRACT	21
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	25
1. INTRODUCCIÓN	27
1.1. Aspectos biológicos básicos de los aceites esenciales	27
1.2. Aspectos productivos de los aceites esenciales	30
1.3. Aspectos botánicos y ecológicos de <i>C. ladanifer</i>	33
1.4. Aspectos productivos de <i>C. ladanifer</i>	35
2. OBJETIVOS DE LA TESIS	38
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....	41
1. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL	43
2. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD Y CÁLCULO DE RENDIMIENTO	44
3. ANÁLISIS QUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL	45
4. DATOS EDAFOCLIMÁTICOS	47
CAPÍTULO 3: Variabilidad en el rendimiento y la composición química de aceites esenciales de <i>C. ladanifer</i> obtenidos de diferentes poblaciones y su relación con factores edáficos.....	51
1. INTRODUCCIÓN	53
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
2.1. Breve descripción del área de estudio.....	55
2.2. Diseño experimental y material vegetal.....	56
2.3. Extracción y análisis químico del aceite esencial.....	57
2.4. Datos edafoclimáticos.....	58
2.5. Análisis de datos	58
3. RESULTADOS	59
3.1. Rendimiento en aceite esencial.....	59
3.2. Composición química del aceite esencial	62
3.3. Análisis multivariantes	65
4. DISCUSIÓN.....	69
CAPÍTULO 4: Efecto del estado fenológico, la edad y la parte de la planta utilizada en el rendimiento y la composición química del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i>	75

1. INTRODUCCIÓN	77
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
2.1. Diseño experimental y material vegetal.....	78
2.2. Extracción y análisis químico del aceite esencial.....	79
2.3. Datos edafoclimáticos.....	80
2.4. Análisis de datos	81
3. RESULTADOS	82
3.1. Rendimiento en aceite esencial.....	82
3.2. Composición química del aceite esencial	83
3.3. Análisis multivariante	88
3.4. Rendimiento y composición química de hojas y tallos.....	90
4. DISCUSIÓN.....	92
4.1. Rendimiento en aceite esencial.....	93
4.2. Composición química.....	94
CAPÍTULO 5: Efecto del riego y la fertilización en la producción de aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> ensayado bajo condiciones naturales.....	
1. INTRODUCCIÓN	101
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	103
2.1. Área de estudio.....	103
2.2. Diseño experimental y material vegetal.....	103
2.3. Extracción y análisis químico del aceite esencial.....	105
2.4. Datos climáticos.....	106
2.5. Estimación indirecta del estrés hídrico.....	107
3. RESULTADOS	109
3.1. Estimación indirecta de estrés hídrico.....	109
3.2. Variables morfológicas y rendimiento en aceite esencial	110
3.3. Composición química del aceite esencial	114
4. DISCUSIÓN.....	118
4.1. Estimación indirecta del estrés hídrico.....	118
4.2. Rendimiento en aceite esencial y variables morfológicas.....	119
4.3. Composición química.....	122
CAPÍTULO 6: Influencia del secado del material vegetal sobre el rendimiento y la composición química de aceite esencial de <i>C. ladanifer</i>	
1. INTRODUCCIÓN.....	127
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	128

2.1. Diseño experimental y material vegetal.....	128
2.2. Extracción y análisis químico del aceite esencial.....	130
2.3. Análisis de datos	130
3. RESULTADOS	131
3.1. Rendimiento en aceite esencial.....	131
3.2. Composición química del aceite esencial	132
4. DISCUSIÓN.....	135
4.1. Rendimiento en aceite esencial.....	135
4.2. Composición química del aceite esencial	137
CAPÍTULO 7: Actividad antifúngica y fitotóxica del aceite esencial y el hidrolato de <i>C. ladanifer</i> bajo condiciones in vitro	
1. INTRODUCCIÓN	143
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	145
2.1. Material vegetal y extracción	145
2.2. Análisis químico del aceite esencial.....	145
2.3. Efecto sobre el crecimiento micelial.....	146
2.4. Efecto del hidrolato en el patosistema <i>P. cinnamomi</i> - <i>L. luteus</i>	148
2.5. Efecto fitotóxico en semillas de <i>R. sativus</i> y <i>L. luteus</i>	149
2.6. Efecto fitotóxico del hidrolato en plántulas de <i>L. luteus</i>	150
2.7. Análisis de datos	152
3. RESULTADOS	153
3.1. Composición química del aceite esencial y el hidrolato.....	153
3.2. Efecto del aceite esencial en la inhibición del crecimiento micelial	155
3.3. Efecto fitotóxico del aceite esencial en <i>R. sativus</i> y <i>L. luteus</i>	156
3.4. Efecto del hidrolato en la inhibición del crecimiento micelial	157
3.5. Efecto <i>in situ</i> del hidrolato sobre el patosistema <i>P. cinnamomi</i> - <i>L. luteus</i>	157
3.6. Efecto fitotóxico del hidrolato en semillas de <i>R. sativus</i> y <i>L. luteus</i>	160
3.7. Efecto fitotóxico del hidrolato en plántulas de <i>L. luteus</i>	161
4. DISCUSIÓN.....	163
4.1. Composición química del aceite esencial y el hidrolato.....	163
4.2. Efecto del aceite esencial en la inhibición del crecimiento micelial	164
4.3. Efecto fitotóxico del aceite esencial en las semillas de <i>R. sativus</i> y <i>L. luteus</i>	165
4.4. Efecto del hidrolato en la inhibición del crecimiento micelial	166
4.5. Efecto <i>in situ</i> del hidrolato sobre el patosistema <i>P. cinnamomi</i> - <i>L. luteus</i>	166
4.6. Efecto fitotóxico del hidrolato en semillas de <i>R. sativus</i> y <i>L. luteus</i>	167
4.7. Efecto fitotóxico del hidrolato en plántulas de <i>L. luteus</i>	167

CAPÍTULO 8: DISCUSIÓN GENERAL.....	171
1. DISCUSIÓN GENERAL.....	173
1.1. Influencia del ambiente edafoclicátimo en poblaciones naturales.....	174
1.2. Influencia de factores ontogénicos de la planta.....	176
1.3. Influencia del aporte de agua y nutrientes a la producción de aceite esencial	177
1.4. Actividad biológica del aceite esencial	179
CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES GENERALES	181
BIBLIOGRAFÍA	186
ANEXO 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES	211
ANEXO 2. DATOS EDAFOLÓGICOS y CLIMÁTICOS	231

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de biosíntesis de terpenoides y fenilpropanoides (Arriba). Terpenos mayoritarios en el aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> (Abajo). Adaptado de Zuzarte & Salgueiro (2015) y Owen & Peñuelas (2005).	29
Figura 2. Actividades y usos de plantas aromáticas y medicinales. Adaptado de Christaki et al. (2012).	30
Figura 3. Evolución de la superficie destinada a cultivo de PAM en España desde 1995 a 2016 (MAPAMA).	31
Figura 4. Principales productos comerciales y procesos de extracción de <i>C. ladanifer</i>	36
Figura 5. Cabeza de destilación de Clevenger modificada para la determinación de drogas vegetales (Real Farmacopea Española, 2010). Dimensiones en mm.	44
Figura 6. Posición en el cromatograma de los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i>	47
Figura 7. Mapa de localización de las cuatro poblaciones de estudio asociadas al tipo de suelo y recurrencia de incendios.	56
Figura 8. Rendimiento en aceite esencial (% v/P.S) de las diferentes poblaciones de <i>C. ladanifer</i> en dos tipos de suelo. Líneas en horizontal indican la mediana. Las cajas muestran los valores entre el 1º y 3º cuartil. Las líneas verticales marcan valores máximos y mínimos.	61
Figura 9. Rendimiento en aceite esencial (% v/P.S) de las diferentes parcelas de recolección de <i>C. ladanifer</i> . Los valores son expresados como media \pm SD. Para cada población, distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el test de Tukey (HSD).	61
Figura 10. Porcentaje relativo (%) de los grupos de compuestos en las diferentes poblaciones de <i>C. ladanifer</i> y tipos de suelo. Los valores son expresados como media \pm SD. MH: monoterpenos hidrocarbonados; MO: monoterpenos oxigenados; SH: sesquiterpenos hidrocarbonados; SO: sesquiterpenos oxigenados; DH: diterpenos hidrocarbonados.	63
Figura 11. Distribución de variables del análisis PCA realizado con los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i>	66

Figura 12. Distribución de muestras del análisis PCA realizado con los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i>	66
Figura 13. Dendrograma obtenido por análisis clúster y basado en distancias euclídeas (método UPGMA) de los componentes mayoritarios del aceite esencial de 12 parcelas de recolección de <i>C. ladanifer</i>	67
Figura 14. Rendimiento en aceite esencial (% v/P.S) por estado fenológico e intervalos de edad. Los valores son expresados como media \pm SD. Para cada estado fenológico, distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el test de Tukey (HSD) por edades.....	83
Figura 15. Porcentaje relativo (%) de los grupos de compuestos en diferentes estados fenológicos e intervalos de edad. Los valores son expresados como media \pm SD. MH: monoterpenos hidrocarbonados; MO: monoterpenos oxigenados; SH: sesquiterpenos hidrocarbonados; SO: sesquiterpenos oxigenados; DH: diterpenos hidrocarbonados.....	85
Figura 16. Matriz de correlación por pares entre los componentes mayoritarios (%) del aceite esencial. Se empleó el coeficiente de correlación de Spearman con corrección de Bonferroni y un factor de agrupamiento de compuestos en la diagonal. En el mapa, un cuadrado de color representa una correlación significativa, y el tamaño y la intensidad del cuadrado indican el valor de correlación.	87
Figura 17. Distribución de muestras del análisis PCA realizado con los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i>	89
Figura 18. Dendrograma obtenido por análisis clúster y basado en distancias euclídeas (método UPGMA) de los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> en 4 poblaciones, 2 estados fenológicos y 3 intervalos de edad.....	89
Figura 19. Porcentaje relativo (%) de los grupos de compuestos en hojas y tallos. Los valores son expresados como media \pm SD. MH: monoterpenos hidrocarbonados; MO: monoterpenos oxigenados; SH: sesquiterpenos hidrocarbonados; SO: sesquiterpenos oxigenados; DH: diterpenos hidrocarbonados.....	92
Figura 20. Variación mensual de la precipitación total acumulada (mm) y la temperatura media ($^{\circ}$ C) durante los dos años de estudio. Las flechas rojas marcan los episodios de riego en la parcela.	107

Figura 21. Evolución temporal (abril-noviembre) de los dos índices de vegetación empleados. Las indicaciones 1 y 2 corresponden con los años 2019 y 2020, respectivamente. Los puntos indican el valor medio del índice en 60 píxeles de la imagen para una fecha determinada. Las líneas verticales continuas indican las fechas de aplicación de riego. Las líneas verticales discontinuas denotan las tres fechas de recolección en 2019 y las líneas de puntos discontinuos para 2020. 110

Figura 22. Variables morfológicas estimadas por tratamiento y fecha de recolección. Los valores son expresados como media \pm SD. Para cada fecha de recolección, distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el test de Tukey (HSD) por tratamientos. 111

Figura 23. Rendimiento en aceite esencial (% v/P.S) por tratamiento y fecha de recolección. Los valores son expresados como media \pm SD. Para cada fecha de recolección, distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el test de Tukey (HSD) por tratamientos. 112

Figura 24. Relación entre las cuatro variables morfológicas estimadas y el rendimiento en aceite esencial (% v/P.S) de la planta bajo distintos tratamientos y fechas de recolección. Se muestra en cada gráfico el resultado del análisis de correlación por el método de Pearson. 113

Figura 25. Porcentaje relativo (%) de los grupos de compuestos bajo tratamientos y fechas de recolección. Los valores son expresados como media \pm SD. MH: monoterpenos hidrocarbonados; MO: monoterpenos oxigenados; SH: sesquiterpenos hidrocarbonados; SO: sesquiterpenos oxigenados; DH: diterpenos hidrocarbonados. 115

Figura 26. Material vegetal secado a temperatura ambiente en la nave y en estufa a 40 °C de temperatura. 129

Figura 27. Porcentaje relativo (%) de los tres componentes principales del aceite esencial en función de los tres tratamientos de secado aplicados. Los valores son expresados como media \pm SD. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el test de Tukey (HSD). Asteriscos (*) en dos letras iguales indican diferencias marginalmente significativas ($0,10 < P > 0,05$). 134

Figura 28. Distribución de variables (texto) e individuos (puntos) del análisis PCA realizado con los componentes mayoritarios del aceite esencial de *C. ladanifer*. 135

Figura 29. Actividad fitotóxica del aceite esencial de *C. ladanifer* a diferentes dosis (μl) sobre el índice de germinación de semillas de rabanito (*R. sativus*) y altramuz (*L. luteus*). Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=10$). Para cada especie, las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA para *L. luteus* y Kruskal-Wallis para *R. sativus* seguido del test de comparación múltiple de Tukey ($P < 0,05$)). 156

Figura 30. Longitud total (cm) de plántulas de altramuz (*L. luteus*) inoculadas con *P. cinnamomi* y tratadas con diferentes dosis de hidrolato (%; v/v en agua) y medidas durante 14 días. WT: control de agua sin inoculación y sin tratar con hidrolato. Las líneas discontinuas separan cada una de las dos fases (Fase 1 y Fase 2). Los valores se expresan como medias \pm desviaciones estándar ($n = [1-10]$). Para cada aislado, las letras diferentes al final de cada fase indican diferencias estadísticamente significativas (MLM seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0,05$)). 160

Figura 31. Actividad fitotóxica del hidrolato de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (%; v/v en agua) sobre el índice de germinación de las semillas de rabanito (*R. sativus*) y altramuz (*L. luteus*). Los valores se expresan como medias \pm desviaciones estándar ($n=10$). Para cada especie, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0,05$)). 161

Figura 32. Longitud total (cm) de plántulas de altramuz (*L. luteus*) tratadas con diferentes concentraciones de hidrolato (%; v/v en agua) y medidas durante 14 días. Las líneas discontinuas separan cada una de las dos fases (Fase 1 y Fase 2). Los valores se expresan como medias \pm desviaciones estándar ($n = [1-10]$). Letras diferentes al final de cada fase indican diferencias estadísticamente significativas (MLM seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0,05$)). 162

Figura 33. Número de raíces secundarias desarrolladas en plántulas de altramuz (*L. luteus*) tratadas con hidrolato a diferentes concentraciones (%; v/v en agua). Los valores se expresan como medias \pm desviaciones estándar ($n=10$). Letras diferentes al final de cada fase indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0,05$)). 163

Figura 34. Diagrama ombroclimático para la Variación mensual de la precipitación total acumulada (mm) y la temperatura media ($^{\circ}\text{C}$). 234

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Localización y datos generales de las estaciones meteorológicas empleadas en este trabajo.	48
Tabla 2. Localización geográfica e información general de las 12 parcelas de recolección de <i>C. ladanifer</i>	57
Tabla 3. Composición química (%) del aceite esencial de las 12 parcelas de <i>C. ladanifer</i> distribuidas en 4 poblaciones y dos tipos de suelo.	64
Tabla 4. Coeficientes canónicos, valores propios y varianza para el análisis CCA entre los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> y variables edáficas.	68
Tabla 5. Composición química (%) del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> en dos estados fenológicos y tres intervalos de edad.	86
Tabla 6. Composición química (%) del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> en tallos y hojas.	91
Tabla 7. Características del suelo y de las plantas de <i>C. ladanifer</i> en la zona de estudio.	105
Tabla 8. Composición físico-química del fertilizante orgánico empleado en el experimento.	105
Tabla 9. Composición química (%) del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> para los cuatro tratamientos y las tres fechas de recolección.	116
Tabla 10. Coeficientes canónicos, valores propios y varianza para el análisis CCA entre los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> y las variables morfológicas estimadas.	117
Tabla 11. Rendimiento en aceite esencial (%) para las dos poblaciones de <i>C. ladanifer</i> y los tres tratamientos de secado aplicados.	131
Tabla 12. Composición química (%) del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> para los tres tratamientos y las dos poblaciones.	133
Tabla 13. Composición química (%) y tiempo de retención (RT) del aceite esencial y el hidrolato de <i>C. ladanifer</i>	153

Tabla 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial a diferentes dosis de aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> y valores ED50 para las tres especies de hongos fitopatógenos y un oomiceto.	155
Tabla 15. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial a diferentes dosis de hidrolato de <i>C. ladanifer</i> y valores ED50 para las tres especies de hongos fitopatógenos y un oomiceto.....	157
Tabla 16. Efecto del hidrolato de <i>C. ladanifer</i> a diferentes dosis ($\mu\text{l/ml}$) sobre la mortalidad de plántulas de <i>L. luteus</i> causada por tres aislados de <i>P. cinnamomi</i> al final de la fase 2.....	158
Tabla 17. Composición química (%) del aceite esencial de las 12 parcelas de <i>C. ladanifer</i> distribuidas en 4 poblaciones y dos tipos de suelo (Tabla completa, Capítulo 3).....	212
Tabla 18. Composición química (%) del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> en dos estados fenológicos y tres intervalos de edad (Tabla completa, Capítulo 4).....	216
Tabla 19. Composición química (%) del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> en tallos y hojas (Tabla completa, capítulo 4).	219
Tabla 20. Composición química (%) del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> para los cuatro tratamientos y las tres fechas de recolección (Tabla completa, Capítulo 5)...	222
Tabla 21. Composición química (%) del aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> para los tres tratamientos y las dos poblaciones (Tabla completa, capítulo 6).....	227
Tabla 22. Variables edáficas estimas en las 12 parcelas de <i>C. ladanifer</i> distribuidas en 4 poblaciones y dos tipos de suelo.....	232
Tabla 23. Variables climáticas estimadas en las 12 parcelas de <i>C. ladanifer</i> distribuidas en 4 poblaciones y dos tipos de suelo.	233
Tabla 24. Variables climáticas estimadas en la población de Guijo de Granadilla.	235

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. (A)-muestras de aceite esencial de <i>C. ladanifer</i> . (B)-representación tipo de un tricoma glandular: (1)-célula basal; (2)-célula peduncular; (3)-células secretoras; (4)-aceite esencial acumulado; (5)-cutícula. Adaptado de Economou-Amilli et al., (1982).	27
Imagen 2. Diferentes partes de la plantas de <i>C. ladanifer</i> . (A)- hojas; (B)-flor; (C)-frutos; (D)-formación de Jaral tipo.	33
Imagen 3. Mapa de distribución de <i>Cistus ladanifer</i> en el sur de Europa y norte de África según GBIF (Global Biodiversity Information Facility).Puntos más oscuros indican mayor superficie.	34
Imagen 4. Diferentes situaciones de trabajo. (A)-estimación de la edad; (B)-recolección; (C)-transporte; (D)-secado; (E)-separación de hojas y tallos; (F)-extracción.	80
Imagen 5. Diferentes situaciones de trabajo. (A)-delimitación de parcelas de estudio; (B)-caracterización de los bloques; (C)-aplicación de riego; (D)-muestras de brotes empleados en el estudio bajo los cuatro tratamientos.	106
Imagen 6. Descripción de los ensayos. (A)-detalle de las cuatro especies fitopatógenas empleadas; (B)-medición del crecimiento micelial; (C)-efecto del hidrolato en el patosistema <i>P. cinnamomi</i> - <i>L. luteus</i> al comienzo de la fase 1; (D)-efecto del hidrolato en el patosistema <i>P. cinnamomi</i> - <i>L. luteus</i> durante el desarrollo de la fase 2; (E)-detalle de una plántula de <i>L. luteus</i> en fase 2; (F)-toma de datos en el laboratorio; (G)-efecto fitotóxico del hidrolato en <i>R. sativus</i>	151

RESUMEN

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles derivados del metabolismo secundario de plantas, que pueden contener entre 20 y 60 componentes en concentraciones muy diferentes y que se caracterizan por presentar un fuerte olor. Los aceites esenciales están presentes sólo en determinadas especies y no se consideran primordiales para el crecimiento y el desarrollo vegetal, pero desempeñan un papel importante en las interacciones de las plantas con el ambiente. De este modo, una reevaluación de sus funciones biológicas, ha derivado en importantes aplicaciones prácticas en el ámbito de la medicina, la nutrición o la cosmética.

Cistus ladanifer L. (Cistaceae) es un arbusto nativo de la Región Mediterránea, que se encuentra ampliamente distribuido en áreas degradadas y no cultivadas de la Península ibérica. En los últimos años, los productos derivados del metabolismo secundario de esta especie, entre los que destaca el aceite esencial, han despertado un gran interés no solo por sus propiedades aromáticas y fijadoras, sino también por su importancia biológica para la industria farmacológica y agroalimentaria. Sin embargo, como la mayoría de compuestos del metabolismo secundario, la producción de aceite esencial en la planta puede verse seriamente afectada por diferentes factores geográficos, genéticos, fisiológicos y ambientales.

En este contexto, el objetivo principal de la tesis se centró en determinar qué influencia ejercen estos factores tanto intrínsecos como extrínsecos a la planta sobre la producción de aceite esencial de *C. ladanifer*, con especial atención en aquellos compuestos de mayor importancia para la industria perfumera.

Para conseguir estos objetivos, se utilizaron cuatro diseños experimentales independientes, con ensayos tanto en campo como en laboratorio. En todos los casos, la extracción del aceite esencial se realizó por hidrodestilación con un aparato de tipo Clevenger, y la composición química del aceite esencial se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Para valorar la potencial aplicación como biofungicidas tanto del aceite esencial, como de un subproducto como el hidrolato, se evaluó la actividad antifúngica y fitotoxicidad *in vitro*.

Los resultados muestran que las poblaciones naturales de *C. ladanifer* en el norte de Extremadura presentan aceites esenciales con un contenido elevado en viridiflorol y

ledol, mientras que el compuesto α -pineno está en menores proporciones, lo que las confiere un alto potencial desde el punto de vista organoléptico. No obstante, se detectaron importantes variaciones en el rendimiento y la composición del aceite esencial entre poblaciones, y aunque en menor grado, también dentro de ellas. Estas variaciones se debían tanto a las características edáficas del suelo sobre el que se desarrollaron las plantas, como al componente genético del material vegetal. Los resultados obtenidos también mostraron que el efecto asociado al estado fenológico de la planta ejercía una mayor influencia sobre la producción de aceite esencial que aquel asociado a la edad. A su vez, la parte de la planta utilizada influye sustancialmente en la producción de aceite esencial, y por tanto, la proporción de cada órgano en la muestra influirá en la calidad final del producto. Por otro lado, el aporte de riego durante el verano modifica considerablemente la biomasa de la planta y su biosíntesis de aceite esencial, mientras que el aporte de fertilización no tiene un efecto sustancial sobre estas variables. Además, el secado previo del material vegetal no influyó significativamente en el rendimiento en aceite esencial, pero sí afectó a la composición química. En este sentido, estos resultados han ayudado a comprender el grado de importancia de los diferentes factores que determinan la biosíntesis del aceite esencial de *C. ladanifer*, lo que supone un avance que ayudará a predecir, controlar e incluso modelar su producción desde un punto de la calidad final del producto.

Finalmente, el aceite esencial y el hidrolato de *C. ladanifer* inhibieron fuertemente el crecimiento micelial de tres especies de hongos fitopatógenos y un oomiceto. Además, la aplicación de hidrolato resultó eficaz controlando la enfermedad causada por *P. cinnamomi* sobre *L. luteus* en un patosistema *in situ*. Sin embargo, en los ensayos de fitotoxicidad sobre *R. sativus* y *L. luteus*, el aceite esencial y el hidrolato mostraron efectos fitotóxicos dependientes de la dosis y de la especie. Por tanto, estos resultados muestran el potencial del hidrolato de *C. ladanifer* como biofungicida en el control de hongos fitopatógenos, lo que implicaría una revalorización económica del subproducto.

ABSTRACT

Essential oils are complex mixtures of volatile compounds derived from the secondary metabolism of plants. They can contain 20 to 60 of these components at different concentrations and they are characterized by a strong scent. In turn, essential oils are present only in certain species and are not considered essential for plant growth and development, but they play an important role in the interactions of plants with the environment. Hence, a reevaluation of its biological functions has revealed important practical applications of essential oils in the field of medicine, nutrition or cosmetics.

Cistus ladanifer L. (Cistaceae) is a native shrub from the Mediterranean region widely distributed in degraded and uncultivated areas of the Iberian Peninsula. Nowadays, there is an increasing interest on the products derived from the secondary metabolism of this species, especially essential oils, not only for their aromatic and fixing properties, but also for their biological importance for the pharmacological and agri-food industry. However, like most compounds of secondary metabolism, the production of essential oil in the plant can be seriously affected by different geographical, genetic, physiological and/or environmental factors.

In this context, the main goal of this thesis was to determine the effect of these factors on the production of essential oil by *C. ladanifer*, with special focus on those compounds that are important for the perfume industry.

To achieve these objectives, four independent experimental designs were set up, including field and laboratory tests. In all cases, the extraction of the essential oil was carried out by hydrodistillation with a Clevenger-type machine, and the chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). To assess the potential biofungicide application of both the essential oil and the by-product hydrolate, an in vitro assay was used to test their antifungal activity and phytotoxicity.

The results show that essential oils from natural populations of *C. ladanifer* in the north of Extremadura have a high content of viridiflorol and ledol and low content of α -pinene, which are translated into a high organoleptic potential. Still, important variations inter and intra populations were detected in the yield and composition of the essential oils. These variations were due to both the edaphic characteristics of the soil

and the genetic of the plant. The results also showed that the phenological state of the plant exerted a greater influence on the production of essential oil than the age of the plant. In turn, the part of the plant from which the essential oil is extracted, substantially influences the production of the essential oil, and hence, the proportion of each plant part in the sample influences the final quality of the product. On the other hand, irrigation during the summer (driest months) significantly modifies the plant biomass and the biosynthesis of essential oil, while no effect of fertilization is observed. When the plant material is dried before essential oil extraction, the chemical composition of the essential oil is significantly affected but not the yield. All these results provide new insights about how different environmental and management factors determine the biosynthesis of the essential oil of *C. ladanifer* that will further help to predict, control and even model its production with the aim of obtaining a quality product.

Additionally, the essential oil and hydrolate of *C. ladanifer* strongly inhibited the mycelial growth of three phytopathogenic fungal species and one oomycete. The application of hydrosol, in an in situ pathosystem, was effective in controlling the disease caused by *Phytophthora cinnamomi* on *Lupinus luteus*. However, the essential oil and the hydrolate, in phytotoxicity tests on *Raphanus sativus* and *Lupinus luteus*, showed dose- and species-dependent phytotoxic effects. These results show a potential of *C. ladanifer* hydrolate as biofungicide in the control of phytopathogenic fungi, which would imply an economic revaluation of the by-product.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos biológicos básicos de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden definir como mezclas complejas de compuestos volátiles derivados del metabolismo secundario de plantas, normalmente con un fuerte olor, raramente coloreados, solubles en disolventes orgánicos e insolubles en agua (Zuzarte & Salgueiro, 2015). De acuerdo con la “International Standard Organization” (ISO 9235: 2013) y la Farmacopea Europea (Council of Europe, 2010), un aceite esencial se define como “un conjunto de productos volátiles que se obtienen de materiales naturales por hidrodestilación o destilación por corriente de vapor o, si se trata de frutos de cítricos, por un proceso mecánico de extrusión, con un proceso posterior de separación de la fase acuosa” (Ríos, 2016). Además, estos aceites esenciales se pueden encontrar en diversos órganos de las plantas (flores, frutos, semillas, hojas, tallos y raíces), en los cuales se producen y almacenan en estructuras secretoras especiales que difieren en su morfología, estructura, función y distribución (Ríos, 2016). Estas estructuras secretoras especializadas minimizan el riesgo de autotoxicidad y pueden encontrarse en la superficie de los órganos de la planta (tricomas glandulares, células epidérmicas y osmóforos) o dentro de los tejidos vegetales (a menudo idioblastos, pero también cavidades y conductos secretores) (Franz & Novak, 2010) (Imagen 1).

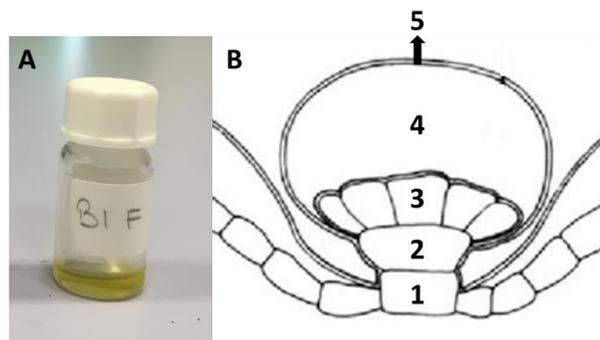


Imagen 1. (A)-muestras de aceite esencial de *C. ladanifer*. (B)-representación tipo de un tricoma glandular: (1)-célula basal; (2)-célula peduncular; (3)-células secretoras; (4)-aceite esencial acumulado; (5)-cutícula. Adaptado de Economou-Amilli et al., (1982).

En la naturaleza, mientras los metabolitos primarios son compuestos universales e indispensables para la vida, que se encuentran presentes en todos los organismos

Introducción general

vivos, los metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los aceites esenciales, están presentes sólo en determinadas especies y no se consideran primordiales para el crecimiento y desarrollo vegetal (Croteau et al., 2000). Sin embargo, estos metabolitos secundarios desempeñan funciones naturales muy importantes en los procesos de defensa y señalización de las plantas (Maffei, 2010). En este sentido, estos compuestos intervienen en la defensa de las plantas contra microorganismos, insectos o herbívoros, en la atracción de polinizadores y de animales dispersores de semillas, en la regulación del uso de agua y en las interacciones alelopáticas (Pichersky & Gershenzon, 2002). A su vez, estos metabolitos secundarios se clasifican en terpenoides, shikimatos, policétidos y alcaloides, siendo los dos primeros los más relevantes en los aceites esenciales (Croteau et al., 2000). Por otro lado, aunque los terpenos son más frecuentes y abundantes en los aceites esenciales, algunas especies contienen altas cantidades de fenilpropanoides, que cuando están presentes, proporcionan un aroma característico a la planta (Moghaddam & Mehdizadeh, 2017). Además, estos dos grupos de compuestos (terpenos y fenilpropanoides) se originan a través de rutas biosintéticas distintas (Figura 1).

Los terpenos son el resultado de la condensación de una unidad de pentacarbono con dos enlaces insaturados, el isopreno (2-metil-1,3-butadieno), por lo que muchas veces se denominan isoprenoides. Estos terpenos se clasifican en diferentes clases estructurales y funcionales. De este modo, de acuerdo al número de unidades de isopreno en su estructura, los terpenos pueden clasificarse en hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), etc. (Owen & Peñuelas, 2005). A su vez, los terpenos más comunes en el aceite esencial son los monoterpenos y sesquiterpenos (Bakkali et al., 2008). Además, la biosíntesis de terpenos implica dos precursores universales: el isopentenil pirofosfato (IPP) y el dimetilalil difosfato (DMAPP). En plantas superiores, el IPP a su vez se puede sintetizar a través de dos rutas metabólicas: la vía del mevalonato y la del metileritritol fosfato. La primera ruta tiene lugar en el citoplasma y conduce a la formación de la mayoría de los sesquiterpenos, mientras que la segunda ocurre en los cloroplastos, produciendo principalmente monoterpenos y diterpenos. Por otro lado, los fenilpropanoides contienen una o más unidades C_6-C_3 , siendo el C_6 un anillo de benceno. Estos fenilpropanoides se sintetizan a través de la vía del ácido shikímico, siendo sus principales precursores el ácido cinámico

y el ácido hidroxicinámico, originados a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, respectivamente (Croteau et al., 2000; Zuzarte & Salgueiro, 2015) (ver ruta detallada en la Figura 1).

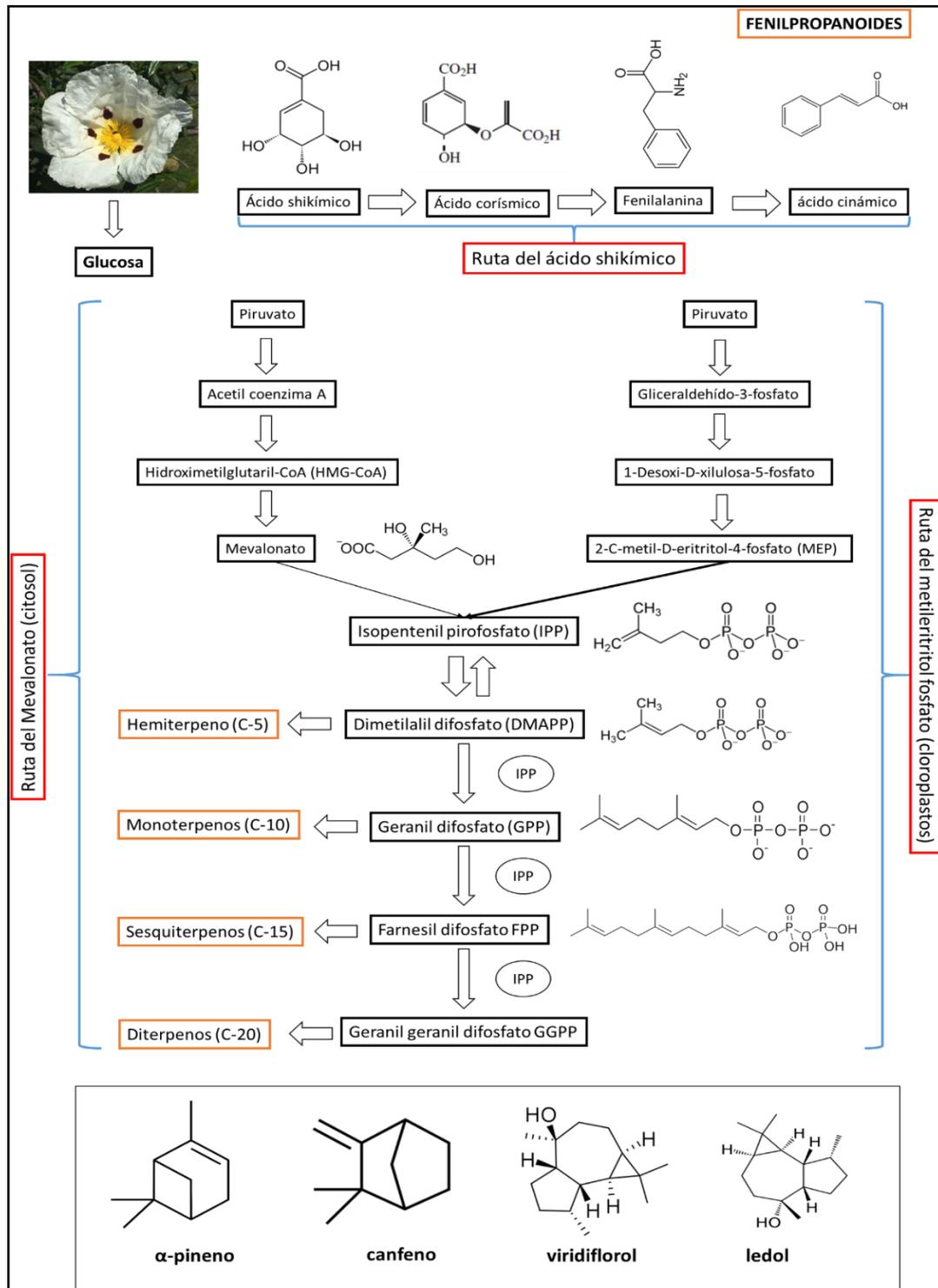


Figura 1. Ruta de biosíntesis de terpenoides y fenilpropanoides (Arriba). Terpenos mayoritarios en el aceite esencial de *C. ladanifer* (Abajo). Adaptado de Zuzarte & Salgueiro (2015) y Owen & Peñuelas (2005).

Introducción general

1.2. Aspectos productivos de los aceites esenciales

Las plantas aromáticas y medicinales (PAM) representan un extenso grupo de materias vegetales valoradas principalmente por sus componentes químicos. Desde la antigüedad, estas plantas se han utilizado para ayudar a restablecer y mantener la salud, conservar y dar sabor a los alimentos, proporcionar aromas naturales, y servir en rituales y ceremonias místicas (Inoue & Craker, 2014). Se estima que de las 422.000 especies de plantas documentadas en todo el mundo, alrededor de 70.000 han sido empleadas en medicina tradicional y más de 2.000 para aplicaciones en alimentos, cosméticos y preparados farmacéuticos (Máthé, 2015) (Figura 2). El comercio mundial de PAM como materia prima se estima en 440.000 toneladas anuales, con un valor total de 1.300 millones de dólares, de los cuales el 25% se comercializa en Europa (Lange, 2004; Máthé, 2015). El mercado mundial de medicamentos naturales o derivados de plantas crecerá de 29.400 millones de dólares en 2017 a unos 39.600 en 2022, con una tasa de crecimiento anual del 6,1% para el periodo 2017-2022 (BCC Research, 2017). De este modo, la industria basada en PAM es un sector prometedor y una fuente con un enorme potencial de crecimiento económico (Figura 3).

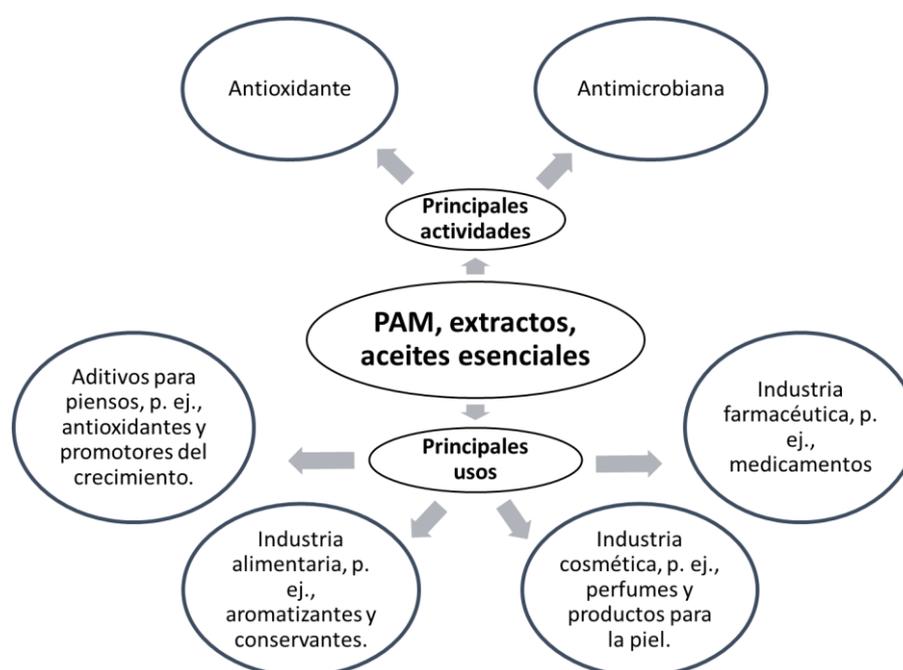


Figura 2. Actividades y usos de plantas aromáticas y medicinales. Adaptado de Christaki et al. (2012).

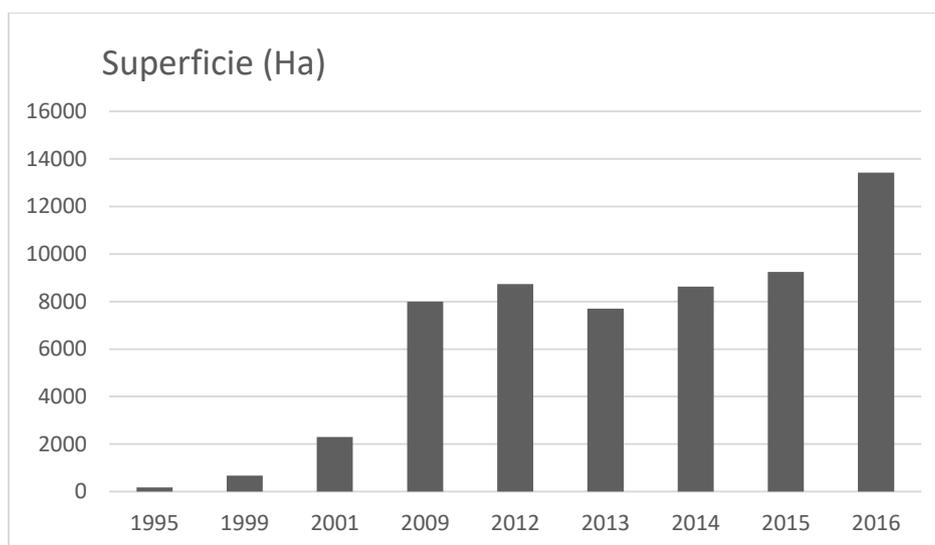


Figura 3. Evolución de la superficie destinada a cultivo de PAM en España desde 1995 a 2016 (MAPAMA).

Se estima que alrededor del 80% del suministro de materias primas de PAM que llega al mercado mundial procede de recolecciones silvestres (Asl Roosta et al., 2017). En este sentido, los bosques y sistemas agroforestales son la principal fuente de PAM, y estas plantas a su vez son una de las muchas categorías valiosas de productos forestales no madereros (PFNM), que incluyen alimentos y bebidas, forraje, perfumes, cosméticos, fibra, gomas, resinas y materiales ornamentales (FAO 2003) (M. R. Rao et al., 2004). No obstante, la explotación sostenible de estos productos silvestres es difícil de conseguir y certificar.

Las PAM mediterráneas constituyen un recurso fitogenético único, muy diverso y valioso, ampliamente explotado desde la antigüedad (Grigoriadou et al., 2020; Myers et al., 2000). En este sentido, esta flora mediterránea, y en particular nuestra especie de estudio (*Cistus ladanifer* L.), requiere una atención especial a la hora de estudiar y buscar nuevas vías para su explotación como pueden ser sus aceites esenciales. En la actualidad se conocen unos 3000 aceites esenciales pertenecientes a 10 familias botánicas, de los cuales 300 son importantes o valiosos desde el punto de vista comercial (Lubbe & Verpoorte, 2011). Además, alrededor del 90% de la producción mundial de aceites esenciales se destina a la industria cosmética y perfumera. Sin embargo, son conocidos también por presentar propiedades medicinales (analgésicas, sedantes, antiinflamatorias, antiespasmódico, anticancerígenas, etc.), antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas e insecticidas (Bakkali et al., 2008; Hyldgaard et al., 2012).

Introducción general

La producción mundial de aceites esenciales se estimó en 2017 en más de 150.000 toneladas, valoradas en unos 6.000 millones de dólares, lo que representa más del triple del volumen producido en 1990 (45.000 toneladas). A su vez, según varios análisis económicos recientes, se espera que el crecimiento continúe y en la próxima década se alcancen producciones de 370.000 toneladas anuales, valoradas en más de 10.000 millones de dólares (Barbieri & Borsotto, 2018; Lubbe & Verpoorte, 2011).

Por otro lado, como la mayoría de compuestos volátiles del metabolismo secundario, la producción de aceite esencial puede fluctuar en las sucesivas etapas del ciclo vital debido a factores genéticos, ontogénicos y climáticos (Verma et al., 2015). Además, diferentes situaciones de estrés biótico (patógenos, herbívoros, daños tisulares, etc.) o abiótico (sequía, elevadas temperaturas, alta radiación solar, falta de nutrientes, etc.) pueden provocar alteraciones en las tasas de biosíntesis de estos compuestos almacenados y/o emitidos (Maffei, 2010; Niinemets et al., 2004). Por tanto, el patrón de composición del aceite esencial, la concentración de sus compuestos individuales y el rendimiento pueden verse fuertemente afectados por factores tanto intrínsecos como extrínsecos a la planta (Zuzarte & Salgueiro, 2015).

La información genética del material vegetal, el estado de desarrollo y la parte utilizada son el conjunto de factores inherentes a la planta que influirán en la calidad final del aceite esencial. Además, otros factores externos como las condiciones ambientales de crecimiento (temperatura, pluviometría, fertilización, altitud, radiación, horas de luz, tipo de suelo o ubicación geográfica) y las de transformación y manipulación posterior (transporte, almacenamiento, métodos de secado y extracción, tiempo de destilación, métodos de cuantificación y condiciones de los análisis) pueden también modificar sustancialmente la producción de aceite esencial por parte de la planta (Barra, 2009; Figueiredo et al., 2008). De este modo, la manera en que todos estos factores afectan a la calidad y la cantidad de aceite producido depende básicamente de la especie, de la parte de la planta en la cual el principio activo se acumula y de las rutas metabólicas implicadas en la producción de los compuestos de interés. Por tanto, la calidad de los aceites esenciales no es fácil de garantizar y la gran variabilidad química mostrada es uno de los principales problemas para la industria, ya que puede limitar la calidad, seguridad y eficacia de sus diferentes aplicaciones (Zuzarte & Salgueiro, 2015).

1.3. Aspectos botánicos y ecológicos de *C. ladanifer*

La familia Cistaceae es una de las más representativas de la flora mediterránea, con cinco géneros (*Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum* y *Tuberaria*) que constituyen los principales representantes del matorral arbustivo. El género *Cistus*, con 16 especies, es especialmente destacado en dicha vegetación Mediterránea. Además, este género alcanza su mayor diversidad y abundancia en la Península Ibérica, en donde habitan 12 de las 16 especies, entre las que destaca por su importancia y extensión *C. ladanifer* (Talavera et al., 1993; Demoly & Montserrat, 1993).



Imagen 2. Diferentes partes de la plantas de *C. ladanifer*. (A)- hojas; (B)-flor; (C)-frutos; (D)-formación de Jaral tipo.

C. ladanifer es un arbusto que puede alcanzar 2,5 m de altura, erecto y muy aromático (Bolaños & Guinea, 1949) (Imagen 2). A su vez, se trata arbusto perenne originario de la Península Ibérica, que se encuentra ampliamente distribuido por la zona Mediterránea occidental, desde el sur de Francia hasta el norte de Marruecos y Argelia (Imagen 3). En la Península se encuentra distribuida desde el nivel del mar hasta 1500 m de altitud. Además, Andalucía Occidental, Extremadura y en las zonas occidentales de Madrid, Castilla La Mancha y Castilla y León son las zonas de mayor abundancia en España, tornándose más rara en el norte de Galicia, Asturias, País Vasco, Aragón, Murcia, País Valenciano y Cataluña (Bolaños & Guinea, 1949; Demoly y Montserrat, 1993; Núñez, 1989).

Introducción general

Esta especie puede formar poblaciones muy densas que se integran principalmente sobre suelos pobres silíceos o ácidos de origen pizarroso, granítico o arenoso (Frazão et al., 2018). A su vez, es predominante en los matorrales de suelos ácidos oligotróficos de la mitad occidental de la Península Ibérica (Rivas Martínez, 1979), pero puede tolerar también suelos calcáreos (Demoly & Montserrat, 1993). Además, presenta una fuerte adaptación a condiciones climáticas muy diversas y extremas, siendo capaz de soportar estrés por heladas, sequía, alta exposición solar y elevadas temperaturas durante periodos más o menos largos del año (Núñez, 1989). Es considerada una especie pirófito, que suele formar grandes masas de matorral que a su vez liberan compuestos fitotóxicos que pueden inhibir la germinación de otras especies vegetativas del sotobosque herbáceo (Alías et al., 2020; Chaves & Escudero, 1997; Herranz et al., 2006). De este modo, *C. ladanifer* elimina la competencia, y se convierte en una especie colonizadora de áreas fuertemente perturbadas por el hombre, tales como bosques quemados o deforestados, zonas marginales y cultivos abandonados (Frazão et al., 2018).

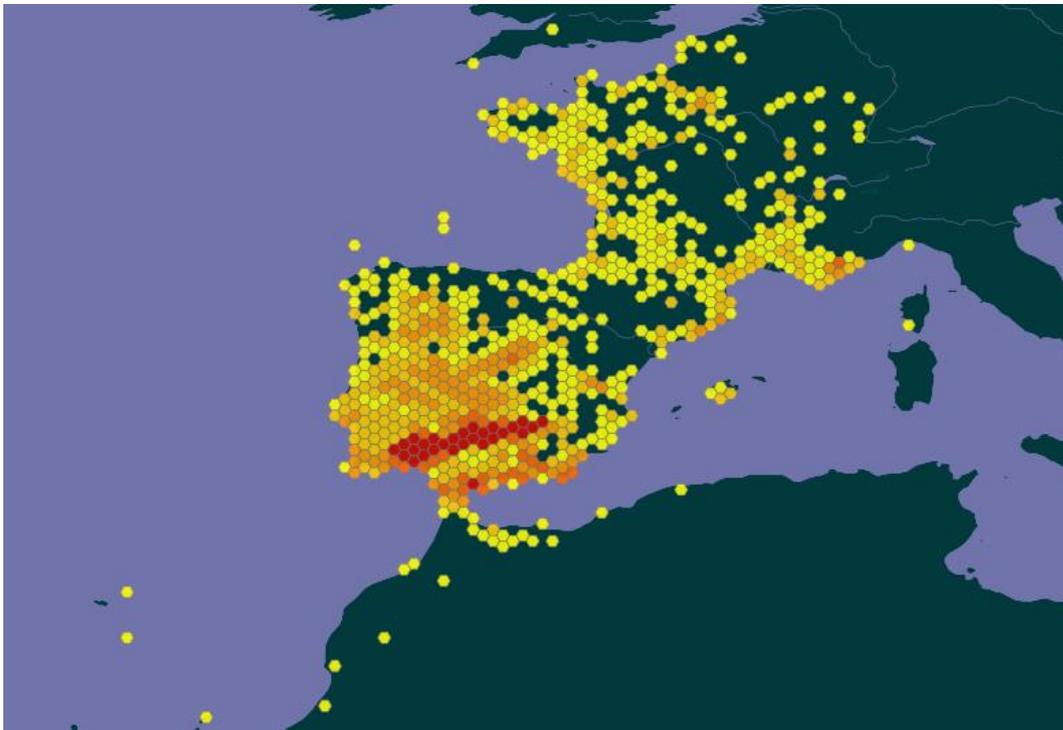


Imagen 3. Mapa de distribución de *Cistus ladanifer* en el sur de Europa y norte de África según GBIF (Global Biodiversity Information Facility). Puntos más oscuros indican mayor superficie.

1.4. Aspectos productivos de *C. ladanifer*

En España se encuentran las mayores extensiones de matorral silvestre de *C. ladanifer*, donde, según estimaciones recientes, la especie está presente en más de 2 millones de hectáreas y es dominante aproximadamente en 460.000 ha (Mediavilla et al., 2021). Sin embargo, a pesar de su extensión y del potencial industrial descrito como fuente de resinas y aceites esenciales, se estima el uso global de *C. ladanifer* en unas 10.000-20.000 toneladas al año, con el 80 % de la producción concentrada en Andalucía (España) (Alves-Ferreira et al., 2019). Por lo tanto, podemos considerar que *C. ladanifer* como fuente potencial de materia prima industrial está todavía infraexplotada en gran parte del territorio español.

Desde la antigüedad, *C. ladanifer* ha sido utilizada como incienso y en medicina tradicional como antiinflamatorio, antiulcerogénico, antitumoral, vasodilatador y antiespasmódico (Barrajón-Catalán et al., 2016; Papanikolaou et al., 2014). Esta especie es conocida como “Jara pringosa” debido a la peculiaridad que presentan sus tallos y hojas de secretar una sustancia pegajosa denominada ládano. Esta resina es rica en compuestos de gran valor, y ha sido extraída tradicionalmente en países como Francia, España y Portugal, para ser empleada principalmente en la industria perfumera debido a sus excelentes propiedades aromáticas y fijadoras (Moyler & Clery, 2005). Además, algunos compuestos del ládano constituyen una importante alternativa al ámbar gris, que es un producto bastante escaso y muy cotizado en perfumería que se obtiene de una fuente animal protegida (el cachalote) (Frazão et al., 2018). A su vez, varios estudios han atribuido a estos productos de *C. ladanifer* efectos antimicrobianos, antioxidantes, antitumorales, analgésicos, neuroprotectores y fitotóxicos (Barrajón-Catalán et al., 2010; Chaves & Escudero, 1997; Herranz et al., 2006; Loizzo et al., 2013). En los últimos años, otros productos obtenidos de *C. ladanifer* como el aceite esencial han visto incrementado su interés no solo por su uso potencial en cosmética (Gomes et al., 2005), sino también en medicina y agroalimentación (Barrajón-Catalán et al., 2016; Benali et al., 2020; Zidane et al., 2013) (Figura 4).

Introducción general

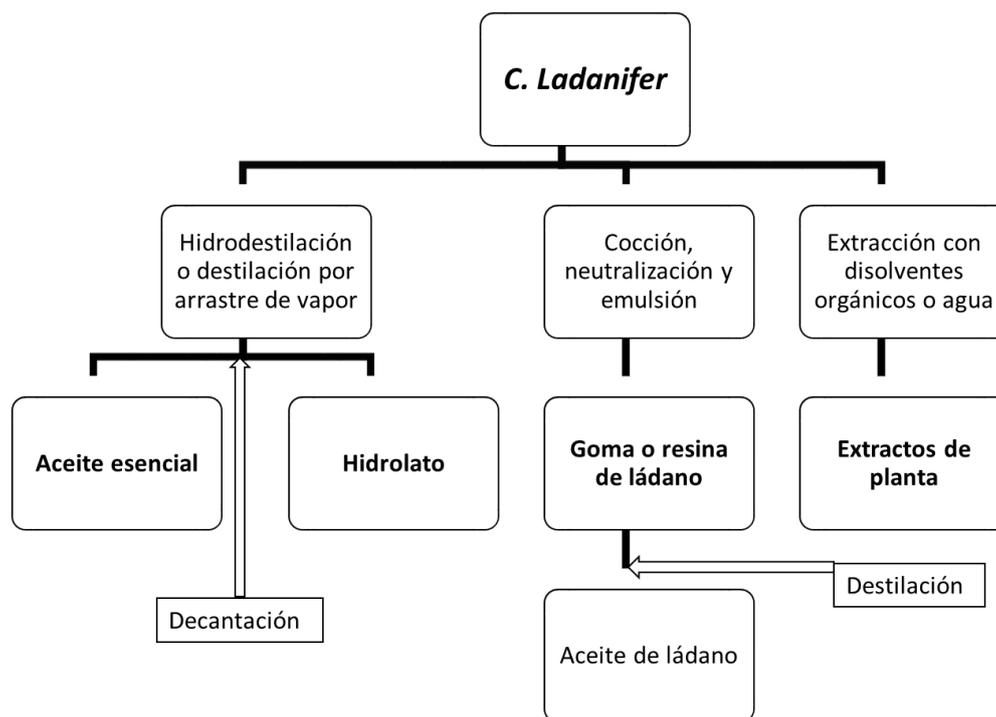


Figura 4. Principales productos comerciales y procesos de extracción de *C. ladanifer*.

De las diferentes referencias encontradas en la literatura se deduce que esta especie presenta una gran variabilidad en cuanto al rendimiento y composición química de sus aceites esenciales. El aceite esencial se ha obtenido principalmente por hidrodestilación o destilación al vapor de hojas y los tallos, y los rendimientos reportados son en general bastante bajos. En estudios a nivel de laboratorio empleando un aparato tipo Clevenger como en nuestro caso, los rendimientos en aceite esencial oscilaban entre un 0,14-0,63 %, pero para material vegetal con unas condiciones preliminares en ocasiones diferentes y poco comparables (Guimarães et al., 2010; Zidane et al., 2013). Por otro lado, en cuanto al rendimiento obtenido a escala industrial, aunque se han publicado pocos estudios, la mayoría coinciden en rendimientos entre el 0,01-0,1 % (Mediavilla et al., 2021; Tavares et al., 2020). No obstante, este bajo rendimiento que presenta la planta podría verse compensado a nivel productivo por el elevado precio que puede alcanzar este aceite esencial en el mercado, ya que puede superar los 400 euros/kg. Además, aunque Lubbe & Verpoorte (2011) estimaron una producción mundial de aceite esencial de *C. ladanifer* que superaba las 50-100 t/año,

parece más realista la estimación de 1-10 t/año aportada por Mediavilla et al. (2021) en base a datos recopilados de varias empresas.

En cuanto a la composición química, el aceite esencial de *C. ladanifer* ha demostrado ser extremadamente complejo, detectándose en algunos casos hasta 300 compuestos diferentes, la mayoría de los cuales sólo están presentes en cantidades traza (Mariotti et al., 1997). Estos autores a su vez encontraron una elevada variabilidad intraespecífica en estas plantas cultivadas en Córcega pero que provenían de España, con α -pineno (2,1-47 %), canfeno (0,7-5,2 %), trans-pinocarveol (4,4-10,9 %), viridiflorol (4,7-22,6 %) y ledol (1,5-6,4 %) como compuestos principales de estos aceites (≥ 5 % en alguna muestra). Otro estudio en Francia, que comparaban las dos variedades de *C. ladanifer* subsp. *ladanifer* (var *albiflorus* y *maculatus*), mostró un aceite esencial con predominio también de los compuestos α -pineno (136,3-220,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y viridiflorol (51,5-79,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Robles et al., 2003). Unos años antes en 1984, Gülz et al. (1984) reportaron en muestras de Alemania un aceite esencial con mayor proporción en este caso de α -pineno (43,2 %), canfeno (12,2 %) y δ -cadineno (6,6 %). A su vez, el aceite esencial del norte de Marruecos se caracterizó por contener como compuestos mayoritarios 1,8-cineole (19,3 %), γ -terpineno (6,1 %) y viridiflorol (16,4 %) (Viuda-Martos et al., 2011). En Portugal, (Gomes et al., 2005) encontraron viridiflorol (13,6-17,4 %) como compuesto principal en el aceite de dos sitios diferentes, mientras que el análisis de tres muestras comerciales mostró muy alto porcentaje en este caso de α -pineno (12,8-50,4 %). Finalmente, el aceite esencial de muestras procedentes de la zona de Guadalajara (España) mostró un contenido muy elevado de α -pineno (46,7-49,7 %) en comparación con el siguiente componente mayoritario, el viridiflorol (10-12,5 %) (Mediavilla et al., 2021).

Por su importancia desde el punto de vista organoléptico para la industria perfumera, además de los compuestos viridiflorol y ledol, otros compuestos de relativa importancia en el aceite citados son el 2-2-6-trimethylcyclohexano, ambrox, oxoisoambrox, sclareolóxido y sobre todo el 15-nor-labdan-8-ol (Gomes et al., 2005). La importancia de alguno de estos compuestos se asocia con su fuerte olor a ámbar, característica muy apreciada y demandada por la industria perfumera (Weyerstahl et al., 1998). Así mismo, se han atribuido varias actividades biológicas al aceite esencial de *C. ladanifer*, tales como por ejemplo, propiedades antimicrobianas, antioxidantes,

Introducción general

antiinflamatorias o fitotóxicas (Benali et al., 2020; El Karkouri et al., 2021; Greche et al., 2009; Rossi et al., 2007; Tavares et al., 2020; Verdeguer et al., 2012; Zidane et al., 2013).

2. OBJETIVOS DE LA TESIS

Una vez descrito el potencial productivo que presenta *C. ladanifer* para la obtención de bioproductos de alto valor industrial, especialmente en el oeste de la Península Ibérica y más concretamente en el norte de Extremadura, se planteó esta Tesis doctoral con el objetivo principal de aumentar el conocimiento sobre aquellos factores más influyentes en la producción del aceite esencial de esta especie. A su vez, este objetivo general se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar químicamente los aceites esenciales de diferentes poblaciones naturales de *C. ladanifer* del norte de Extremadura.
2. Conocer la variabilidad química interpoblacional e intrapoblacional en estas poblaciones naturales, y determinar su relación con el ambiente edafoclimático de la zona.
3. Evaluar la variación química del aceite esencial en función de factores intrínsecos a la planta como el estado fenológico, la edad o la parte de la planta utilizada, para poder establecer las mejores condiciones de cosecha.
4. Estudiar la respuesta bajo condiciones naturales del aporte de riego y fertilización en la producción de aceite esencial a lo largo de todo el periodo tradicional de cosecha de la especie.
5. Determinar la posibilidad de un secado del material vegetal previo a la destilación que asegure la mejor calidad del aceite esencial.
6. Evaluar la actividad antifúngica y fitotóxica tanto del aceite esencial como de un subproducto de la destilación como el hidrolato, con el objetivo de incluirlos como biofúngidas en las nuevas estrategias de gestión integral de plagas.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

1. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

El método de extracción utilizado en este trabajo ha sido la hidrodestilación (arrastre de vapor con cohobación) con un aparato de tipo Clevenger modificado (Clevenger, 1928) (ver figura 5), como describe la Real Farmacopea Española para drogas vegetales (Council of Europe, 2010). En este método, el material vegetal secado previamente (excepto en un estudio puntual que se indicara más adelante) fue troceado manualmente con unas tijeras de poda e introducido en un matraz de vidrio de 6 litros de capacidad. La cantidad de material vegetal empleada para cada muestra varió entre 100-200 gramos dependiendo del estudio. A continuación, se añadió agua suficiente al matraz hasta cubrir la totalidad de la muestra (2 litros) y cloruro sódico (NaCl), para aumentar el punto de ebullición del agua y favorecer la extracción de los compuestos. El matraz se coloca en una manta térmica y se le acopla la cabeza de destilación, calentando a temperatura constante hasta ebullición y manteniéndose en este estado durante todo el proceso. El vapor de agua producido arrastra los compuestos volátiles liberados tras romperse las cutículas de las glándulas y ascienden por la columna hasta llegar al refrigerante, donde se condensan por distinta densidad e inmiscibilidad con el agua. El proceso se mantuvo en ebullición durante 3 horas hasta agotar la esencia. El aceite esencial obtenido fue medido en volumen y recogido en viales de vidrio de 2ml con sulfato sódico anhidro (MgSO₄) como agente desecante. Cada vial fue debidamente etiquetado y almacenado en condiciones de oscuridad a -18°C hasta su posterior análisis químico.

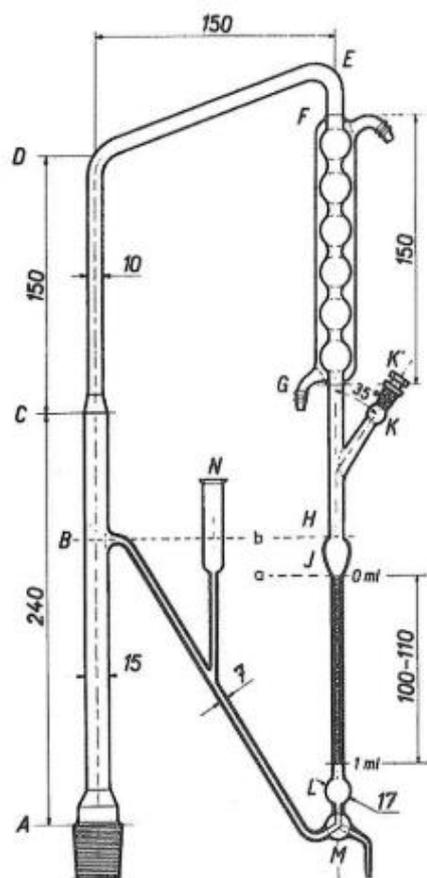


Figura 5. Cabeza de destilación de Clevenger modificada para la determinación de drogas vegetales (Real Farmacopea Española, 2010). Dimensiones en mm.

2. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD Y CÁLCULO DE RENDIMIENTO

El contenido de humedad (porcentaje de agua en las muestras) fue determinado mediante el método de secado en estufa para biocombustibles sólidos (Parte 2: humedad total-método simplificado) que marca la norma UNE-EN ISO 18134-2:2017. Se pesaron 10 gr de muestra troceada sobre un recipiente previamente pesado en una balanza de precisión a 0,001 gr. A continuación, el recipiente con el material se introdujo en una estufa a 105 ± 2 °C durante 24 horas, y transcurrido ese tiempo se volvió a pesar el conjunto (recipiente + muestra) en un periodo no superior a los 10-15 segundos de sacarlo para evitar la absorción de humedad ambiental por parte de la muestra. El contenido de humedad en porcentaje se calculó:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(P_i - (P_f - P_r))}{P_i} * 100$$

Donde:

Pi: peso inicial de la muestra.

Pf: peso final de la muestra.

Pr: peso del recipiente.

Una vez obtenido el porcentaje de humedad de cada muestra, se restó este porcentaje de agua a la cantidad de muestra destilada a través de la siguiente ecuación:

$$Pms = Pmh - \frac{(Pmh * H)}{100}$$

Donde:

Pms: peso en gramos de la muestra seca.

Pmh: peso en gramos de la muestra destilada.

H: % de humedad de la muestra.

Por último, con el volumen de aceite esencial obtenido se calculó el rendimiento expresado en mililitros por cada 100 gramos de material vegetal seco destilado (% v/P) de la siguiente forma:

$$Rdto = \frac{AE * 100}{Pms}$$

Donde:

Rdto.: Rendimiento en aceite esencial por 100 gramos de muestra seca.

AE: ml de aceite esencial.

Pms: peso en gramos de la muestra seca.

3. ANÁLISIS QUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL

La determinación de los compuestos químicos presentes en el aceite esencial se realizó utilizando la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS). Los análisis descritos en esta parte experimental fueron realizados en el área de Cultivos de Secano para el Desarrollo Rural perteneciente al Departamento de Desarrollo Rural, Enología y Agricultura Sostenible del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA).

Los análisis se realizaron con un cromatógrafo de gases (GC) Agilent HP 6890 equipado con una columna HP-5 de 30m de longitud, 0,25mm de diámetro interno y un

Materiales y métodos generales

espesor recubriendo la pared interna de 0,25 μm . Como gas portador se empleó Helio, trabajando en condiciones de presión constante (elución de β -ionone a 27.60 min para HP-5MS) y ajustando el divisor de flujo a 100:1. El detector de espectrometría de masas acoplado fue un modelo Agilent 5972 (Agilent, Palo Alto, CA). En la fase estacionaria, la temperatura inicial del horno fue de 60 °C, con una rampa de calentamiento de 2,5 °C/min hasta alcanzar los 155 °C, que finalmente ascendió a 250 °C con una rampa de 10 °C/min. El puerto de inyección y la línea de transferencia al detector de masas se mantuvieron a 250 y 280 °C, respectivamente. La energía de ionización fue de 70 eV, con un rango de masas (m/z) de 50–350 (3.21 scan/s). La temperatura del cuadrupolo se mantuvo a 150 °C y el voltaje del multiplicador a 1300 V. La inyección de aceite puro fue de 0.1 μL .

La identificación individual de los compuestos presentes en el aceite esencial se ha realizado comparando los Índices de Retención de Kovats (IK) calculados con índices publicados en la bibliografía (Adams, 2007; Babushok et al., 2011; Costa et al., 2009; Weyerstahl et al., 1998). Estos índices se calcularon relacionando los tiempos de retención obtenidos para una muestra de aceite esencial, con aquellos obtenidos para una serie de n-alcenos (C6-C17) inyectada bajo las mismas condiciones de trabajo que las descritas en el aceite. Mediante CG-MS se identificaron los compuestos por comparación de su espectro de masas con aquellos incluidos en la librería NBS75K.

El porcentaje de composición relativa (%) de cada compuesto individual se calculó dividiendo cada área de pico individual entre el área total del cromatograma (Figura 6). Los resultados objeto de análisis en este estudio han sido solo aquellos compuestos denominados mayoritarios en la muestra, que representan un porcentaje relativo igual o superior al 1% en alguno de los análisis realizados. No obstante, los resultados completos detallados con todos los componentes identificados son expuestos en forma de Tablas en el Anexo 1.

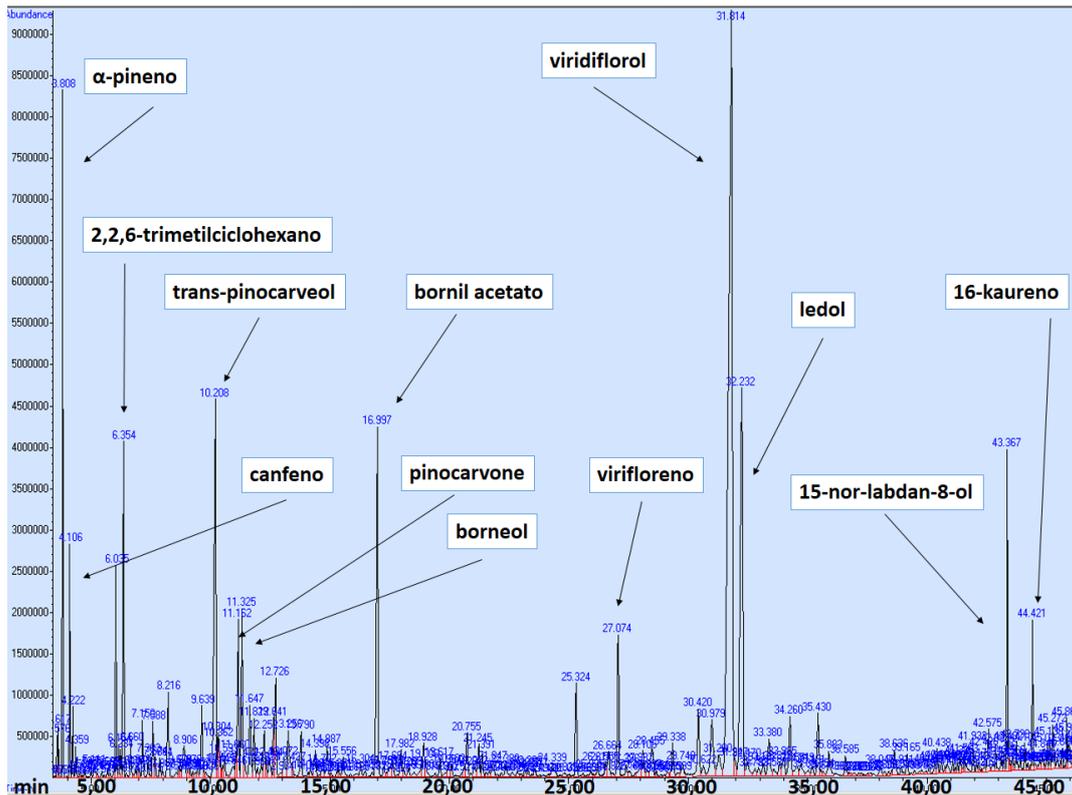


Figura 6. Posición en el cromatograma de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *C. ladanifer*.

4. DATOS EDAFOCLIMÁTICOS

Se determinaron las características edafológicas y climáticas de las diferentes áreas de estudio sobre las que se desarrollaban las plantas. De este modo es posible determinar qué parte de la variabilidad encontrada en las muestras puede ser debida a estos dos factores ambientales. La metodología para extraer las muestras de suelo consistió en un muestreo simple al azar con 5 puntos (submuestras) repartidos en zigzag por toda el área de estudio. Con la ayuda de una azada se limpió la parte superficial de suelo (5 cm aproximadamente) y, a continuación, se tomaron muestras hasta una profundidad aproximada de 30 cm empleando una barrena para ello. Cada una de las 5 submuestras tomadas con un peso aproximado de 200 gramos, fueron mezcladas homogéneamente hasta componer una única muestra de 1 kg de suelo.

Los variables obtenidas en los análisis de suelo se enumeran a continuación, junto con la técnica o metodología empleada marcada entre paréntesis: pH (electrometría), conductividad (conductimetría), nitrógeno total (Método Kjeldahl),

Materiales y métodos generales

materia orgánica (Método Walkley-Black), C.I.C (Método Acetato de Amonio 1N), fósforo asimilable (Método Olsen) y textura (Método Boyoucos). Los resultados derivados de estos análisis para cada uno de los estudios son expuestos en forma de Tablas en el apartado 1 del Anexo 2 o su capítulo correspondiente si procede.

Además, se tomaron datos climáticos diarios de las 5 estaciones meteorológicas más cercanas a las diferentes áreas de estudio y durante los 8 años previos (2013-2020) a la realización del trabajo (con los años de estudio incluido). Se seleccionó este intervalo de tiempo por coincidir con el periodo de crecimiento aproximado de las plantas recolectadas en cada estudio. Todas las estaciones se encontraban a una distancia aproximada entre 2-13 km a las áreas de estudio. Los datos de las estaciones meteorológicas junto con la población más cercana ensayada se detallan en la Tabla 1. Los datos proporcionados pertenecían a las variables climáticas temperatura, precipitaciones, humedad relativa y velocidad del viento. Con los datos de precipitación y temperatura proporcionados se han realizado cuando fue necesario los correspondientes diagramas ombroclimáticos para cada área de estudio (los años empleados dependieron de las características concretas de cada estudio). Estos resultados se detallan en el apartado 2 del Anexo 2.

Tabla 1. Localización y datos generales de las estaciones meteorológicas empleadas en este trabajo.

Población	Estación meteorológica	Distancia (Km)	Altitud	Latitud	Longitud
Pozuelo de Zarzón	Montehermoso	13	351	40°04'51''N	06°20'20''W
Valverde del Fresno	Valverde del Fresno	2	450	40°12'26''N	06°53'46''W
Torre de Don Miguel	Torrecilla de los Ángeles	11	459	40°15'18''N	06°24'42''W
Villasbuenas de Gata	Hoyos	9	560	40°10'29''N	06°43'28''W
Guijo de Granadilla	Guijo de Granadilla	2	393	40°11'30''N	06°09'56''W
Centro de trabajo	Plasencia	3	515	40°02'35''N	06°05'09''W

CAPÍTULO 3

Variabilidad en el rendimiento y la composición química de aceites esenciales de *C. ladanifer* obtenidos de diferentes poblaciones y su relación con factores edáficos

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Cistus* L., comúnmente conocidas como jaras, son un grupo de arbustos nativos de la Región Mediterránea pertenecientes a la familia Cistaceae (Barrajón-Catalán et al., 2016). En España se encuentran presentes 12 especies de este género *Cistus* L., que son muy apreciadas por la industria perfumera debido a las propiedades aromáticas de sus aceites esenciales (Palá-Paúl et al., 2005). Además, en algunas especies como *Cistus ladanifer* L., las hojas jóvenes y tallos se encuentran recubiertas de una oleorresina llamada ládano, empleada como fijador natural de perfumes y como fragancia alternativa al ámbar gris (Greche et al., 2009; Raimundo et al., 2018).

C. ladanifer es un arbusto de 1-2 m de altura, que crece en suelos silíceos ácidos y en altitudes inferiores a los 1000 m Gomez-Serrano et al. (1993). En el oeste y sur de la Península Ibérica se estima que *C. ladanifer* se extiende por una superficie superior a los 2 millones de hectáreas (Alves-Ferreira et al., 2019). Esta planta puede crecer en climas muy diversos y se caracteriza por su alta resistencia a la sequía, a la exposición solar y a elevadas temperaturas. A su vez, está asociada con perturbaciones y es considerada una especie pirófito, por lo que suele ocupar grandes áreas de matorral denso en bosques quemados, cultivos abandonados y zonas marginales (Frazão et al., 2018). Además, esta especie puede eliminar su competencia y convertirse en una especie colonizadora a través de la producción de compuestos alelopáticos que inhiben el crecimiento de otras plantas (Alías et al., 2020; Delgado et al., 2008; Herranz et al., 2006).

Los incendios forestales causan enormes daños en los ecosistemas mediterráneos cada año (Martín-Pinto et al., 2006). Además, en un contexto actual de cambio climático, donde se prevé que la recurrencia y virulencia de los incendios forestales aumente, especialmente en el área mediterránea, son necesarias nuevas estrategias de manejo forestal que contemplen estos escenarios y reduzcan sus riesgos (Vázquez et al., 2015). De este modo, algunas de las alternativas planteadas para mitigar estos efectos se basan en reducir el combustible mediante el desbroce de matorrales (González-González et al., 2017). Sin embargo, las diferentes operaciones de eliminación

Capítulo 3

de biomasa forestal, en general, son costosas y requieren una gran cantidad de recursos económicos (Lasanta et al., 2018; Verkerk et al., 2018). Por ello, dada la necesidad de avanzar hacia una economía verde y circular, es necesario desarrollar bioproductos de alto valor añadido a partir de esta biomasa favoreciendo la prevención de incendios.

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles derivados del metabolismo secundario de plantas aromáticas, que pueden contener entre 20 y 60 componentes en concentraciones muy diferentes y que se caracterizan por presentar un fuerte olor (Nazzaro et al., 2017). En la actualidad, se conocen aproximadamente 3000 aceites esenciales, de los cuales 300 son comercialmente importantes para la industria perfumera, agroalimentaria y farmacéutica, debido a su fácil disponibilidad, modo de acción seguro y su ampliamente estudiada actividad biológica (León-Méndez et al., 2019). Los terpenos son los constituyentes principales de los aceites esenciales, y en las plantas están asociados con funciones de protección frente a infecciones, parásitos y situaciones de estrés, así como atrayentes de polinizadores (Bakkali et al., 2008).

Varios estudios han mostrado que los compuestos α -pineno, viridiflorol, pinocarveol, p-cymeno, canfeno, bornil acetato y ledol son mayoritarios en el aceite esencial de *C. ladanifer* (Tavares et al., 2020). Sin embargo, la composición química de estos aceites esenciales varió significativamente en función de las diferentes regiones de procedencia del material vegetal (Gomes et al., 2005; Mediavilla et al., 2021; Robles et al., 2003; Verdeguer et al., 2012; Viuda-Martos et al., 2011). Por otro lado, Mariotti et al. (1997) encontraron también una gran variabilidad intraespecífica en 20 individuos de *C. ladanifer* originarios de España y cultivados en Córcega. Se ha demostrado que estas variaciones encontradas en los aceites esenciales pueden estar asociadas a factores ambientales, variaciones geográficas y características genéticas (Barra, 2009; Figueiredo et al., 2008). Por lo tanto, debido al efecto que imponen estos factores, las plantas que crecen bajo diferentes condiciones pueden ver modificada su composición química, dando lugar a productos comerciales con calidades heterogéneas y no definidas.

En la actualidad, no conocemos estudios que hayan evaluado la variabilidad inter e intrapoblacional de los aceites esenciales de *C. ladanifer* L., y que además, hayan

asociado esta variabilidad con factores ambientales. Por tanto, el trabajo se centró en responder a las siguientes preguntas:

(1) ¿Existen variaciones intra e interpoblacionales en el rendimiento y la composición química del aceite esencial?

(2) ¿Qué factores podrían estar implicados en estas variaciones?

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Breve descripción del área de estudio

El área de estudio se sitúa en el noroeste de la provincia de Cáceres, más concretamente en la Comarca de Sierra de Gata y zonas limítrofes (Figura 7). La zona presenta un clima mediterráneo subhúmedo, caracterizado por inviernos lluviosos y templados y veranos secos y calurosos. La precipitación media anual es elevada (oscila entre los 800 y los 1300 mm), mientras que la temperatura media anual muestra valores suaves que se sitúan entre los 13 y los 16 °C. La altitud en la zona va desde los 250-300 m en las zonas más bajas hasta los 1500 m de las zonas más elevadas de la sierra. Los suelos predominantes en la zona por orden de significación son Luvisoles, Cambisoles y Umbrisoles, que su vez se encuentran asentados principalmente sobre los siguientes materiales geológicos: Granitos/Leucogranitos, Pizarras/Grauwacas, Areniscas/Conglomerados y Aluviales/Coaluviales. La vegetación predominante en la zona se corresponde con formaciones naturales de Quercíneas (*Quercus pyrenaica*, *Quercus ilex* y *Quercus suber*), seguido por grandes extensiones de especies de repoblación altamente inflamables como el pino (*Pinus pinaster*). No obstante, las zonas de matorral y cultivo representan un 52 % de la superficie total la zona. Por esta razón, la zona se encuentra catalogada como de alto riesgo de incendio, debido en parte a estas grandes masas continuas de vegetación forestal y de matorral, que se han visto afectadas por grandes incendios desde el año 2003.

Capítulo 3

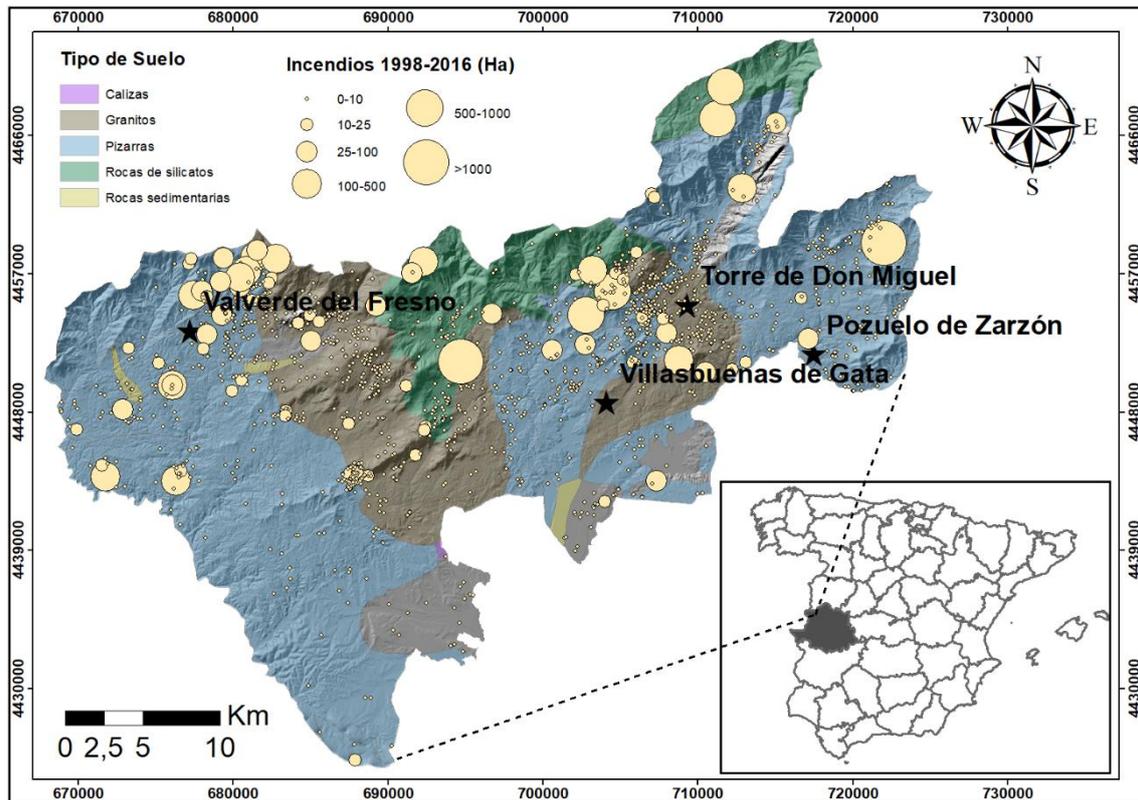


Figura 7. Mapa de localización de las cuatro poblaciones de estudio asociadas al tipo de suelo y recurrencia de incendios.

2.2. Diseño experimental y material vegetal

Se seleccionaron 12 localizaciones (parcelas) distribuidas en 4 poblaciones naturales de *C. ladanifer* (Valverde del Fresno, Pozuelo de Zarcón, Torre de Don Miguel y Villasbuenas de Gata) localizadas en el noroeste de Extremadura. Las tres parcelas dentro cada población estaban separadas una distancia mínima de 500 m unas de otras y se caracterizaban por tener masas monoespecíficas de jaral en todas su extensión. Además, para determinar la influencia del factor edáfico en la producción de aceite esencial, dichas parcelas fueron seleccionadas bajo el criterio de estar situadas sobre los dos tipos de materiales líticos (pizarra y granito) más extendidos sobre los que se asienta el recurso en Extremadura. Por último, todas las parcelas seleccionadas se encuadraban dentro del piso bioclimático supra-mediterráneo (Rivas-Martínez et al., 2002), con unas condiciones de latitud y altitud similares (ver Tabla 2).

En cada una de estas 12 parcelas, se tomaron 5 puntos de muestreo repartidos aleatoriamente en cada zona (60 puntos de muestreo en total), en los cuales, se

recolectaron a finales de agosto (periodo de fructificación) de 2018 las partes aéreas jóvenes (tallos, hojas y frutos) de un mínimo de 20 pies individuales seleccionadas al azar. Este material fue mezclado homogéneamente en campo (1 muestra por punto de muestreo), transportado al centro de trabajo, extendido (zona aireada y sin humedad) y secado a temperatura ambiente. El material vegetal seco se recogió en sacos individuales y se almacenó en un lugar seco y en oscuridad hasta su extracción.

Tabla 2. Localización geográfica e información general de las 12 parcelas de recolección de *C. ladanifer*.

Población	Parcela	Latitud	longitud	Altitud	Litología
Pozuelo de Zarzón (PdZ)	A1	40°10'41''N	6°27'55''W	415	Pizarra
Pozuelo de Zarzón (PdZ)	A2	40°10'35''N	6°27'49''W	421	Pizarra
Pozuelo de Zarzón (PdZ)	A3	40°10'37''N	6°27'59''W	420	Pizarra
Valverde del Fresno (VdF)	B1	40°12'40''N	6°54'20''W	479	Pizarra
Valverde del Fresno (VdF)	B2	40°12'20''N	6°54'30''W	437	Pizarra
Valverde del Fresno (VdF)	B3	40°12'36''N	6°54'02''W	484	Pizarra
Torre de Don Miguel (TdDM)	C1	40°13'01''N	6°32'38''W	428	Granito
Torre de Don Miguel (TdDM)	C2	40°13'10''N	6°32'23''W	432	Granito
Torre de Don Miguel (TdDM)	C3	40°13'18''N	6°32'30''W	437	Granito
Villasbuenas de Gata (VdG)	D1	40°10'05''N	6°35'41''W	409	Granito
Villasbuenas de Gata (VdG)	D2	40°09'49''N	6°36'05''W	419	Granito
Villasbuenas de Gata (VdG)	D3	40°09'37''N	6°36'21''W	409	Granito

2.3. Extracción y análisis químico del aceite esencial

La extracción del material vegetal y la caracterización química de las muestras se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 2 “Materiales y Métodos Generales” (Apartados 1 y 3). La cantidad de material vegetal empleado en este estudio fue de 200 gramos y se realizó una destilación por muestra (60 muestras en total). El análisis de datos para la composición química del aceite esencial se llevó a cabo empleando solo los componentes mayoritarios identificados (porcentaje relativo igual o superior al 1%).

Capítulo 3

2.4. Datos edafoclimáticos

Se determinaron las características edafológicas y climáticas de las 4 poblaciones de estudio con el objetivo de determinar el ambiente edafo-climático donde se desarrollaron las plantas recolectadas. Se tomaron datos edafológicos de las 12 parcelas seleccionadas. Además, se tomaron los datos climáticos diarios de las 4 estaciones meteorológicas más cercanas a las diferentes poblaciones de estudio y durante el periodo 2013-2018. La metodología utilizada para la obtención de estos datos se describe en el apartado 4 del Capítulo 2. Estos resultados se detallan en los apartados 1 y 2 del Anexo 2.

2.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos de rendimiento y porcentaje relativo, tanto de componentes mayoritarios como de grupos de compuestos, fueron evaluados mediante análisis de varianza anidado (ANOVA anidado). Como variables independientes se incluyó por un lado el tipo de suelo, y por otro, la población y parcela como factores anidados por orden de jerarquía. En todos los casos, la normalidad de los datos fue testada mediante pruebas de Shapiro-Wilks y la homocedasticidad a través del test de Bartlett. Todas las comparaciones de medias fueron realizadas con el test de Tukey (HSD) a un nivel de significación $P < 0,05$. Además, la relación entre el rendimiento en aceite esencial y las variables edafológicas testadas se evaluó a través de un modelo de regresión lineal múltiple. El rendimiento en aceite esencial se incluyó como variable dependiente y todas las variables edáficas se incluyeron en un primer modelo como predictores. La selección del modelo más adecuado se realizó con la función dredge y get.model del paquete MuMIn en R (Barton, 2020). La comparación de modelos se llevó a cabo a través de las diferencias en el criterio de información de Akaike corregido (AICc) debido a la presencia de pocos datos en el modelo, y se retuvo aquel modelo con un AICc menor.

Se emplearon técnicas descriptivas multivariantes para explorar la variación entre los diferentes sitios de recolección en base a la composición de química del aceite esencial. Las técnicas empleadas fueron el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis de conglomerados o cluster (CA) (Zuur et al., 2007). Por un lado, el análisis de

componentes se empleó para discriminar entre las diferentes poblaciones y parcelas dentro de una misma población teniendo en cuenta los componentes mayoritarios del aceite esencial. Los dos primeros componentes de los análisis obtenidos a partir de la matriz de correlaciones de datos estandarizados recogían la mayor parte de variabilidad presentada por la composición química. Por otro lado, el análisis de conglomerados se utilizó para evaluar similitudes entre las diferentes poblaciones y parcelas como respuesta a la composición química del aceite. Las matrices de proximidad se construyeron con distancias euclídeas de datos estandarizados y el método de agrupamiento promedio (UPGMA) fue empleado para la formación de conglomerados.

La relación entre la variación encontrada en los componentes mayoritarios de diferentes parcelas y las variables edáficas estimadas se llevó cabo mediante la técnica multivariante análisis de correlación canónica (CCA) (Borcard et al., 2011). La composición química del aceite esencial en las diferentes parcelas se empleó como matriz dependiente principal en el análisis, mientras que el conjunto de variables edáficas se incluyó como matriz de restricción o independiente. Los valores finales de todas las variables se presentaron escalados a los valores propios obtenidos en el análisis.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software R Core Team (2020), y se utilizaron las siguientes librerías: ggplot2 para la realización de gráficos (Wickham, 2016), análisis de varianza con car (Fox and Weisberg, 2019), plyr para la manipulación de datos (Wickham et al., 2011), dplyr para la manipulación de datos (Wickham et al., 2020), ggpubr para la realización de gráficos (Kassambara, 2020), Rmisc para obtener funciones útiles (Hope, 2013), comparaciones múltiples Post hoc con emmeans (Lenth, 2020), análisis multivariantes con vegan (Oksanen et al., 2020), dendrogramas y gráficos biplot con factoextra (Kassambara and Mundt, 2020), selección de modelos por MuMIn (Barton, 2020).

3. RESULTADOS

3.1. Rendimiento en aceite esencial

El rendimiento en aceite esencial expresado en ml por 100 gramos de material vegetal seco varió del 0,189 % al 0,418 % (Figuras 8 y 9). A nivel de material lítico sobre

Capítulo 3

el que se han desarrollado las plantas, el ANOVA anidado demostró ser estadísticamente significativo ($F_{1,48} = 68,52$; $P < 0,001$) para los dos niveles analizados, presentando los suelos graníticos valores superiores a los de los suelos pizarrosos (Figura 8). Además, el modelo ANOVA anidado mostró un efecto significativo tanto a nivel de población ($F_{2,48} = 25,74$; $P < 0,001$) como para las diferentes parcelas dentro de una misma población ($F_{8,48} = 4,63$; $P < 0,001$). La población Villasbuenas de Gata mostró un rendimiento medio (0,33 %) en aceite esencial significativamente más elevado que el resto de poblaciones estudiadas. Por el contrario, la población Valverde del Fresno presentó el valor de rendimiento medio más bajo (0,22 %), y mostró además, diferencias significativas con las otras tres poblaciones analizadas. Las poblaciones Torre de Don Miguel y Pozuelo de Zarzón mostraron valores intermedios de rendimiento en esencia (0,27 y 0,25 %, respectivamente). La variación en la producción de aceite esencial entre parcelas dentro de una misma población fue menor que la observada entre diferentes poblaciones (Figura 9). No obstante, la parcela A2 de la población Pozuelo de Zarzón presentó diferencias significativas en el rendimiento de aceite esencial en comparación con las parcelas A1 ($t = -3,48$; $P = 0,045$) y A3 ($t = 4,18$; $P = 0,006$) de esa misma población. Por otro lado, la parcela D1 de la población Villasbuenas de Gata también fue estadísticamente diferente de las parcelas D2 ($t = -3,89$; $P = 0,01$) y D3 ($t = -3,97$; $P = 0,01$).

Finalmente, un modelo de regresión lineal múltiple fue ajustado para relacionar la producción de aceite esencial y las variables edáficas observadas. El modelo final ajustado ($F_{1,10} = 16,74$; $P = 0,002$) explicó el 58,9 % de la variabilidad observada en la respuesta, y únicamente retuvo como predictor significativo el contenido en materia orgánica. Por tanto, aquellas parcelas con un rendimiento mayor, también presentaban un mayor contenido en materia orgánica en el suelo.

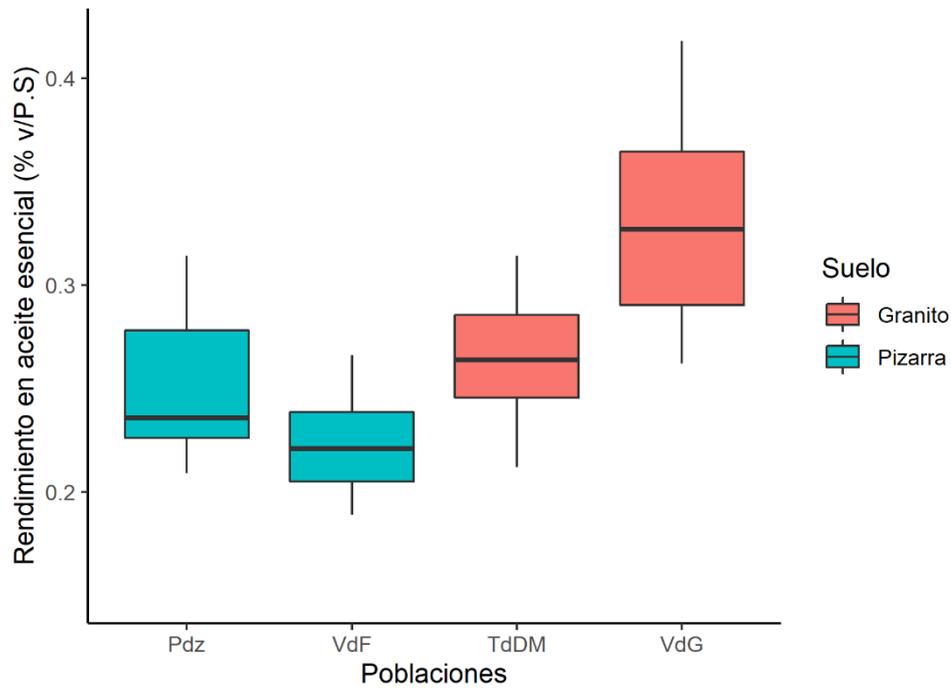


Figura 8. Rendimiento en aceite esencial (% v/P.S) de las diferentes poblaciones de *C. ladanifer* en dos tipos de suelo. Líneas en horizontal indican la mediana. Las cajas muestran los valores entre el 1º y 3º cuartil. Las líneas verticales marcan valores máximos y mínimos.

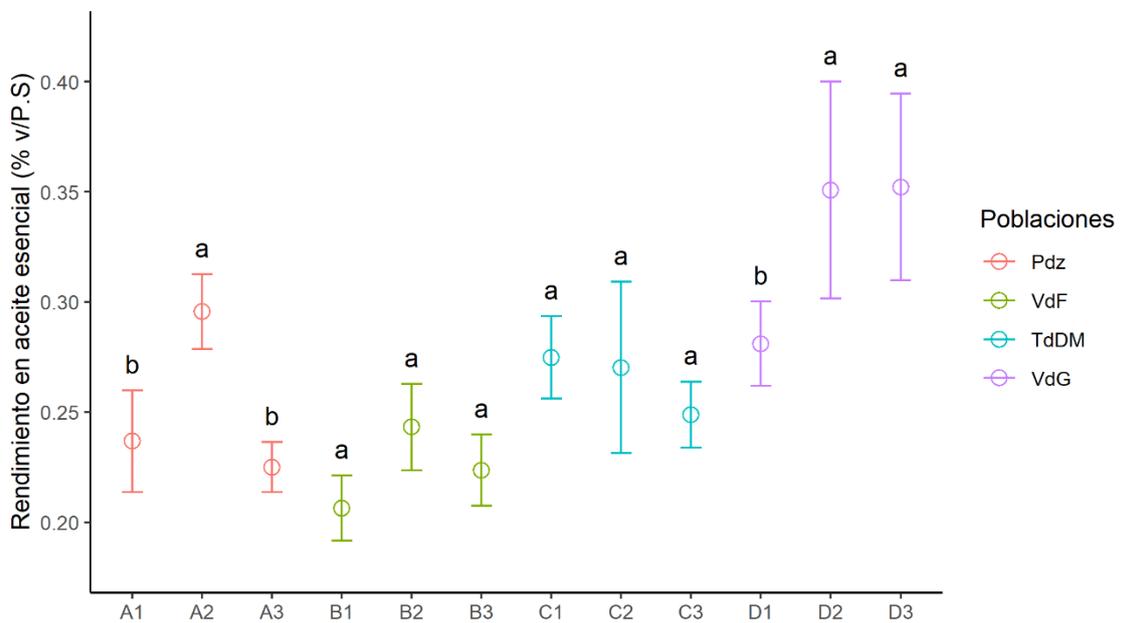


Figura 9. Rendimiento en aceite esencial (% v/P.S) de las diferentes parcelas de recolección de *C. ladanifer*. Los valores son expresados como media \pm SD. Para cada población, distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el test de Tukey (HSD).

Capítulo 3

3.2. Composición química del aceite esencial

El análisis GC-MS para las muestras de aceite esencial permitió la identificación de un total de 103 compuestos, que representaban del 78,38 % al 81,77 % del total de integrado por cromatografía (Anexo I, Tabla 17). Los resultados mostraron una composición química en todas las muestras idénticas en términos cualitativos (número de compuestos), pero presentaron diferencias cuantitativas en el porcentaje relativo (%) de los componentes identificados. A su vez, 20 de estos compuestos fueron considerados mayoritarios por presentar un porcentaje relativo medio superior al 1% en alguna de las muestras testadas. Estos componentes mayoritarios constituían el 60,09-62,29 % del total identificado y fueron: α -pineno (2,49-6,63%), canfeno (0,43-1,34%), p-cimeno (0,77-1,28%), 2,2,6-trimetilciclohexano (2,11-2,68%), trans-pinocarveol (2,35-5,43%), pinocarvone (0,81-1,94%), borneol (0,86-1,40%), mirtenol (0,61- 1,17%), bornil acetato (2,51-3,73%), aloaromadendreno (1,03-1,36%), viridifloreño (1,52-2,37%), palustrol (0,93-1,19%), espatulenol (1,38-1,85%), viridiflorol (17,68-22,51%), Ledol (8,45-11,28%), 1-epi-cubenol (0,97-1,61%), β -eudesmol (0,87-1,15%), cadaleno (1,09-1,90%), 15-nor-labdan-8-ol (1,14-1,94%) y 16-kaureno (0,65-1,15). Todos los componentes identificados fueron agrupados en 6 grupos: monoterpenos hidrocarbonados, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonados, sesquiterpenos oxigenados, diterpenos hidrocarbonados y "otros". Los grupos con componentes oxigenados fueron en todos los casos predominantes en el aceite, con una mayor fracción de sesquiterpenos oxigenados (32,70-39,56%), seguido por los monoterpenos oxigenados (12,00-19,41%) (Tabla 3).

Los ANOVA anidados a nivel individual para cada uno de los componentes mayoritarios y grupos de compuestos, mostraron una variación significativa entre los dos tipos de suelo sobre los que se desarrollaban las plantas. De este modo, las muestras recogidas en parcelas asentadas sobre zonas de granito presentaron porcentajes en los monoterpenos α -pineno, p-cimeno, trans-pinocarveol, pinocarvone y mirtenol significativamente más elevados que aquellas parcelas asentadas sobre pizarras. Por otro lado, las parcelas sobre pizarras presentaron a su vez un porcentaje significativamente más alto que las de granito en los sesquiterpenos viridifloreño, palustrol, espatulenol, viridiflorol, ledol y cadaleno. Por último, otros dos componentes

de gran importancia en el aceite y que se encontraron en una cantidad significativamente mayor en parcelas de pizarra frente a las de granito, fueron el compuesto 15-nor-labdan-8-ol y el diterpeno hidrocarbonado 16-kaureno (Tabla 3, Figura 10). Además, estos ANOVA anidados mostraron diferencias estadísticamente significativas en la composición química del aceite esencial tanto entre distintas poblaciones como en las distintas parcelas dentro de una misma población, para 14 de los compuestos a nivel individual y en 4 de los 6 grupos compuestos (Tabla 3).

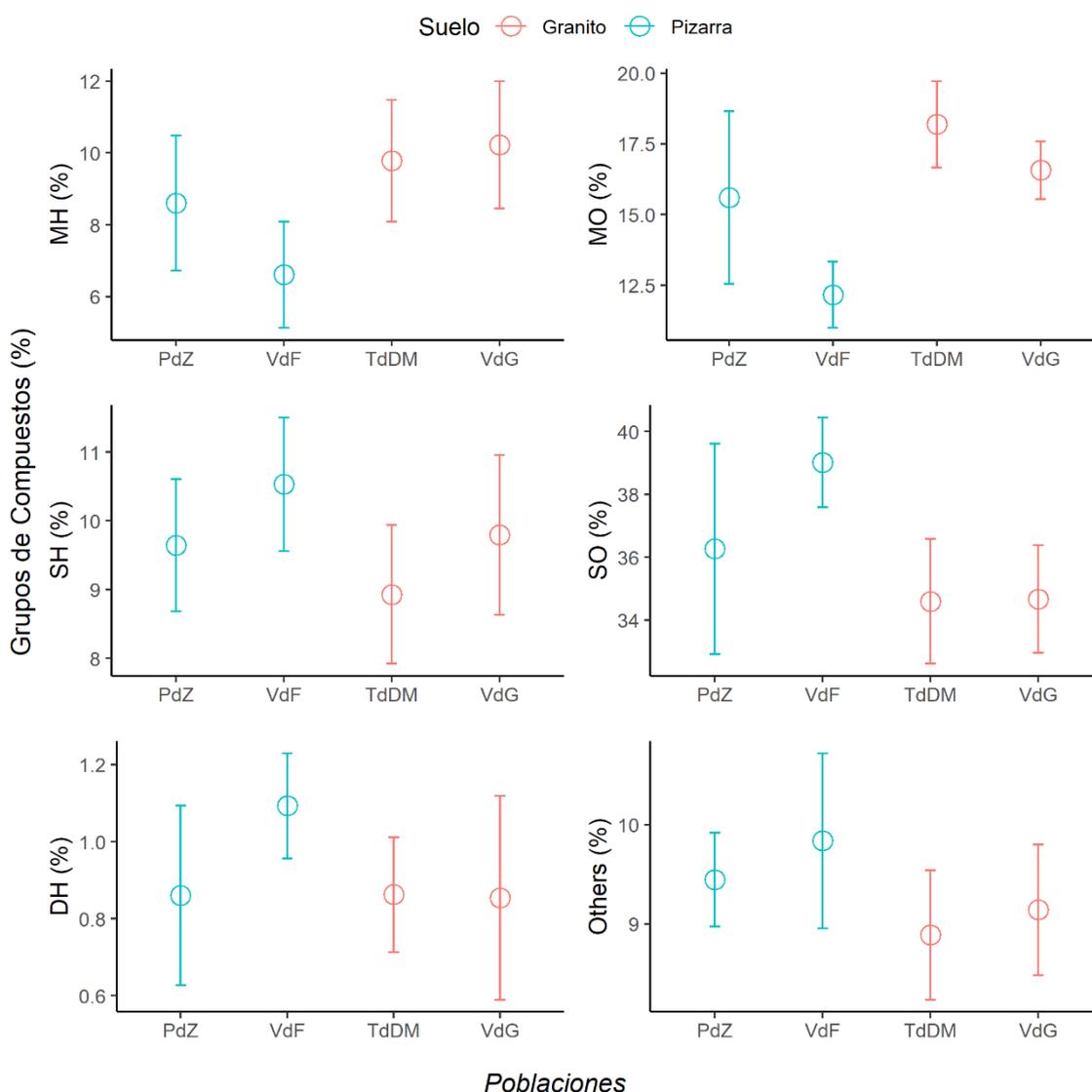


Figura 10. Porcentaje relativo (%) de los grupos de compuestos en las diferentes poblaciones de *C. ladanifer* y tipos de suelo. Los valores son expresados como media \pm SD. MH: monoterpenos hidrocarbonados; MO: monoterpenos oxigenados; SH: sesquiterpenos hidrocarbonados; SO: sesquiterpenos oxigenados; DH: diterpenos hidrocarbonados.

Tabla 3. Composición química (%) del aceite esencial de las 12 parcelas de *C. ladanifer* distribuidas en 4 poblaciones y dos tipos de suelo.

Compuestos	IR	Pizarra						Granito					
		Pozuelo de Zarcón			Valverde del Fresno			Torre de Don Miguel			Villasbuenas de Gata		
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3
α-pineno	936	4,82 abcd	5,51 abc	3,20 cd	2,49 d	3,32 bcd	2,74 d	5,58 ab	4,89 abcd	5,69 a	4,47 abcd	6,63 a	5,88 a
canfeno	951	0,77 ab	0,75 ab	0,43 b	0,88 ab	1,34 a	1,03 ab	0,47 b	0,81 ab	0,83 ab	1,00 ab	0,98 ab	0,93 ab
p-cimeno	1026	1,17 ab	1,28 a	1,15 ab	0,77 c	0,94 bc	0,80 c	1,19 ab	1,22 ab	1,26 a	1,03 abc	1,21 ab	1,18 ab
2,2,6-trimetilciclohexano	1037	2,11 a	2,38 a	2,68 a	2,19 a	2,37 a	2,59 a	2,43 a	2,14 a	2,50 a	2,21 a	2,45 a	2,29 a
trans-pinocarveol	1139	4,34 ab	5,15 a	2,97 bc	2,72 c	2,92 bc	2,35 c	4,51 a	5,43 a	5,11 a	4,43 a	4,57 a	4,81 a
pinocarvone	1162	1,59 a	1,79 a	0,95 b	1,00 b	1,12 b	0,81 b	1,64 a	1,87 a	1,94 a	1,57 a	1,67 a	1,66 a
borneol	1166	1,11 a	1,09 a	0,93 a	1,22 a	1,25 a	1,28 a	0,86 a	1,40 a	1,16 a	1,21 a	1,01 a	1,05 a
mirtenol	1195	0,93 bc	1,07 ab	0,81 cd	0,63 d	0,62 d	0,61 d	1,02 ab	1,17 a	1,05 ab	0,97 abc	0,91 bc	1,00 abc
bornil acetato	1285	3,06 ab	3,13 ab	2,57 b	3,20 ab	3,44 ab	3,73 a	2,51 b	3,03 ab	2,94 ab	3,18 ab	3,25 ab	3,61 c
aloaromadendreno	1454	1,24 a	1,08 a	1,06 a	1,22 a	1,36 a	1,10 a	1,05 a	1,03 a	1,14 a	1,12 a	1,32 a	1,21 a
viridifloreño	1488	2,20 ab	2,05 ab	2,37 a	2,20 ab	1,83 ab	2,21 ab	1,52 b	1,59 b	1,65 b	1,93 ab	1,92 ab	1,96 ab
palustrol	1559	1,06 abc	0,95 bc	1,13 ab	1,13 ab	1,08 abc	1,19 a	0,96 c	0,93 c	0,93 c	1,01 bc	1,01 bc	1,02 bc
espatulenol	1570	1,52 a	1,38 a	1,58 a	1,65 a	1,76 a	1,85 a	1,53 a	1,52 a	1,47 a	1,47 a	1,58 a	1,48 a
viridiflorol	1585	20,60 abc	17,68 d	22,51 a	21,36 abc	21,91 ab	20,46 abcd	18,32 d	19,09 cd	19,84 bcd	19,27 cd	19,83 bcd	19,35 cd
Ledol	1594	9,35 ab	8,91 ab	10,47 ab	11,28 a	10,23 ab	10,42 ab	10,08 ab	9,13 ab	8,65 b	9,83 ab	8,27 b	8,45 b
1-epi-cubenol	1621	1,16 bc	1,24 abc	0,97 c	1,43 ab	1,61 a	1,36 ab	1,38 abc	1,20 abc	1,27 abc	1,48 ab	1,12 bc	1,26 abc
β-eudesmol	1641	0,99 a	1,12 a	0,87 a	0,99 a	1,05 a	0,93 a	1,03 a	1,03 a	0,89 a	1,15 a	0,91 a	0,98 a
cadaleno	1668	1,38 abc	1,41 abc	1,49 abc	1,90 a	1,75 ab	1,58 abc	1,44 abc	1,12 bc	1,09 c	1,33 abc	1,18 bc	1,29 abc
15-nor-labdan-8-ol	1961	1,64 abc	1,31 cd	1,88 ab	1,90 a	1,41 cd	1,94 a	1,27 cd	1,23 cd	1,45 bcd	1,28 cd	1,18 cd	1,14 d
16-kaureno	2020	0,71 a	0,81 a	1,02 a	1,15 a	1,00 a	1,14 a	0,79 a	0,81 a	0,98 a	0,99 a	0,92 a	0,65 a
Total Representado (%)		61,74	60,09	61,05	61,27	62,29	60,12	59,59	60,66	61,82	60,93	61,91	61,21
Total Identificado (%)		80,90	81,30	79,36	78,82	80,40	78,38	80,77	81,17	81,77	80,54	81,77	81,43
Monoterpenos hidrocarbonados		9,06 abcd	10,2 abc	6,97 bcd	5,90 d	7,49 bcd	6,40 cd	9,60 abc	9,34 abcd	10,32 ab	8,83 abcd	11,31 a	10,52 ab
monoterpenos oxigenados		15,97 bcd	18,41 ab	13,07 cd	12,00 d	12,40 d	12,07 d	17,17 ab	19,41 a	18,22 ab	16,02 abc	16,61 ab	17,08 ab
Sesquiterpenos hidrocarbonados		9,75 a	9,71 a	9,51 a	10,68 a	10,67 a	9,96 a	9,63 a	8,38 a	8,67 a	10,01 a	9,50 a	9,87 a
Sesquiterpenos oxigenados		36,23 abc	32,70 c	39,16 a	39,56 a	39,37 a	37,91 ab	35,01 bc	34,33 bc	34,39 bc	35,87 abc	34,14 bc	33,98 bc
Diterpenos hidrocarbonados		0,71 a	0,81 a	1,02 a	1,15 a	1,00 a	1,14 a	0,79 a	0,81 a	0,98 a	0,99 a	0,92 a	0,65 a
Otros		9,19 ab	9,46 ab	9,64 ab	9,53 ab	9,47 ab	10,68 a	8,57 b	8,90 b	9,20 b	8,80 b	9,28 ab	9,34 ab

Componentes listados por orden de elución en una columna apolar HP-5; IR: índices de retención de Kovats relativos a n-alcános en una columna apolar HP-5; valores expresados como media (n=5); valores ≥ 5 % en negrita. Valores seguidos de distintas letras indican diferencias significativas (P<0,05) en el test de Tukey (HSD).

3.3. Análisis multivariantes

Se aplicó un análisis de componentes principales con el objetivo de sintetizar los datos de composición química e identificar posibles relaciones de afinidad entre las distintas parcelas analizadas y los porcentajes relativos de componentes volátiles mayoritarios. La Figura 11 muestra la distribución de las variables (componentes químicos mayoritarios) e individuos (muestras) en el espacio bidimensional de los dos primeros componentes del análisis, y además, nos proporciona una idea de la posible correlación entre ellos. Los dos primeros componentes analizados conjuntamente explicaban un 52,5% de la varianza total. El primer componente (PC1, con una variación de 39,01%) presentaba, por un lado, una alta correlación positiva con los componentes viridifloreño (0,75), palustrol (1,12), espatulenol (0,74), viridiflorol (0,94), ledol (0,79), cadaleno (0,77), 15-nor-labdan-8-ol (0,93) y 16-Kaureno (0,79), y por otro, una alta correlación negativa con α -pineno (-1,06), p-cimeno (-1,05), pinocarveol (-1,17), pinocarvone (-1,17) y mirtenol (-1,16). El segundo componente (PC2, con una variación de 13,34%) tenía una correlación negativa alta con los compuestos canfeno (-1,11), borneol (-0,73), bornil acetato (-0,98) y epi-cubenol (-0,76). En este caso, el análisis PCA empleado en función de los porcentajes relativos de los componentes mayoritarios nos permitió separar las diferentes muestras en tres grupos (Figura 12).

El grupo I estaba compuesto por todas las muestras recolectadas en las poblaciones de Torre de Don Miguel y Villasbuenas de Gata, y además, contenía también todas las muestras de la parcela A2 y dos de la parcela A1, pertenecientes ambas a la población de Pozuelo de Zarzón. Este grupo se caracterizó por presentar en conjunto un contenido más elevado en los monoterpenos α -pineno (4,47-6,63%), p-cimeno (1,03-1,28), pinocarveol (4,34-5,43%), pinocarvone (1,57-1,94%) y mirtenol (0,91-1,17), en comparación con los otros dos grupos. Por otro lado, las muestras del grupo II pertenecían a las tres parcelas (B1, B2 y B3) de la población de Valverde del Fresno, y las del grupo III en su mayoría a la parcela A3 de Pozuelo de Zarzón. Estos dos grupos guardaban la característica en común de presentar valores en conjunto más elevados de los sesquiterpenos viridifloreño (1,8-2,4%), palustrol (1,1-1,2%), espatulenol (1,6-1,8%), viridiflorol (20,5-22,5 %), Ledol (10,2-11,3 %) y cadaleno (1,5-1,9 %) en comparación con las del grupo I, pero a su vez, el grupo III se separó ligeramente del grupo II porque

Capítulo 3

presentaba valores más bajos de canfeno (0,4%) y bornil acetato (2,6%). Por último, observamos que hay una separación clara entre las muestras recolectadas en zonas de granito (izquierda) frente a las recolectadas en zonas de pizarra (derecha), con la excepción de algunas muestras pertenecientes a la población de Pozuelo de Zarzón.

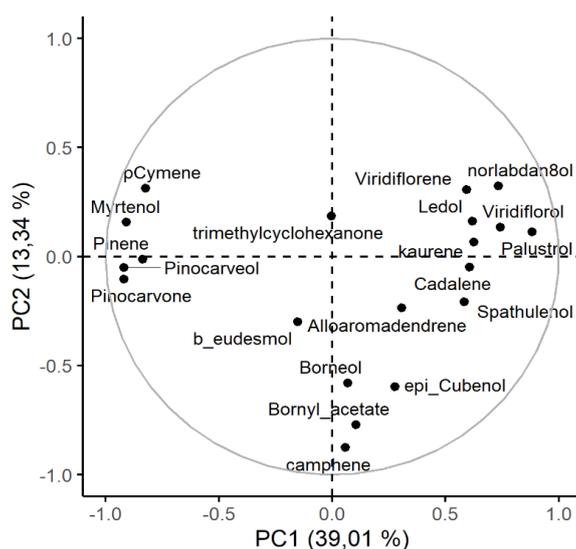


Figura 11. Distribución de variables del análisis PCA realizado con los componentes mayoritarios del aceite esencial de *C. ladanifer*.

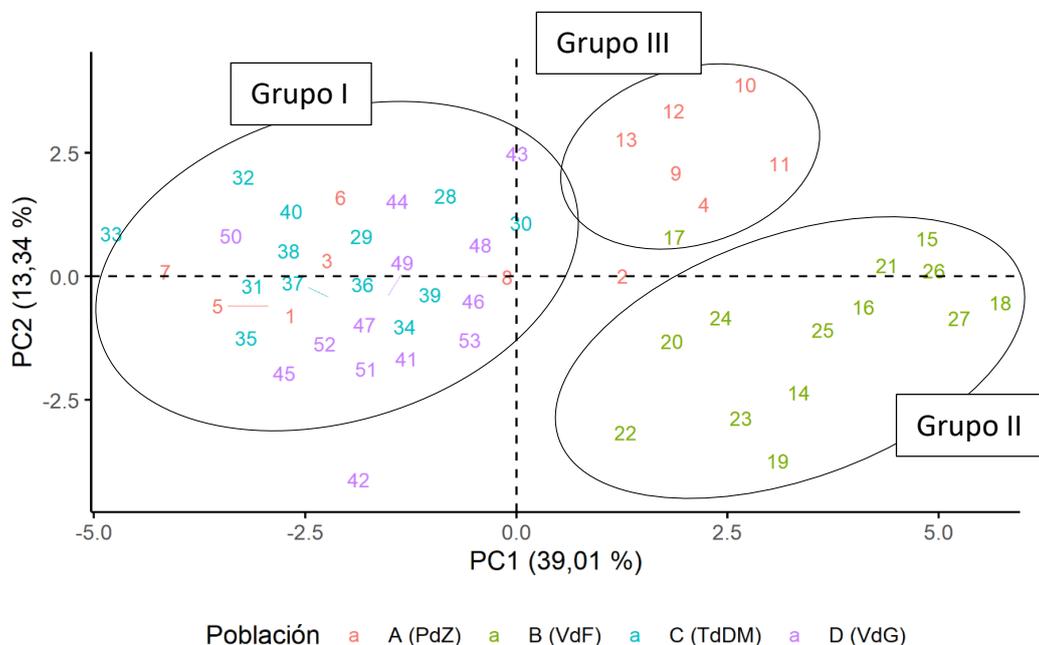


Figura 12. Distribución de muestras del análisis PCA realizado con los componentes mayoritarios del aceite esencial de *C. ladanifer*.

El análisis de conglomerados aplicado sobre los porcentajes relativos de los componentes mayoritarios del aceite esencial, nos permitió obtener el dendrograma que se presenta en la Figura 13. La estructura general del dendrograma reveló la existencia de dos clústeres principales. El primer grupo lo integraban los aceites esenciales de las tres parcelas de Valverde del Fresno (B1, B2 y B3) y la parcela A3 de Pozuelo de Zarzón. El segundo grupo estaba compuesto por las tres parcelas de las poblaciones de Torre de Don Miguel (C1, C2 y C3) y Villasbuenas de Gata, más las localizaciones A1 y A2 de Pozuelo de Zarzón. Dentro de este segundo grupo, podemos observar que la parcela A1 presentaba la mayor distancia euclídea con respecto al resto de parcelas del grupo. Por lo tanto, este resultado corrobora los datos obtenidos en el análisis PCA, en el que el primer componente principal separaba los dos mismos grupos que el análisis de conglomerados.

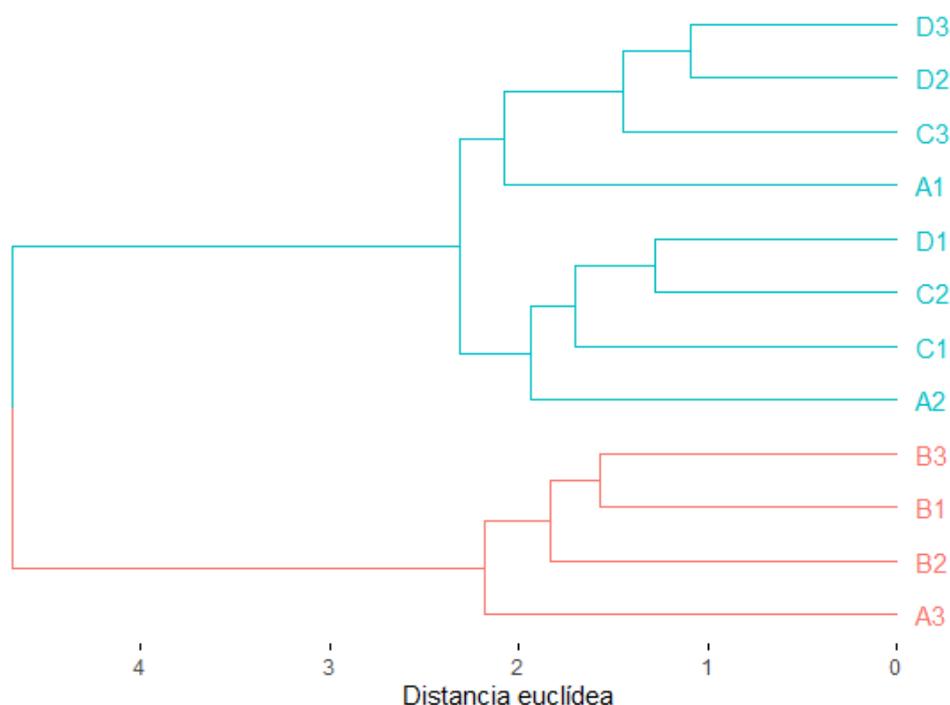


Figura 13. Dendrograma obtenido por análisis clúster y basado en distancias euclídeas (método UPGMA) de los componentes mayoritarios del aceite esencial de 12 parcelas de recolección de *C. ladanifer*.

Con el fin de estimar el efecto de las distintas variables edáficas en la variabilidad de la composición química del aceite esencial, se llevó a cabo un análisis de correlación canónica entre los dos conjuntos de variables (Tabla 4). La varianza total explicada por

Capítulo 3

los tres primeros componentes del análisis fue del 93,8 %. La primera componente explicó el 79,5 % de la varianza y estaba negativamente relacionada con el contenido en materia orgánica y la capacidad de intercambio catiónico. Además, esta componente se vio afectada negativamente por los componentes α -Pineno, pinocarveol, pinocarvone y mirtenol, y positivamente por el cadaleno, 15-nor-labdan-8-ol y 16-kaureno. A su vez, la segunda componente explicaba aproximadamente un 10 % de la varianza canónica, y estaba influenciada de una manera positiva por las variables edáficas conductividad eléctrica y cantidad de limo, y además, con los compuestos canfeno y acetato de bornilo de forma negativa.

Tabla 4. Coeficientes canónicos, valores propios y varianza para el análisis CCA entre los componentes mayoritarios del aceite esencial de *C. ladanifer* y variables edáficas.

Variables	CCA1	CCA2	CCA3
Componentes aceite esencial			
α -pineno	-0,76	0,08	0,09
canfeno	0,18	-1,13	0,11
p-cymeno	-0,34	0,28	0,11
2-2-6-trimethylcyclohexano	0,07	0,18	0,04
trans-pinocarveol	-0,66	-0,02	-0,12
pinocarvone	-0,66	-0,08	-0,04
borneol	0,11	-0,44	-0,28
mirtenol	-0,51	0,14	-0,16
bornil_acetato	0,01	-0,42	0,14
aloaromadendreno	0,02	-0,16	0,22
viridifloreno	0,16	0,13	0,22
palustrol	0,17	0,03	0,03
spatuleno	0,17	-0,08	-0,14
viridiflorol	0,16	0,04	0,12
ledol	0,21	0,12	-0,26
1-epi-cubenol	0,07	-0,33	-0,29
β -eudesmol	-0,09	-0,10	-0,22
cadaleno	0,31	0,07	-0,10
15-nor-labdan-8-ol	0,42	0,25	0,16
16-kaureno	0,37	-0,16	-0,12
Variables de restricción			
pH	-0,33	0,27	0,10
Conductividad	-0,06	0,65	0,21
Materia orgánica	-0,87	-0,22	0,08
Nitrógeno Total	0,24	-0,44	-0,09
C.I.C	-0,58	-0,12	-0,22
Arena	0,13	-0,42	-0,23
Arcilla	-0,26	-0,47	-0,02
Limo	0,07	0,64	0,19
Valores propios	0,014	0,002	0,001
Varianza (%)	0,795	0,102	0,042
Varianza acumulada (%)	0,795	0,897	0,938

4. DISCUSIÓN

La variabilidad tanto en la biosíntesis como en la composición química del aceite esencial de un gran número de especies de plantas aromáticas y medicinales, incluyendo varias del género *Cistus*, ha sido ampliamente descrita en la literatura. Además, numerosos estudios tanto en especies de este género *Cistus* (Angelopoulou et al., 2001; Palá-Paúl et al., 2005; Robles & Garzino, 2000), como en otras familias botánicas (M. J. Jordán et al., 2006; Llorens et al., 2014; Perry et al., 1999; Sadeghi et al., 2014), han asociado esta variación encontrada en los aceites esenciales a diferentes factores geográficos, ambientales, genéticos o fisiológicos. En poblaciones naturales de *C. ladanifer*, estas fluctuaciones tanto en la producción del aceite esencial como en su composición química, también se han puesto de manifiesto.

En nuestro estudio, se analizaron 12 localizaciones (parcelas) repartidas en 4 poblaciones naturales y asentadas sobre dos tipos de suelo diferentes. Las recolecciones se realizaron con material vegetal bajo idéntico estado fisiológico (estado fenológico y edad de las plantas), con el fin de disminuir al máximo el efecto de estas variables en el rendimiento y la composición química del material vegetal. Por otro lado, para minimizar el efecto asociado a factores geográficos y climáticos, los sitios se encontraban a similares altitudes y latitudes, además de situarse en el mismo piso bioclimático. En el ensayo se analizó por un lado el rendimiento en aceite esencial, y por otro, la composición química del mismo.

Los rendimientos en aceite esencial oscilaron entre un mínimo de 0,189 % y un máximo de 0,418 %. Estos resultados están en línea con aquellos descritos por otros autores para unas condiciones experimentales similares a las nuestras (hojas y tallos secos, recolectados en agosto y empleando el método Clevenger). Gomes et al. (2005) y Benali et al. (2020) reportaron rendimientos entre 0,2-0,3 % en plantas que provenían de poblaciones naturales del centro de Portugal y del norte Marruecos, respectivamente. A su vez, las poblaciones del estudio mostraron gran variabilidad entre ellas en la producción de aceite esencial, y además, hubo también una ligera variación entre parcelas dentro de una misma población en Valverde del Fresno y Villasbuenas de Gata. Estas variaciones inter e intrapoblacionales del rendimiento han sido ampliamente descritas por varios autores y en una gran diversidad de plantas (Ben Farhat et al., 2019;

Capítulo 3

Mastro et al., 2017; Vokou et al., 1993). Específicamente en el género *Cistus*, Angelopoulou et al. (2001) encontró variaciones interpoblaciones en el rendimiento en aceite esencial de plantas de *Cistus parviflorus* L. recolectadas de nueve localizaciones ubicadas en la isla griega de Creta. Además, nuestro trabajo mostró que aquellas poblaciones asentadas sobre granito presentaron mayores rendimientos que las de pizarra. Estas fluctuaciones en el rendimiento en aceite esencial asociadas a distintos tipos de suelo han sido previamente reportadas en otras especies del género *Cistus*. En un ensayo con plantas de *Cistus albidus* L. creciendo sobre dos tipos de suelo, Robles & Garzino (1998) encontraron que aquellas que estaban en zonas silíceas presentaban mayores rendimientos en aceite esencial que las de zonas calcáreas. Por el contrario, otro estudio de Robles & Garzino (2000) en *C. monspeliensis* mostró, en este caso, que las plantas asentadas sobre suelos calcáreos producían una mayor cantidad de aceite que las de suelos silíceos. Por último, la relación entre algunas variables edáficas de nuestros suelos y la cantidad de aceite esencial producido en esas parcelas, mostró que la producción de aceite esencial estaba positivamente relacionada con el contenido en materia orgánica. Algunos autores han descrito anteriormente la influencia de algunas variables edáficas en el rendimiento en aceite esencial producido por diferentes especies de plantas (Etehadpour & Tavassolian, 2019; Rapposelli et al., 2015).

En cuanto a la composición química del aceite esencial, las poblaciones estudiadas se caracterizaron por presentar altos contenidos en sesquiterpenos como viridiflorol (17,68-22,51%) y ledol (8,45-11,28%), seguidos por cantidades inferiores de los monoterpenos α -pineno (2,49-6,63%) y trans-pinocarveol (2,35-5,43%). En un estudio intraespecífico con 20 plantas individuales de *C. ladanifer* L. originarias de España y cultivadas en Córcega, Mariotti et al. (1997) caracterizó su composición química y dividió las muestras en base a sus componentes mayoritarios en 6 grupos. Los distintos grupos se ordenaron de menor a mayor porcentaje de α -pineno. Así, el grupo I se caracterizó por presentar altas cantidades de viridiflorol y ledol, mientras que α -pineno estaba en un porcentaje pequeño. Por el contrario, los grupos del III al VI presentan cantidades elevadas de α -pineno y bajas de viridiflorol. Finalmente, el grupo II presentaba características intermedias entre el grupo I y III, con porcentajes intermedios de α -pineno y viridiflorol. Atendiendo a esta clasificación de Mariotti et al. (1997), nuestros aceites esenciales se incluirían en los grupo I y II, caracterizados por

bajas cantidades de α -pineno y altas de viridiflorol. De este modo, nuestros resultados fueron similares a los observados por otros autores en aceites esenciales de poblaciones originarias del norte de Marruecos y Portugal (Gomes et al., 2005; Greche et al., 2009). Sin embargo, en un experimento llevado a cabo con plantas de *C. ladanifer* L. recolectadas en la provincia española de Guadalajara, Mediavilla et al. (2021) reportó un aceite esencial con un contenido muy elevado en α -pineno (50 % aproximadamente) en comparación con viridiflorol y ledol. En este sentido, una proporción elevada de α -pineno en el aceite, con un fuerte olor a trementina, se considera negativa por alterar las notas balsámicas y el olor a ámbar gris característico de esta especie (Oller-López et al., 2005). En otro estudio ubicado en el centro-este de Portugal, a una distancia media de unos 20-60 km a nuestras zonas de estudio, Tavares et al. (2020) encontraron un aceite esencial con una composición química muy diferente a los nuestros, en el cual, el grupo de los monoterpenos representaba un porcentaje mucho más elevado (54,5 %) que el grupo de los sesquiterpenos (11,6 %). Además de los compuestos viridiflorol, ledol y 2-2-6-trimethylcyclohexano, otros componentes también destacados por su importancia organoléptica en la industria perfumera, tales como el ambrox (0,29-0,43 %), oxoisoambrox (0,02-0,11 %), sclareoloxido (0,14-0,20 %) y sobre todo el 15-norlabdan-8-ol (1,14-1,94%), fueron identificados en nuestro estudio. Estos compuestos aromáticos han sido catalogados por varios autores como responsables del fuerte olor a ámbar de los productos derivados de *C. ladanifer* L., característica muy apreciada y demanda por la industria perfumera, debido en gran medida a su parecido al ámbar gris (Gomes et al., 2005; Surburg & Panten, 2006; Weyerstahl et al., 1998).

Los resultados de los distintos análisis sobre la composición química del aceite esencial, mostraron para algunos compuestos individuales y grupos de compuestos variaciones inter e intrapoblacionales en el área de estudio. Sin embargo, la variabilidad intrapoblacional encontrada fue menor que la interpoblacional. Varios autores han determinado que estas fluctuaciones encontradas entre diferentes sitios de recolección son debidas probablemente al efecto de factores geográficos, ambientales o genéticos (Mollaei et al., 2020; Morshedloo et al., 2015; Ray et al., 2018). En nuestro caso, los datos climáticos de las diferentes poblaciones (ver tabla 23 y figura 34 del Anexo 2) no conseguían explicar las variaciones encontradas en el aceite esencial, debido a que poblaciones climáticamente similares mostraban diferencias elevadas en sus aceites

Capítulo 3

esenciales. Por lo tanto, dado que todas las poblaciones se recolectaron además en un estado fisiológico idéntico y con características biogeográficas similares, se determinó que esta variabilidad podría estar asociado en parte con factores edáficos, y muy probablemente también, por diferencias genéticas.

En cuanto al tipo de suelo, los análisis multivariantes consiguieron separar correctamente en base a la composición del aceite, las parcelas de granito de las de pizarra, a excepción de algunas muestras de las parcelas A1 y A2 de la población Pozuelo de Zarzón. De este modo, los aceites que provenían de suelos graníticos presentaban mayores cantidades de monoterpenos y menores de sesquiterpenos que los pizarrosos. En esta línea, Palá-Paúl et al. (2008) encontraron también variaciones en el contenido de monoterpenos y sesquiterpenos del aceite esencial de *Eryngium campestre* L. entre suelos de tipo alcalino y ácidos. El análisis de correlación canónica nos permitió establecer qué variables edáficas influían sobre estas variaciones observadas en la composición química del aceite esencial. De este modo, el contenido en materia orgánica y capacidad de intercambio catiónico influyeron positivamente en la síntesis de α -Pino, pinocarveol, pinocarvona y mirtenol, mientras que se relacionaban negativamente con el contenido en cadaleno, 15-nor-labdan-8-ol y 16 kaureno. En estudios similares, otros autores encontraron correlaciones altas entre algunas variables edáficas y el contenido de algunos compuestos químicos mayoritarios del aceite esencial de *Myrtus communis* (Rahimmalek et al., 2013) y *Salvia desoleana* (Rapposelli et al., 2015). Finalmente, el hecho de encontrar diferencias en la composición química de muestras obtenidas bajo condiciones edáficas idénticas, nos sugiere que parte de esta variabilidad no explicada podría ser debido al efecto genético de las plantas.

En este estudio, no podemos por tanto concluir que existan diferentes quimiotipos en las muestras, debido a que las muestras provenían de la recolección de varias plantas individuales agrupadas, y además, habían crecido bajo condiciones diferentes. Sin embargo, estos resultados pueden indicar que las poblaciones de los dos tipos de suelo podrían conformar ecotipos separados. Además, las poblaciones Torre de Don Miguel, Villasbuenas de Gata y Valverde del Fresno, presentaron una composición química muy homogénea en todas sus muestras, lo que permitiría posiblemente determinar perfiles químicos concretos. Por el contrario, la población Pozuelo de Zarzón mostró una mayor heterogeneidad química, debido probablemente a la presencia de

varios quimiotipos en las muestras, que harían difícil la determinación de un perfil concreto, pero que podría ser interesante en trabajos futuros para la búsqueda de quimiotipos de interés agrícola y comercial.

CAPÍTULO 4

Efecto del estado fenológico, la edad y la parte de la planta utilizada en el rendimiento y la composición química del aceite esencial de *C. ladanifer*

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas producen una amplia y diversa variedad de compuestos orgánicos, de los cuales, la gran mayoría no presentan una importancia primordial en las funciones esenciales de crecimiento y desarrollo (Croteau et al., 2000). Este grupo de compuestos, denominados metabolitos secundarios, presentan una importante significación adaptativa en la protección contra herbívoros y microorganismos patógenos, así como atractivos de polinizadores y agentes alelopáticos (Maffei, 2010). En las últimas décadas, debido a esta reevaluación de sus funciones biológicas, estos productos naturales han despertado un gran interés por sus importantes implicaciones prácticas en el ámbito de la medicina, la nutrición y la cosmética (Edreva et al., 2008).

Los aceites esenciales, uno de estos productos del metabolismo secundario de plantas, son líquidos aromáticos oleosos extraídos de diferentes partes de la planta (Tongnuanchan & Benjakul, 2014). Se caracterizan por tener dos o tres componentes principales en concentraciones bastante elevadas (20-70%) respecto a otros componentes presentes en cantidades traza (Bakkali et al., 2008). En general, estos componentes provienen de dos grupos de origen biosintético distinto, por un lado, los compuestos terpenos y terpenoides, y por otro, los fenilpropanoides (Hyltdgaard et al., 2012; Pichersky et al., 2006; J.-L. Ríos, 2016). Además, se ha demostrado que estos aceites esenciales presentan un gran polimorfismo asociado frecuentemente con diferentes factores intrínsecos y extrínsecos de las plantas (Barra, 2009; Zuzarte & Salgueiro, 2015). De este modo, Franz (1993) señaló que la evaluación de estas variaciones fitoquímicas en los aceites esenciales implicaba el estudio de al menos tres factores principales: 1) la variabilidad genética individual; 2) la variación entre las distintas partes de la planta y diferentes etapas de desarrollo; y 3) las modificaciones debidas al ambiente. Por tanto, es necesario entender y controlar en la medida de lo posible el efecto de estos factores sobre la producción de aceite esencial, para obtener producciones comerciales fiables y con las características deseables.

Cistus ladanifer L. (Cistaceae) es un arbusto nativo de la Región Mediterránea, que se encuentra ampliamente distribuido en áreas degradadas y no cultivadas de la Península Ibérica (Alves-Ferreira et al., 2019; Barraji3n-Catal3n et al., 2016). En la

Capítulo 4

actualidad, la obtención de productos derivados de *C. ladanifer* proviene de la recolección silvestre de plantas jóvenes (3-5 años), restringido al periodo de fructificación (julio-octubre) y prácticamente solo en determinadas zonas de Andalucía (Raimundo et al., 2018). Diversos estudios llevados a cabo en otras especies del género *Cistus*, han mostrado fluctuaciones en la producción de aceite esencial en distintas fases del ciclo fenológico y para diferentes partes de la planta utilizada (Demetzos et al., 2002; Palá-Paúl et al., 2005; Robles & Garzino, 2000; Zidane et al., 2014). Específicamente en *C. ladanifer*, varios autores han evaluado el efecto en la producción de aceite esencial de factores genéticos (Mariotti et al., 1997), quimiotaxonómicos (Robles et al., 2003) o culturales (Mediavilla et al., 2021). Además, otros autores se han centrado en estudiar su actividad biológica (Benali et al., 2020; Greche et al., 2009; Tavares et al., 2020) y fitotóxica (Verdeguer et al., 2012). Sin embargo, a pesar de la importancia para la industria de conocer y controlar el efecto de factores fisiológicos inherentes a la planta, como el estado fenológico, la edad o la parte de la planta utilizada, no se han encontrado estudios que aborden de manera conjunta estos aspectos.

Este estudio se centró, por tanto, en evaluar las variaciones en el contenido y la composición química de aceites esenciales de poblaciones naturales de *C. Ladanifer* en dos estados fenológicos distintos, y para diferentes intervalos de edad de la planta, con el objetivo principal de determinar las condiciones óptimas de cosecha para unas cualidades aromáticas determinadas. Además, un segundo ensayo evaluó las diferencias en la producción de aceite esencial en diferentes órganos de la planta, para determinar cómo afecta la proporción de cada uno de ellos a la producción de aceite esencial.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental y material vegetal

El material vegetal para los ensayos llevados a cabo en este capítulo se recolectó en las mismas 12 parcelas provenientes de 4 poblaciones (Valverde del Fresno, Pozuelo de Zarcón, Torre de Don Miguel y Villasbuenas de Gata) descritas anteriormente en el capítulo 3. Se recolectó durante el año 2018 y en dos fechas distintas (principios de mayo y finales de agosto) las partes aéreas jóvenes (tallos, hojas, flores y frutos en cada caso) de un mínimo de 10 plantas y para tres intervalos de edades bien diferenciados: 3-5, 9-

11 y > 15 años. Las dos fechas de recolección seleccionadas se corresponden con dos estados fenológicos (floración y fructificación) de la planta muy contrastados.

Además, para un segundo ensayo cuyo objetivo fue evaluar diferencias en la producción de aceite esencial en relación a la parte de la planta utilizada, se recolectó en las 12 parcelas de estudio, una cantidad extra de material vegetal de al menos otras 10 plantas individuales a finales de agosto y con una edad estimada de 3-5 años. Se han seleccionado estos dos criterios para el ensayo por ajustarse a las condiciones tradicionales de cosecha de este recurso en España (Raimundo et al., 2018).

La determinación a priori de los intervalos de edad se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Valares (2011), en la cual, la edad de las plantas de *C. ladanifer* está relacionada a través de dos modelos de regresión con el diámetro ($y = 1.5496x + 1.5342$; $R^2 = 0.9221$) y la altura ($y = 67.21\ln(x) - 16.929$; $R^2 = 0.8123$) de las mismas. En ambas funciones la variable dependiente se corresponde respectivamente con el diámetro de tronco (mm) y la altura (cm), mientras la variable independiente se corresponde con la edad en años. Por lo tanto, los tres intervalos de edad ajustados previamente (3-5, 9-11 y > 15 años) se correspondían con unos rangos de diámetro (6.2-9.3, 15.5-18.6, >24 mm, respectivamente) y altura (57-92, 131-144, > 165 cm) de plantas concretas, que fueron empleados sistemáticamente en campo durante la recolección. Siempre que fue posible la determinación de la edad se realizó a través del diámetro por presentar un mejor ajuste en el modelo.

Finalmente, en los dos ensayos, cada muestra compuesta por al menos 10 plantas individuales se mezcló homogéneamente en campo, con el objetivo de disminuir al máximo la variabilidad asociada al individuo. Las muestras se secaron a temperatura ambiente, en una zona aireada y sin humedad. A continuación, todas las muestras fueron guardadas en sacos debidamente etiquetados en un lugar seco y en oscuridad hasta su extracción.

2.2. Extracción y análisis químico del aceite esencial

La extracción del material vegetal y la caracterización química de las muestras se llevaron a cabo de acuerdo con la metodología descrita en los apartados 1 y 3 del capítulo 2. Por un lado, para estimar el efecto del estado fenológico y la edad de la

Capítulo 4

planta en cada extracción se emplearon 200 gramos de material vegetal troceado. Todas las muestras fueron destiladas por duplicado ($72 \times 2 = 144$ muestras). Por otro lado, en el ensayo para evaluar las diferencias en función de la parte de la planta utilizada, se procedió a separar las hojas y tallos (100-150 gramos, según disponibilidad) del material vegetal de la recolección extra (fructificación e intervalo de edad 3-5 años) para su posterior extracción por separado. Además, en cuanto a la composición química del aceite, solo los componentes mayoritarios (porcentaje relativo igual o superior al 1%) fueron de nuevo empleados en el análisis estadístico de los datos.



Imagen 4. Diferentes situaciones de trabajo. (A)-estimación de la edad; (B)-recolección; (C)-transporte; (D)-secado; (E)-separación de hojas y tallos; (F)-extracción.

2.3. Datos edafoclimáticos

Las características edafoclimáticas fueron idénticas a las descritas en el capítulo 3 para las 4 poblaciones de estudio, las cuales a su vez, se obtuvieron siguiendo la metodología descrita en el apartado 4 del capítulo 2. Las distintas variables edáficas y climáticas obtenidas fueron: pH, conductividad, nitrógeno total, materia orgánica, C.I.C, fósforo asimilable, textura, temperatura, precipitaciones, humedad relativa y velocidad del viento. Estos resultados descriptivos de la zona de estudio se muestran en los apartados 1 y 2 del Anexo 2 del documento.

2.4. Análisis de datos

Se ajustó un Modelo lineal Mixto (MLM) para estimar el efecto del estado fenológico y la edad de la planta sobre el rendimiento (% v/p.s) y los porcentajes relativos de los compuestos (%) en el aceite esencial. El estado fenológico y la edad de la planta fueron incluidos en interacción como factores independientes en el modelo. Las diferentes poblaciones de estudio se incluyeron a su vez como factor aleatorio. La normalidad y homocedasticidad de todos los datos fue estimada con las pruebas de Shapiro-Wilks y Bartlett, respectivamente. El test de Tukey (HSD) a un nivel de significación $P < 0.05$ fue empleado para comparar las medias y establecer diferencias entre aquellos factores con más de dos niveles. Por otro lado, se realizó una correlación múltiple por pares entre los componentes mayoritarios para identificar grupos biogenéticamente relacionados y su relación con los dos factores analizados (estado fenológico y edad). Se empleó el coeficiente de correlación de Spearman con corrección de Bonferroni y la matriz de correlaciones derivada se expuso en forma de gráfico. Además, se empleó en el gráfico un factor de agrupamiento con la ayuda de la función “hclust” de la librería corrplot (Wei y simko, 2017), para conglomerar compuestos con patrones similares.

Se emplearon de nuevo las mismas técnicas descriptivas multivariantes (análisis de componentes principales y el análisis de conglomerados) descritas en el apartado 2.5 del capítulo 3, para discriminar y explorar diferencias entre los diferentes factores analizados en base a aquellos componentes más representativos del aceite esencial. Se utilizaron las mismas condiciones de ajuste descritas en el apartado 2.5 del capítulo 3 para ambos análisis.

Finalmente, las diferencias en el rendimiento (% v/p.s) y el porcentaje relativo (%) del aceite esencial entre los dos órganos de la planta (hojas y tallos) se analizaron a través de la prueba t de Student.

El software estadístico R Core Team (2020) fue empleado en todos los análisis, y las librerías empleadas en estos análisis fueron las siguientes: modelos lineales mixtos con nlme (Pinheiro et al. 2020), ggplot2 para la realización de gráficos (Wickham, 2016), plyr para la manipulación de datos (Wickham et al., 2011), dplyr para la manipulación de datos (Wickham et al., 2020), ggpubr para la realización de gráficos (Kassambara,

Capítulo 4

2020), Rmisc para obtener funciones útiles (Hope, 2013), comparaciones múltiples Post hoc con emmeans (Lenth, 2020), análisis multivariantes con vegan (Oksanen et al., 2020), dendrogramas y gráficos biplot con factoextra (Kassambara and Mundt, 2020) y gráfico de correlaciones con corrplot (Wei y simko, 2017).

3. RESULTADOS

3.1. Rendimiento en aceite esencial

Los valores de rendimiento en aceite esencial para los dos estados fenológicos y tres intervalos de edad analizados oscilaron entre un 0,13 % y un 0,36 % (Figura 14). Los factores estado fenológico ($F_{1,122} = 196,47$; $P < 0.001$) y edad ($F_{2,122} = 8,34$; $P < 0.001$) fueron significativos en el modelo lineal mixto ajustado. De este modo, las plantas recolectadas en el estado fenológico de floración presentaron un rendimiento medio en aceite esencial ($0,17 \pm 0,04$ %) significativamente menor que aquellas obtenidas en fructificación ($0,27 \pm 0,05$ %). Por otro lado, el factor edad mostró un comportamiento diferente en función del estado fenológico analizado. De este modo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento en aceite esencial para los tres intervalos de edad analizados en estado de fructificación, mientras que en estado de floración, las plantas con una edad de 3-5 años mostraron un rendimiento significativamente menor que las plantas con edades de 9-11 años ($t = -4,12$; $P < 0,001$) y > 15 años ($t = -5,37$; $P < 0,001$). Por último, el modelo presentó una interacción significativa ($F_{2,122} = 7,54$; $P < 0,001$) para los dos factores incluidos en el análisis (estado fenológico y edad).

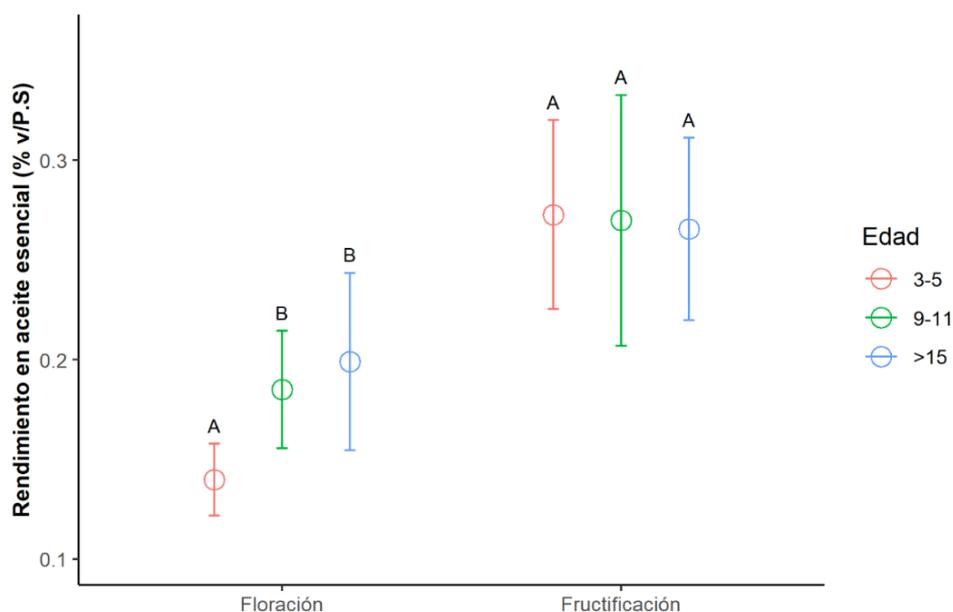


Figura 14. Rendimiento en aceite esencial (% v/P.S) por estado fenológico e intervalos de edad. Los valores son expresados como media \pm SD. Para cada estado fenológico, distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el test de Tukey (HSD) por edades.

3.2. Composición química del aceite esencial

En la Tabla 18 del Anexo 1 se presenta el porcentaje relativo medio de los 103 componentes del aceite esencia identificados por GC-MS en diferentes estados fenológicos e intervalos de edad. A su vez, estos componentes representaron un porcentaje del total integrado por cromatografía del 73,57 % al 81,17 %. De estos 103 componentes descritos, los siguientes 20 compuestos fueron identificados como mayoritarios (porcentaje relativo >1 % y representaban entre el 53,3 % y el 61,47 % del total (Tabla 5).

El MLM ajustado mostró para todos los componentes individuales y grupos de compuestos incluidos en el análisis un efecto significativo entre los dos estados fenológicos analizados, a excepción del acetato de bornilo, que se mantuvo constante durante en todo en ensayo. La mayoría de los componentes presentaban un porcentaje relativo medio menor en floración frente a fructificación, a excepción de los compuestos canfeno, 2,2,6-trimetilciclohexano, borneol, verbenona, 15-nor-labdan-8-ol y 16-kaureno, cuyos porcentajes relativos fueron mayores en floración que en fructificación. Además, los grupos monoterpenos y sesquiterpenos tanto hidrocarbonados como

Capítulo 4

oxigenados mostraron porcentajes relativos superiores en fructificación, mientras que por el contrario, los diterpenos y el grupo denominado “otros” representaban un mayor porcentaje en floración (Figura 15).

Por el contrario, al igual que sucedía con el rendimiento en aceite esencial, el MLM para la composición química del aceite en los diferentes intervalos de edad analizados mostró un comportamiento diferente en función del estado fenológico en que se encontraban las plantas. De este modo, un número elevado de compuestos individuales y grupos de compuestos presentaron diferencias estadísticamente significativas para el factor edad de la planta en floración. Por tanto, durante este periodo de floración, las plantas jóvenes mostraron mayores porcentajes relativos en los compuestos palustrol, viridiflorol, ledol, 1-epi-cubenol y cadaleno, mientras que las plantas de mayor edad presentaban mayores porcentajes de α -pineno, canfeno, 2,2,6-trimetilciclohexano, borneol y verbenona. Sin embargo, no hubo cambios sustanciales entre los tres intervalos de edad analizados durante el estado fenológico de fructificación.

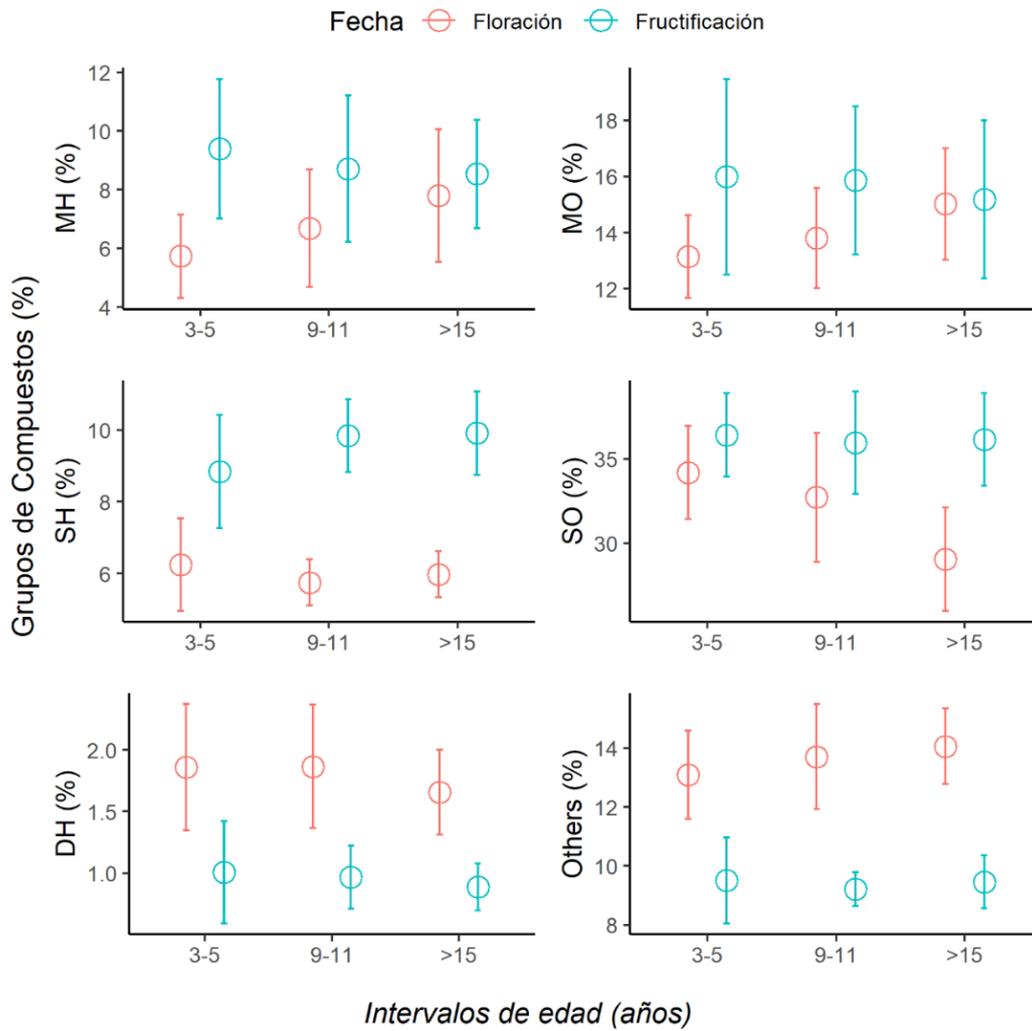


Figura 15. Porcentaje relativo (%) de los grupos de compuestos en diferentes estados fenológicos e intervalos de edad. Los valores son expresados como media \pm SD. MH: monoterpenos hidrocarbonados; MO: monoterpenos oxigenados; SH: sesquiterpenos hidrocarbonados; SO: sesquiterpenos oxigenados; DH: diterpenos hidrocarbonados.

Tabla 5. Composición química (%) del aceite esencial de *C. ladanifer* en dos estados fenológicos y tres intervalos de edad.

Compuestos	IK	Edad (años)	Floración			Fructificación			P-valor
			3-5	9-11	> 15	3-5	9-11	> 15	
α -Pino	936		1,54 b	2,05 ab	2,43 a	4,95 a	4,57 a	4,34 a	< 0,001
canfeno	951		0,85 b	1,14 ab*	1,60 a*	0,93 a	0,82 a	0,81 a	0,002
p-Cimeno	1026		0,87 a	0,91 a	0,93 a	1,18 a	1,05 b	1,09 ab	< 0,001
2,2,6-trimetilciclohexano	1037		4,09 b	4,76 a	4,77 a	2,65 a	2,32 a	2,34 a	< 0,001
L-trans-Pinocarveol	1139		1,67 a	1,70 a	1,66 a	4,24 a	4,18 a	3,84 a	< 0,001
pinocarvone	1162		0,61 a	0,59 a	0,57 a	1,47 a	1,50 a	1,40 a	< 0,001
borneol	1166		1,54 b	1,57 b	1,91 a	1,11 a	1,12 a	1,14 a	< 0,001
verbenona	1207		0,76 b	0,93 a	1,00 a	0,53 a	0,50 a	0,45 a	< 0,001
bornil acetato	1285		3,04 a	3,27 a	3,52 a	3,02 a	3,08 a	3,20 a	0,209
aloaromadendreno	1454		0,42 a	0,42 a	0,38 a	1,02 b*	1,22 a	1,14 b*	< 0,001
viridifloreo	1488		1,14 a	1,15 a	1,06 a	1,58 b	2,00 a	2,02 a	< 0,001
palustrol	1559		0,76 a	0,76 a	0,68 b	0,97 b	1,05 a	1,03 a	< 0,001
spatuleno	1570		0,98 a	0,98 a	0,87 a	1,62 ab*	1,62 a	1,49 b*	< 0,001
viridiflorol	1585		19,81 a	20,11 a	17,25 b	19,93 a	20,20 a	19,99 a	0,006
ledol	1594		9,70 a	8,12 b	7,81 b	10,09 a	9,21 a	9,81 a	< 0,001
1-epi-cubenol	1621		0,92 a	0,90 a	0,76 b	1,26 a	1,32 a	1,28 a	< 0,001
β -eudesmol	1641		0,78 ab*	0,91 a	0,61 b*	1,01 a	0,99 a	0,98 a	< 0,001
cadaleno	1668		1,34 a	1,00 b	1,05 b	1,50 a	1,40 a	1,38 a	< 0,001
15-nor-labdan-8-ol	1961		3,00 a	2,71 a	2,84 a	1,39 a	1,43 a	1,60 a	< 0,001
16-kaureno	2020		1,86 a	1,87 a	1,66 a	1,01 a	0,97 a	0,89 a	< 0,001
Total Representado			55,68	55,85	53,36	61,47	60,55	60,24	
Total Identificado			74,27	74,73	73,57	81,17	80,32	80,12	
Monoterpenos hidrocarbonados			5,73 b	6,69 ab	7,80 a	9,40 a	8,71 a	8,53 a	< 0,001
monoterpenos oxigenados			13,14 b	13,80 ab*	15,02 a*	15,99 a	15,86 a	15,18 a	< 0,001
Sesquiterpenos hidrocarbonados			6,25 a	5,75 a	5,97 a	8,84 b	9,84 a	9,91 a	< 0,001
Sesquiterpenos oxigenados			34,20 a	32,92 a	29,06 b	36,43 a	35,96 a	36,15 a	< 0,001
Diterpenos hidrocarbonados			1,86 a	1,87 a	1,66 a	1,01 a	0,97 a	0,89 a	< 0,001
Otros			13,09 b	13,70 ab	14,06 a	9,51 a	9,21 a	9,46 a	< 0,001

Componentes listados por orden de elución en una columna apolar HP-5; IR: índices de retención de Kovats relativos a n-alcános en una columna apolar HP-5; valores expresados como media de 4 poblaciones y 3 parcelas (n=12); valores $\geq 5\%$ en negrita. Valores seguidos de distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el test de Tukey (HSD). Letras seguidas de un * indican diferencias marginalmente significativas ($0,05 > p > 0,10$).

Se llevó cabo un análisis de correlación por pares de los compuestos mayoritarios para determinar posibles patrones de agrupamiento que se encuentren interaccionando en las misma ruta biogénica y/o que puedan evolucionar de forma conjunta en el desarrollo de las plantas en base a los factores analizados en el estudio (estado fenológico y edad) (Figura 16). El análisis presentado separó la composición química en 5 grupos (mostrados en la diagonal desde arriba hacia abajo) con correlaciones pareadas altas entre sí en diferentes compuestos.

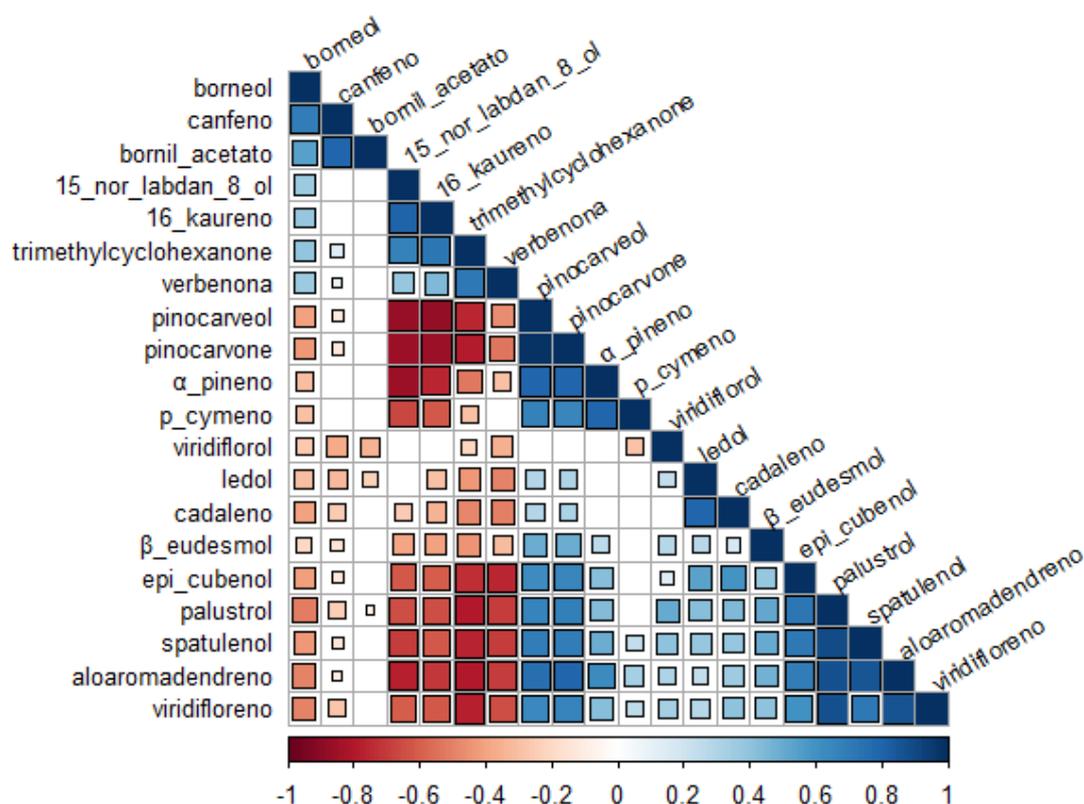


Figura 16. Matriz de correlación por pares entre los componentes mayoritarios (%) del aceite esencial. Se empleó el coeficiente de correlación de Spearman con corrección de Bonferroni y un factor de agrupamiento de compuestos en la diagonal. En el mapa, un cuadrado de color representa una correlación significativa, y el tamaño y la intensidad del cuadrado indican el valor de correlación.

El primer grupo estaba compuesto por canfeno, borneol y bornil acetato, que en su conjunto presentaban un mayor porcentaje relativo en época de floración, y además, en este mismo periodo las plantas de mayor edad también acumulaban una mayor cantidad. El segundo grupo compuesto por el 2-2-6-trimethylcyclohexanone, 15-nor-

Capítulo 4

labdan-8-ol y 16-kaureno presentaban también una mayor cantidad en floración frente a fructificación, pero al contrario que en el grupo I, las plantas de 3-5 años presentaban un porcentaje mayor que el resto en floración. A su vez, los monoterpenos α -pineno, p-cimeno, pinocarveol y pinocarvone formaban el grupo tercero, que estaba caracterizado por presentar porcentajes relativos bastante mayores en fructificación que en floración, y a su vez, se mantuvieron estables en el factor edad en ambos periodos. El cuarto grupo estaba formado solamente por ledol y cadaleno, cuya acumulación era mayor en fructificación y las plantas más jóvenes mostraban un contenido mayor que las adultas en floración. Por último, los compuestos sesquiterpénicos aloaromadendreno, viridifloreno, palustrol, espatulenol y 1-epi-Cubenol conformaban el último grupo (grupo V), que presentaban mayores porcentajes relativos durante la fructificación, y no mostraban resultados demasiado concordantes entre sí en el factor edad.

3.3. Análisis multivariante

El análisis multivariante de componentes principales ajustado en este apartado en base a la composición química de los componentes mayoritarios del aceite se muestra en la Figura 17. Este análisis consiguió explicar con los dos primeros componentes principales un 76 % de la variación total existente, repartidos a su vez en un 62 % para el componente 1 (PC1) y en un 14 % para el componente 2 (PC2). En primer lugar, el componente PC1 presentó una correlación alta y positiva con los compuestos α -pineno (0,79), pinocarveol (0,90), pinocarvone (0,91), aloaromadendreno (0,99), viridifloreno (0,88), palustrol (0,97), espatulenol (0,97), epi-cubenol (0,90) y β -eudesmol (0,75) mientras que se correlacionaba negativamente con los componentes 2-2-6-trimethylcyclohexanone (-1,00), borneol (-0,89), verbenona (-0,83), 15-nor-labdan-8-ol (0,92) y 16-Kaureno (-0,90). De este modo, este componente PC1 consiguió separar de forma clara las muestras recolectadas en floración de aquellas obtenidas en fructificación. En segundo lugar, el componente PC2 mostró una correlación moderada y positiva con los componentes viridiflorol (0,66), ledol (0,58) y cadaleno (0,63), mientras que con el α -pineno (-0,63) y p-cimeno (-0,70) se correlacionó negativamente. El componente PC2 separó ligeramente las muestras en función de la edad en el periodo de floración, pero no hubo separación entre los niveles de este factor en fructificación.

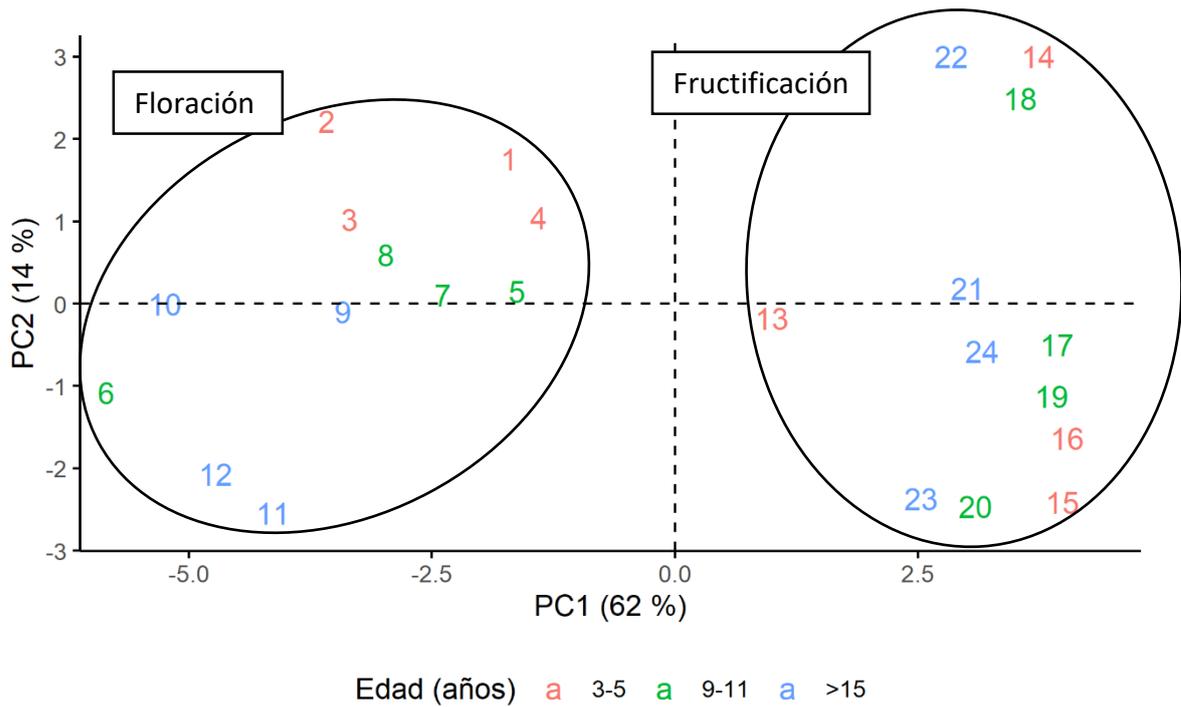


Figura 17. Distribución de muestras del análisis PCA realizado con los componentes mayoritarios del aceite esencial de *C. ladanifer*.

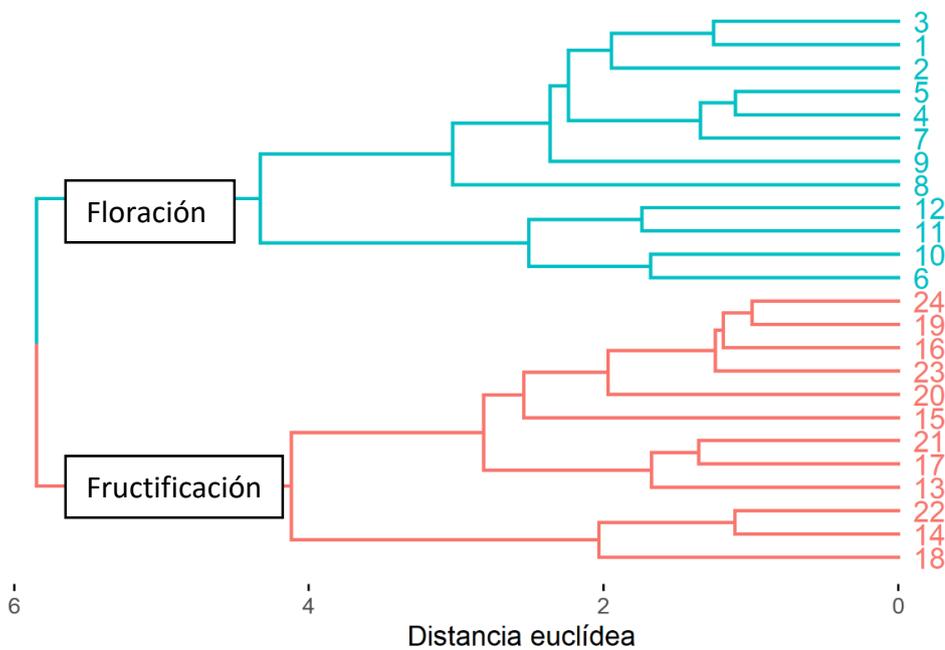


Figura 18. Dendrograma obtenido por análisis clúster y basado en distancias euclídeas (método UPGMA) de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *C. ladanifer* en 4 poblaciones, 2 estados fenológicos y 3 intervalos de edad.

Capítulo 4

El dendrograma de la Figura 18 resultado de aplicar el análisis de conglomerados (CA) a los componentes más representativos del aceite esencial muestra una concordancia clara con los resultados descritos anteriormente en el PCA. Esta Figura 18 muestra una separación clara en dos clústeres principales, que se corresponde con los dos estados fenológicos estudiados (floración y fructificación). A su vez, dentro del clúster principal asociado al periodo de floración, las muestras (1-12) se ordenaron correctamente de menor a mayor edad.

3.4. Rendimiento y composición química de hojas y tallos

Las hojas presentaron un rendimiento medio de $0,25 \pm 0,03$ % y los tallos de $0,19 \pm 0,05$ %. Además, la diferencia entre ambos órganos fue significativa ($t = 3,24$; $P < 0,01$). La composición química de los aceites esenciales de hojas y tallos se muestra en la Tabla 6. Se identificaron 18 componentes como mayoritarios en el análisis, que representaban del total integrado en los cromatogramas un 58,83 % en hojas y un 59,68 % en tallos. La prueba t de Student empleada mostró diferencias entre ambos niveles en todos los casos con excepción del aloaromadendreno, viridifloreño y 1-epi-cubenol. Además, las hojas presentaban un porcentaje relativo significativamente mayor de los compuestos α -pineno, p-cimeno, 2,2,6-trimetilciclohexano, L-trans-pinocarveol, pinocarvone, borneol y bornil acetato. Por el contrario, los compuestos palustrol, espatulenol, viridiflorol, ledol, β -eudesmol, cadaleno, 15-nor-labdan-8-ol y 16-kaureno fueron más abundantes en los tallos.

La Figura 19 muestra los porcentajes relativos medios para los diferentes grupos de compuestos identificados en función de la parte de la planta utilizada (tallos y hojas). Las hojas presentaron un mayor porcentaje en monoterpenos (hidrocarbonados y oxigenados) y del grupo denominado "otros", mientras que en los tallos dominaron los sesquiterpenos (hidrocarbonados y oxigenados) y diterpenos hidrocarbonados.

Tabla 6. Composición química (%) del aceite esencial de *C. ladanifer* en tallos y hojas.

Compuestos	IK	Hojas	Tallos	p-valor
α-pineno	936	2,92	1,76	0,049
p-cimeno	1026	0,89	0,65	0,028
2,2,6-trimetilciclohexano	1037	2,00	1,58	0,007
trans-pinocarveol	1139	4,35	1,00	<0,001
pinocarvone	1162	1,54	0,39	<0,001
borneol	1166	1,11	0,62	<0,001
bornil acetato	1285	3,46	2,25	<0,001
aloaromadendreno	1454	1,17	1,19	0,671
viridifloreno	1488	2,09	2,18	0,643
palustrol	1559	1,09	1,24	0,008
espatulenol	1570	1,63	1,97	<0,001
viridiflorol	1585	20,27	25,36	<0,001
ledol	1594	9,70	11,05	0,004
1-epi-cubenol	1621	1,44	1,29	0,204
β-eudesmol	1641	1,04	1,43	0,022
cadaleno	1668	1,49	2,07	0,012
15-nor-labdan-8-ol	1961	1,57	1,86	0,019
16-kaureno	2020	1,06	1,78	0,004
Total Representado		58,83	59,68	
Total Identificado		79,20	76,35	
Monoterpenos hidrocarbonados		6,47	4,03	0,010
monoterpenos oxigenados		15,53	7,14	<0,001
Sesquiterpenos hidrocarbonados		10,11	11,04	0,065
Sesquiterpenos oxigenados		36,79	44,62	<0,001
Diterpenos hidrocarbonados		1,06	1,78	0,004
Otros		9,24	7,74	<0,001

Componentes listados por orden de elución en una columna apolar HP-5; IR: índices de retención de Kovats relativos a n-alcános en una columna apolar HP-5; valores expresados como media (n=12 parcelas); valores ≥ 5 % en negrita.

Capítulo 4

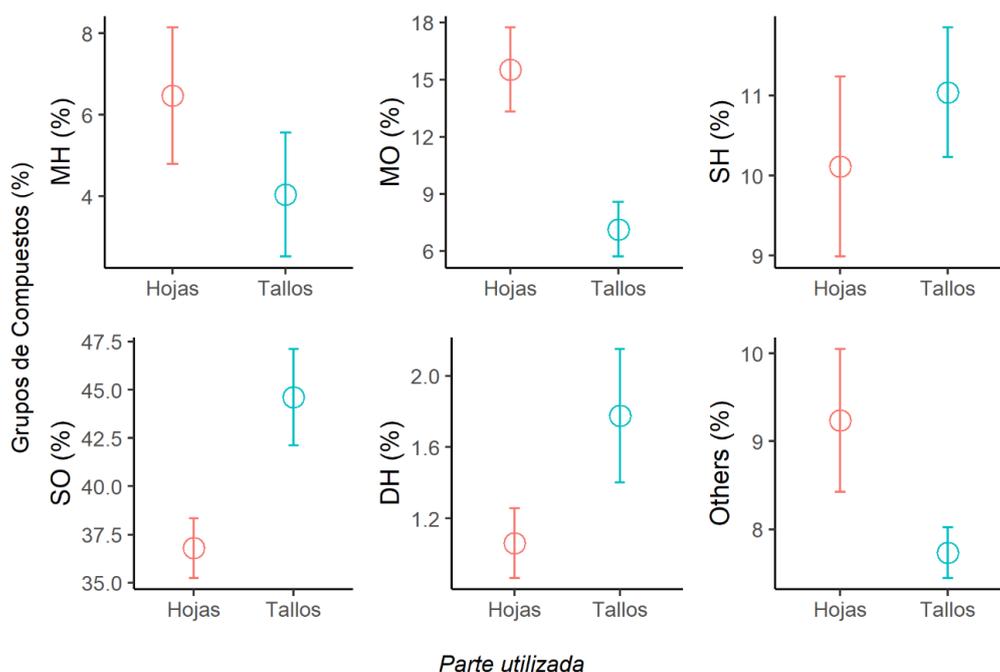


Figura 19. Porcentaje relativo (%) de los grupos de compuestos en hojas y tallos. Los valores son expresados como media \pm SD. MH: monoterpenos hidrocarbonados; MO: monoterpenos oxigenados; SH: sesquiterpenos hidrocarbonados; SO: sesquiterpenos oxigenados; DH: diterpenos hidrocarbonados.

4. DISCUSIÓN

Las diferencias en la compleja composición química de dos aceites esenciales de una misma especie pueden ser en ocasiones, difíciles de asignar a quimiotipos concretos o al efecto de interacción de estos con condiciones ambientales específicas. Además, las rutas biosintéticas encargadas del metabolismo secundario de plantas, y la eficiencia de las distintas enzimas implicadas en dichas rutas, pueden variar en función de las diferentes partes de las plantas o en las distintas etapas de desarrollo de esta (Franz & Novak, 2010). Por tanto, para determinar el estado óptimo de recolección de las plantas, con el fin de obtener un producto final de alta calidad y con las características deseables en cuanto a composición y/o el rendimiento, es importante identificar los factores que influyen en su producción y saber, en cada caso, sus requerimientos particulares (Barra, 2009; Figueiredo et al., 2008).

4.1. Rendimiento en aceite esencial

En nuestro estudio, el rendimiento medio en aceite esencial fue menor en el periodo de floración que en fructificación. Nuestros resultados concuerdan con los descritos por otros autores en aceites esenciales de *C. ladanifer* obtenidos en condiciones similares a las nuestras, pero analizando en su caso, un único estado fenológico. De este modo, en un estudio con plantas recolectadas en Marruecos durante el mes de abril, El Karkouri et al. (2021) reportaron un rendimiento en aceite esencial del 0,21 %. En Marruecos y España, Greche et al. (2009) y Verdeguer et al. (2012) encontraron rendimientos en aceite esencial entre el 0,3-0,4 %, en plantas cosechadas durante los meses de agosto y octubre, respectivamente. Por otro lado, mientras que las plantas jóvenes presentaron menor rendimiento en aceite que las adultas en floración, no se detectaron diferencias entre las distintas edades en fructificación. En relación con este factor, no se ha encontrado estudios que hagan referencia a la edad de la planta en ninguna especie del género *Cistus*, incluida la de estudio.

En la gran mayoría de especies, el rendimiento en aceite esencial varía a lo largo del año, dependiendo de la fase de desarrollo en la que se encuentre la planta (Franz & Novak, 2010). En este sentido, numerosos estudios han relacionado estas fluctuaciones con los diferentes estados fenológicos, y a su vez, los resultados encontrados en ocasiones son contrapuestos. Algunos autores han encontrado rendimientos en aceite esencial más elevados durante el periodo de floración (Ben Farhat et al., 2019; Blanco Salas et al., 2012), mientras que otros, los mayores rendimientos los reportaron en la fase de fructificación (Maria J. Jordán et al., 2013; Usano-Aleman et al., 2012). Por otro lado, muy pocos estudios y en condiciones no comparables a las nuestras, han descrito la influencia del factor edad en la biosíntesis de aceite esencial (Hudaib et al., 2002; Pagula et al., 2000).

Los compuestos volátiles del metabolismo secundario de plantas presentes en el aceite esencial, están asociados con funciones de protección y defensa de la planta, atracción de insectos polinizadores o fenómenos alelopáticos (Maffei, 2010). De este modo, la mayor acumulación de aceite esencial encontrada en fructificación (finales de agosto), podría estar relacionada con la protección de las semillas frente a microorganismos patógenos como hongos y bacterias. Además, las plantas sometidas a

Capítulo 4

situaciones de estrés por condiciones climáticas adversas son más propensas al ataque de herbívoros y organismos patógenos (Figueiredo et al., 2008). Así, la situación de estrés hídrico por falta de precipitaciones (ver climograma, Figura 34 Anexo 2) que sufren las plantas en nuestra zona en verano puede debilitarlas, y así, estimular la biosíntesis de aceite esencial como mecanismo de defensa frente a distintos ataques. Por el contrario, la atracción de insectos polinizadores podría ser la explicación ecológica más probable a la mayor producción de aceite esencial encontrada en las plantas adultas en floración. La especie *C. ladanifer* entra en floración a los 3-4 años y el número de flores producidas por planta aumenta con la edad (Talavera et al., 1993). Por tanto, la escasa o nula producción de flores en las plantas jóvenes frente a las adultas, podría conducir a una menor biosíntesis de compuestos volátiles para atraer a estos polinizadores.

En un segundo ensayo con plantas de 3-5 años recolectadas a finales de agosto, se observó que el rendimiento en aceite esencial de las hojas era superior al de los tallos. Aunque se ha encontrado algún estudio donde el rendimiento en aceite esencial era similar entre diferentes partes de la planta (Palá-Paúl et al., 2005), la gran mayoría de los consultados para diferentes especies mostraban mayores rendimientos en aceite esencial en hojas que en los tallos (Perry et al., 1999; Yuan et al., 2016).

4.2. Composición química

El análisis químico de las muestras para los compuestos individuales y grupos de compuestos mostró mayores variaciones en función del estado fenológico que para la edad de las plantas. Los grupos de monoterpenos y sesquiterpenos estaban en mayores proporciones en fructificación, mientras que en floración lo estaban los diterpenos y el grupo denominado "otros". En un estudio llevado a cabo con *Cistus libanotis* L. del norte de Marruecos, Zidane et al. (2013) encontraron también mayores porcentajes de monoterpenos (hidrocarbonados y oxigenados) y sesquiterpenos oxigenados en muestras recolectadas en verano en comparación con aquellas recogidas en primavera. En algunos estudios con especies de otras familias botánicas, la comparación de la composición química entre ambos estados fenológicos mostró resultados similares a los nuestros, pero con algunas ligeras variaciones. De este modo, por ejemplo, en *Salvia*

verbenaca L. procedentes del norte de Túnez y cultivadas en Murcia, Ben Farhat et al. (2019) mostraron una mayor proporción de todos los grupos terpenos durante la fructificación, pero con excepción del grupo monoterpenos hidrocarbonados, que era más abundante en floración. Además, durante el periodo de floración, las plantas de mayor edad mostraban mayores porcentajes en los grupos monoterpenos y “otros”, mientras que por el contrario, los sesquiterpenos estaban más elevados en plantas jóvenes. Por otro lado, la edad no varió su proporción en ningún grupo de compuestos en fructificación. Aunque pocos estudios han analizado el factor edad, estos a su vez han encontrado diferencias en la composición química del aceite esencial de plantas con distintas edades (Hudaib et al., 2002; C. P. dos Santos et al., 2015).

La biosíntesis de los componentes mayoritarios descritos en el estudio sigue rutas metabólicas diferentes, y por tanto, la mayor o menor proporción de cada uno de ellos puede estar relacionada con la activación de su ruta metabólica específica (Croteau et al., 2000). A su vez, las fluctuaciones encontradas en estos compuestos podrían sugerir la influencia, directa o indirecta, de factores fisiológicos como el estado fenológico o la edad en las rutas biogénicas de la planta (Barra, 2009). De este modo, el análisis de correlación por pares apoyado por los análisis multivariantes, nos permitió identificar 5 grupos de compuestos que interactuaban simultáneamente en el estudio, lo que nos permite evaluarlos conjuntamente.

Los compuestos canfeno, borneol y acetato de bornilo que componían el primer grupo, se caracterizan por presentar como precursor común el catión bornilo, y por tanto, se sintetizan a través de la misma ruta metabólica (Despinasse et al., 2017). La máxima expresión del conjunto formado por estos tres compuestos se producía en las plantas adultas en fase de floración, por lo que podrían estar implicados en funciones de atracción de polinizadores o protección de la planta frente a insectos dañinos (Guitton et al., 2010). En nuestro estudio, aunque las muestras en floración estaban compuestas por hojas, tallos y flores mezcladas, el porcentaje más elevado de estos compuestos en plantas adultas se podría deber al mayor porcentaje de flores en la muestra para estas edades. En un estudio en *Salvia lavandulifolia* Vahl, Schmiederer et al. (2008) encontraron porcentajes muy superiores de borneol en diferentes partes de las flores implicadas en la polinización (anteras y corola) en comparación con las hojas y el cáliz, lo que corrobora su posible implicación en el proceso de atracción de insectos.

Capítulo 4

Por otro lado, el canfeno mostró porcentajes superiores en el cáliz y las hojas, lo que indica en este caso una posible función de defensa en la planta. Además, de acuerdo con esta función defensiva, Feng et al. (2019) demostraron un fuerte efecto tóxico y repelente contra dos especies de insectos de los compuestos acetato de bornilo y canfeno.

El segundo grupo estaba compuesto por el 2-2-6-trimethylcyclohexanone, 15-nor-labdan-8-ol y 16-kaureno, entre los cuales no se ha establecido una relación biogenética determinada, pero que son compuestos característicos y especialmente importantes en el aroma del aceite esencial de *C. ladanifer* (Gomes et al., 2005). Estos componentes presentaban los mayores porcentajes en las plantas durante la floración, y por tanto, podrían estar implicados en funciones relacionadas con la defensa, el crecimiento y la atracción de insectos polinizadores. Los componentes derivados de los carotenoides como el 2-2-6-trimethylcyclohexanone, más allá de sus características saborizante y aromáticas, pueden actuar como fitohormonas, compuestos de señalización y cromóforos (Serra, 2015). Por otro lado, los compuestos 15-nor-labdan-8-ol y 16-kaureno son diterpenos tipo labdano, que se han encontrado principalmente en resinas de plantas, y están asociados con funciones de defensa frente a diferentes estreses bióticos (Demetzos & Dimas, 2001). Además, el 16-kaureno es la molécula orgánica precursora en la síntesis de giberelinas, fitohormona involucrada principalmente en funciones de crecimiento como elongación de raíces, hojas jóvenes y flores, así como también en el proceso de iniciación floral (Salazar-Cerezo et al., 2018).

Los compuestos α -pineno, p-cimeno, pinocarveol y pinocarvona formaban el tercer grupo, que además de encontrarse en una proporción muy superior en fructificación, presentan relaciones comunes en su biosíntesis. De este modo, los monoterpenos hidrocarbonados α -pineno y p-cimeno presentan el catión α -Terpinyl como precursor común, mientras que los compuestos oxigenados pinocarveol y pinocarvona son sintetizados directamente por oxidación del α -pineno (Croteau et al., 2000; Soares-Castro et al., 2021). La mayor acumulación durante la fructificación, especialmente del α -pineno y sus derivados, podría estar asociada con la protección de la planta frente a patógenos y herbívoros, así como con efectos alelopáticos para la germinación de otras semillas y microorganismos del suelo (Langenheim, 1994; Maffei, 2010).

Los grupos cuarto y quinto estaban compuestos en su totalidad por sesquiterpenos hidrocarbonados (cadaleno, aloaromadendreno y viridifloreno) y oxigenados (ledol, palustrol, espatulenol y 1-epi-Cubenol), y ambos grupos presentaban mayores porcentajes durante la fase de fructificación. A su vez, los componentes cadaleno y 1-epi-Cubenol son derivados del cadineno, mientras que el resto de compuestos presentan el mismo esqueleto de aromadendreno (Weyerstahl et al., 1998). Al igual que el grupo 3 descrito anteriormente, algunos de estos compuestos podrían estar implicados principalmente en funciones de defensa de la planta y alelopáticas (Gijsen et al., 1995).

Finalmente, aunque bastantes especies presentan una composición de aceite esencial similar en los diferentes órganos de la planta, esta composición también puede depender en gran medida de la parte de la planta utilizada: flores, hojas, tallos, corteza, madera, frutos o raíces (Figueiredo et al., 2008). En dos estudios con tres especies del género *Cistus* como *albidus*, *salviifolius* o *creticus*, en los cuales, (Palá-Paúl et al., 2005) y Abu-Orabi et al. (2020) analizaron por separado la composición química de hojas y flores, se observó grandes variaciones en la composiciones química entre las diferentes partes empleadas. En este estudio, nosotros analizamos por separado el aceite esencial de hojas y tallos recolectadas de plantas jóvenes en fructificación. En un estudio con flores, hojas y tallos de *Salvia officinalis* L., Verma et al. (2015) encontraron resultados muy similares a los descritos en nuestro ensayo. De este modo, si nos fijamos en sus resultados para hojas y tallos únicamente, ellos también encontraron mayores proporciones de monoterpenos hidrocarbonados y oxigenados en las hojas, mientras que los sesquiterpenos y dipertenos tipo labdano se encontraban en mayor cantidad en los tallos. Además, al igual que en nuestro caso, el grupo sesquiterpenos hidrocarbonados apenas varió entre ambas partes de la planta. Estas diferencias encontradas en la composición química de hojas y tallos, podría ser explicada en parte por la heterogénea distribución de las estructuras secretoras especializadas o por la necesidad de cumplir funciones ecológicas diversas en órganos específicos de la planta (Figueiredo et al., 2008).

CAPÍTULO 5

Efecto del riego y la fertilización en la producción de aceite esencial de *C. ladanifer* ensayado bajo condiciones naturales

1. INTRODUCCIÓN

Cistus ladanifer L. (Cistaceae) es un arbusto que presenta una adaptación extrema a las condiciones de estrés propias de la Región Mediterránea, tales como sequía, alta exposición solar e infertilidad de suelos (Frazão et al., 2018). En los últimos años, los productos derivados del metabolismo secundario de esta especie, como el aceite esencial, han despertado un gran interés no solo por sus propiedades aromáticas, sino también por su importancia biológica para la industria farmacológica y agroalimentaria (Barrajón-Catalán et al., 2016; E. Santos et al., 2017). No obstante, como la mayoría de compuestos del metabolismo secundario, la producción de aceite esencial en la planta puede verse afectada por diferentes factores geográficos, genéticos, fisiológicos y ambientales (Zuzarte & Salgueiro, 2015). Aunque algunos autores han afirmado que la producción de metabolitos secundarios está controlada por rutas genéticas, su biosíntesis puede también verse fuertemente afectada por factores ambientales (Franz & Novak, 2010). Por tanto, factores de estrés abióticos tales como la sequía, altas temperaturas o escasez de nutrientes, pueden afectar en gran medida tanto a parámetros de crecimiento de la planta, como al rendimiento y la composición química de los aceites esenciales (Maffei, 2010). Además, en un escenario global de cambio climático, especialmente agudo en regiones como la mediterránea, se prevé un aumento considerable de eventos extremos que afecten a la vegetación, como pueden ser temperaturas extremas, sequías más severas y degradación del suelo (Francos et al., 2018; Tardieu et al., 2018).

La sequía es considerada uno de los factores ambientales más limitantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas en muchas zonas del mundo, especialmente en regiones áridas o semiáridas, que a su vez, puede verse agravada por el efecto de las altas temperaturas y radiación solar (Chai et al., 2016). Así, el estrés por déficit hídrico genera cambios fisiológicos como el cierre estomático y la limitación de la tasa fotosintética debido a la baja disponibilidad de CO₂, lo que puede afectar al crecimiento de la planta y la biosíntesis de metabolitos secundarios (Kleinwächter et al., 2015). Sin embargo, a pesar de que el estrés por sequía suele afectar de manera positiva a la síntesis de metabolitos secundarios (Selmar et al., 2017), se ha demostrado que bajo condiciones de sequía severas o prolongadas en el tiempo, la producción puede

Capítulo 5

disminuir (Abdi et al., 2019; Bettaieb Rebey et al., 2012). En este sentido, varios autores han evaluado el efecto del déficit de agua sobre el rendimiento, la composición química y algunas características morfofisiológicas de diferentes especies de plantas aromáticas y medicinales, con resultados en ocasiones dispares. Corell et al. (2009) mostraron un descenso progresivo de la producción de aceite esencial y biomasa seca a medida que aumentaba el estrés hídrico en plantas de *Salvia officinalis* L. Por otro lado, un aumento del estrés hídrico en *Matricaria recutita* L., provocó un decremento en la altura de las plantas, producción de flores y peso de los brotes, pero no afectó de manera significativa ni al rendimiento ni a la composición química del aceite esencial (Baghalian et al., 2011).

La fertilidad del suelo es un factor fundamental en el crecimiento, desarrollo y rendimiento en biomasa de las plantas, ya que garantiza el suministro de nutrientes esenciales. La fertilización mineral del suelo ha sido considerada como una de las prácticas que más pueden influir en la biosíntesis del aceite esencial, y dentro de esta, los macronutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio son considerados los principales responsables (Moghaddam & Mehdizadeh, 2017). Sin embargo, el uso continuado de estos fertilizantes químicos provoca una reducción de la materia orgánica del suelo y problemas de contaminación ambiental (Rao, 2001). Por tanto, el uso de fertilizantes orgánicos puede reducir la excesiva dependencia de productos químicos, ya que presentan grandes posibilidades de suministrar nutrientes de una forma más sostenible (Bajeli et al., 2016). A su vez, estos fertilizantes orgánicos han sido asociados con propiedades favorables para el suelo, incluyendo una mayor disponibilidad de nutrientes, capacidad de retención de agua, capacidad de intercambio catiónico y menor densidad aparente, así como el fomento de aparición de microorganismos beneficiosos (Drinkwater et al., 1995). Aunque la mayoría de autores han mostrado que la aplicación de fertilización orgánica provoca un aumento progresivo de la biomasa y modificaciones en la biosíntesis de aceite esencial en distintas especies de plantas (Aghaei et al., 2019; Burducea et al., 2018), algunos autores no han encontrado un efecto claro sobre estas variables tras su aplicación (Teles et al., 2014).

Hasta donde sabemos, no hay estudios que hayan evaluado la respuesta al aporte de agua y nutrientes en ninguna especie del género *Cistus*, incluida la especie de estudio *C. ladanifer*. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue evaluar bajo condiciones naturales, el efecto del aporte de riego, fertilización orgánica y la

interacción entre ambos, sobre el rendimiento y composición química del aceite esencial de *C. ladanifer* L. Además, se determinó la variación en la producción de aceite esencial a lo largo de todo el periodo de cosecha tradicionalmente empleado, con el objetivo de conocer la fecha idónea de recolección del recurso en esta zona.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

La zona de estudio se sitúa en el término municipal de Guijo de Granadilla, ubicado al norte de la provincia de Cáceres (40°12'46.4"N 6°09'1.56"O). El clima en la zona es típicamente mediterráneo, con una temperatura media anual de 16.3 °C y una marcada sequía estival, con temperaturas medias máximas en julio de 31,9 °C. Las precipitaciones se concentran durante el invierno y escasean en verano, con una media anual de 685 mm. Los ensayos se llevaron a cabo en la finca de dehesa "Las Barderas", situada a una altitud de 416 m y con una pendiente media del terreno del 2,5-3 %. La vegetación existente en la zona se divide en dos estratos, uno herbáceo o arbustivo compuesto principalmente por pastos y jaras (*Cistus ladanifer*), y otro arbóreo, compuesto por encinas (*Quercus ilex* L. ssp. *ballota*) en densidades muy bajas. Los ensayos se llevaron a cabo en una superficie de jaral de unas 10 ha, que previamente había sido roturado durante el año 2014, y por lo tanto, al comienzo del experimento estaba compuesto de plantas jóvenes de jara (4 años) en unas condiciones naturales similares a un cultivo.

2.2. Diseño experimental y material vegetal

En un diseño experimental split-plot se seleccionaron 4 bloques repartidos al azar por la zona de estudio, en los que a su vez se delimitaron 4 parcelas de 50 m² cada una. Previamente al ensayo y para caracterizar la zona de estudio, se tomaron datos en cada uno de los bloques que nos permitieron determinar tanto las características edáficas, como la densidad y la edad de las plantas. La densidad media de plantas por metro cuadrado en cada uno de los bloques se estimó lanzando aleatoriamente 20 veces un aro de un 1 m² y contando las plantas que quedaban dentro de este.

Capítulo 5

Simultáneamente, se midió también la altura de 40 plantas seleccionadas al azar por todo el bloque, para posteriormente determinar la edad de las plantas a través de la fórmula que relaciona ambas variables y que fue descrita anteriormente en el apartado 2.1 del capítulo 4. Además, se llevó a cabo un análisis de suelo en cada uno de los bloques conforme a la metodología expuesta en el apartado 4 del capítulo 2. Estos resultados descriptivos de la zona se exponen a continuación en la Tabla 7.

Los cuatro tratamientos aplicados en cada una de las parcelas fueron: riego, fertilización, riego + fertilización y control (sin riego ni fertilización). Se aplicaron dos riegos a capacidad de campo (dosis de 40 l/m²) en las dos fechas de máximas necesidades hídricas (última semana de junio y julio) previas al comienzo de la recolección (ver Figura 20). La dosis a capacidad de campo se calculó para un suelo arenoso franco (75,5 % arena, 4,8 % arcilla y 19,3 % limo) con las ecuaciones descritas por Saxton et al. (1986) y para una profundidad del sistema radicular de 30 cm. Los riegos por aspersión se aplicaron con un camión con cuba de 16000 litros de capacidad que llevaba acoplado un dispersor “cuello de cisne” con medidor volumétrico. La fertilización se llevó a cabo con estiércol comercial de caballo (madurado y cribado) a una dosis de 5 t/Ha. El fertilizante se aplicó en las parcelas durante el mes de marzo y se incorporó ligeramente al suelo con la ayuda de un rastrillo manual de dientes. Las características físico-químicas del fertilizante empleado se muestran en la Tabla 8.

En cada una de las parcelas se recolectaron los brotes jóvenes (tallos y hojas) de 15-20 plantas seleccionadas al azar, que se mezclaron de forma homogénea para conseguir una muestra por parcela. Se realizaron tres recolecciones en cada parcela durante la primera quincena de agosto, septiembre y octubre, coincidiendo con el periodo tradicional de cosecha del recurso. Además, los ensayos fueron repetidos bajo idénticas condiciones en dos años consecutivos (2019 y 2020).

Tabla 7. Características del suelo y de las plantas de *C. ladanifer* en la zona de estudio.

VARIABLES	BLOQUE 1	BLOQUE 2	BLOQUE 3	BLOQUE 4
pH	4,7	4,5	4,6	4,7
Conductividad (µS/cm)	21,6	27,7	22	25
Materia orgánica (%)	1,01	1,12	1,01	1,02
Nitrógeno Total (%)	0,1	0,1	0,09	0,1
P Olsen (mg/Kg)	< 2,5	< 2,5	< 2,5	<2,5
C.I.C (meq/100 gr)	7,36	7,47	7,36	8,01
Arena	69,73	84,6	74,63	74,52
Arcilla	5,42	2,94	5,43	5,46
Limo	24,85	12,46	19,94	20,02
Densidad (pl/m ²)	4,95	6,5	4,9	5,4
Edad (años)	4,09	4,08	4,01	4,11

Tabla 8. Composición físico-química del fertilizante orgánico empleado en el experimento.

	pH	EC (dS/m)	C/N	%			g Kg ⁻¹					
				CO	MO	H	N	P	K	Ca	Mg	B
Abono orgánico	7,8	2,5	14	40	70	34	14	3	7	11,5	1,9	0,015

2.3. Extracción y análisis químico del aceite esencial

Se siguió la misma metodología descrita en los apartados 1 y 3 del capítulo 2 tanto en la extracción como en la caracterización del aceite esencial. No obstante, la cantidad de material vegetal seco introducido en el destilador para este experimento fue de 150 gramos por muestra. Además, con el objetivo de evaluar el efecto de los diferentes factores analizados sobre la parte aérea joven recolectada, se seleccionaron 20 brotes (tallos y hojas secos) al azar del material excedente de cada muestra y se midió en cada uno de ellos la longitud en cm, el peso en gramos del brote entero y el peso en gramos de hojas y tallos por separado.

Capítulo 5

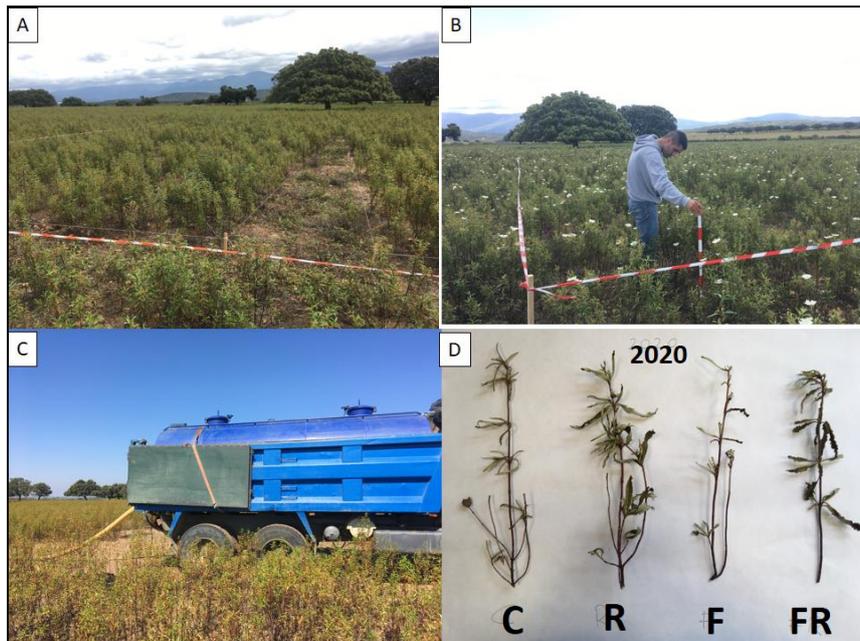


Imagen 5. Diferentes situaciones de trabajo. (A)-delimitación de parcelas de estudio; (B)-caracterización de los bloques; (C)-aplicación de riego; (D)-muestras de brotes empleados en el estudio bajo los cuatro tratamientos.

2.4. Datos climáticos

Se tomaron datos climáticos de los dos años (2019 y 2020) en los que se desarrolló el experimento, como se describe en el apartado 4 del capítulo 2. A su vez, estos resultados climáticos obtenidos nos ayudaron a determinar que parte de la variabilidad obtenida en el estudio (fecha de recolección y año) puede ser en parte explicada por estas variables climáticas. Por su importancia, se emplearon en esta descripción únicamente los datos de temperatura media y precipitación acumulada. De este modo, se ajustó un diagrama ombroclimático con los datos mensuales de temperatura media y precipitación acumulada para cada uno de los dos años de estudio, que se detalla a continuación en la Figura 20.

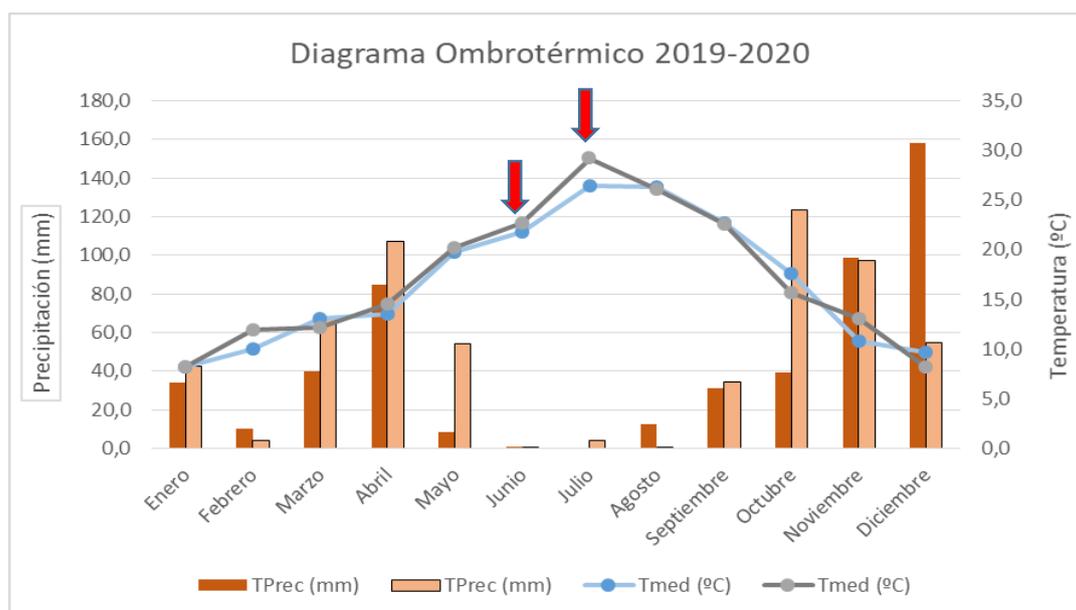


Figura 20. Variación mensual de la precipitación total acumulada (mm) y la temperatura media (°C) durante los dos años de estudio. Las flechas rojas marcan los episodios de riego en la parcela.

2.5. Estimación indirecta del estrés hídrico

La estimación del estrés hídrico de la vegetación en la parcela de estudio se llevó cabo de forma indirecta a través de herramientas de teledetección. Para ello, se han empleado índices de vegetación calculados a partir de imágenes multispectrales obtenidas del satélite Sentinel-2, que se caracterizan a su vez por presentar alta resolución espacial, espectral y temporal (Aldana et al., 2020). Los índices de vegetación empleados fueron el NDVI (Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada) y el NDMI (Índice de Humedad de Diferencia Normalizada), debido a que han sido relacionados previamente con el nivel de estrés por sequía que presenta la vegetación (Das et al., 2021). El NDVI es un índice primario relacionado con el contenido de clorofila en las hojas, y por tanto, con la capacidad fotosintética de la vegetación, derivada de reflejar la radiación infrarroja en la estructura interna del mesófilo y absorber la radiación visible roja por la clorofila (Tucker & Sellers, 1986). Por otro lado, el NDMI estima el contenido de agua en los tejidos esponjosos del mesófilo de las cubiertas vegetales de plantas que interactúan con la radiación solar y, por tanto, está directamente relacionado con el estado hídrico de la vegetación y el suelo (Gao, 1996).

Capítulo 5

Estos índices se calcularon para todas las imágenes disponibles (en ausencia de nubes) de abril a noviembre de los años 2019 y 2020 (26 imágenes en total por año). Los valores medios de los índices se extrajeron de 60 puntos repartidos al azar por toda la parcela cada uno un pixel (20 x 20 m) determinado en la imagen. Además, estos puntos excluían tanto los árboles como las cuatro áreas (bloques) empleadas en los ensayos, debido a que el tamaño de bloques y parcelas era menor a un pixel, y por tanto, los distintos tratamientos aplicados podrían interferir en el valor de los índices. Las combinaciones de bandas utilizadas para el cálculo de los dos índices de vegetación se muestran a continuación:

$$NDVI = \frac{NIR - RED}{NIR + RED}$$

$$NDMI = \frac{NIR - SWIR_1}{NIR + SWIR_1}$$

Donde, NIR, RED y SWIR₁ corresponden a las bandas de Sentinel-2 infrarrojo cercano (B08), rojo visible (B04) e infrarrojo de onda corta (B11), respectivamente.

1.1. Análisis de datos

El efecto de los diferentes factores sobre el rendimiento en aceite esencial (% v/p.s), porcentaje relativo de los compuestos (%) y las variables morfológicas estimadas (longitud, peso del brote, peso de las hojas y peso de los tallos) fue analizado mediante un Anova de medidas repetidas (ANOVAmr). Como factor inter-sujeto se incluyó el “tratamiento”, mientras que la “fecha de recolección” y el “año” se incluyeron como factores intra-sujetos en el análisis. La prueba de Shapiro-Wilks y el test de Bartlett se utilizaron para comprobar los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos empleados en los análisis. A su vez, el test de Tukey (HSD) a un nivel de significación $P < 0.05$ fue empleado para comparar las medias y establecer diferencias entre los diferentes niveles de cada factor. La relación entre el rendimiento en aceite esencial y las cuatro variables morfológicas medidas (longitud, peso del brote, peso de las hojas y

peso de los tallos) fue evaluada mediante análisis correlación múltiple (coeficiente de Pearson), y a través de un modelo de regresión lineal múltiple. El rendimiento en aceite esencial se incluyó como variable dependiente en el modelo y las cuatro variables morfológicas actuaron como variables predictoras. La selección del modelo más adecuado se realizó con la función “step” del paquete “stats” en R. La comparación de modelos se llevó a cabo a través de las diferencias en el criterio de información de Akaike (AIC) y se retuvo aquel modelo con un AIC menor. Además, se calculó la importancia relativa de cada uno de los predictores en el modelo final obtenido.

La técnica multivariante de análisis de correlación canónica se empleó para evaluar la relación entre la composición química del aceite esencial y las variables morfológicas obtenidas del material vegetal. La matriz principal en el análisis fue la composición química del aceite esencial y la matriz de restricción se construyó con las variables morfológicas. El peso de los brotes se excluyó del análisis por presentar problemas de singularidad en la matriz, derivados de su elevada correlación con el peso de las hojas ($r = 0,945$).

Todos los análisis fueron realizados con el software estadístico R Core Team (2020), y las siguientes librerías fueron empleadas en estos análisis: ggplot2 para la realización de gráficos (Wickham, 2016), plyr para la manipulación de datos (Wickham et al., 2011), dplyr para la manipulación de datos (Wickham et al., 2020), ggpubr para la realización de gráficos (Kassambara, 2020), Rmisc para obtener funciones útiles (Hope, 2013), comparaciones múltiples Post hoc con emmeans (Lenth, 2020), análisis de correlación canónica con yacca (Carter, 2018).

3. RESULTADOS

3.1. Estimación indirecta de estrés hídrico

Los valores medios de los dos índices de vegetación calculados (NDVI y NDMI) a lo largo del periodo de estudio se muestran en la Figura 21. A pesar de las pequeñas diferencias interanuales, la tendencia en ambos índices marca un valor máximo en primavera (mayo), seguido de un descenso progresivo hasta valores mínimos durante el mes de agosto. Además, con el aumento de las precipitaciones y el descenso de las temperaturas propias del mes de septiembre, los dos índices comienzan de nuevo un

Los efectos de interacción entre los factores incluidos en el modelo no fueron significativos.

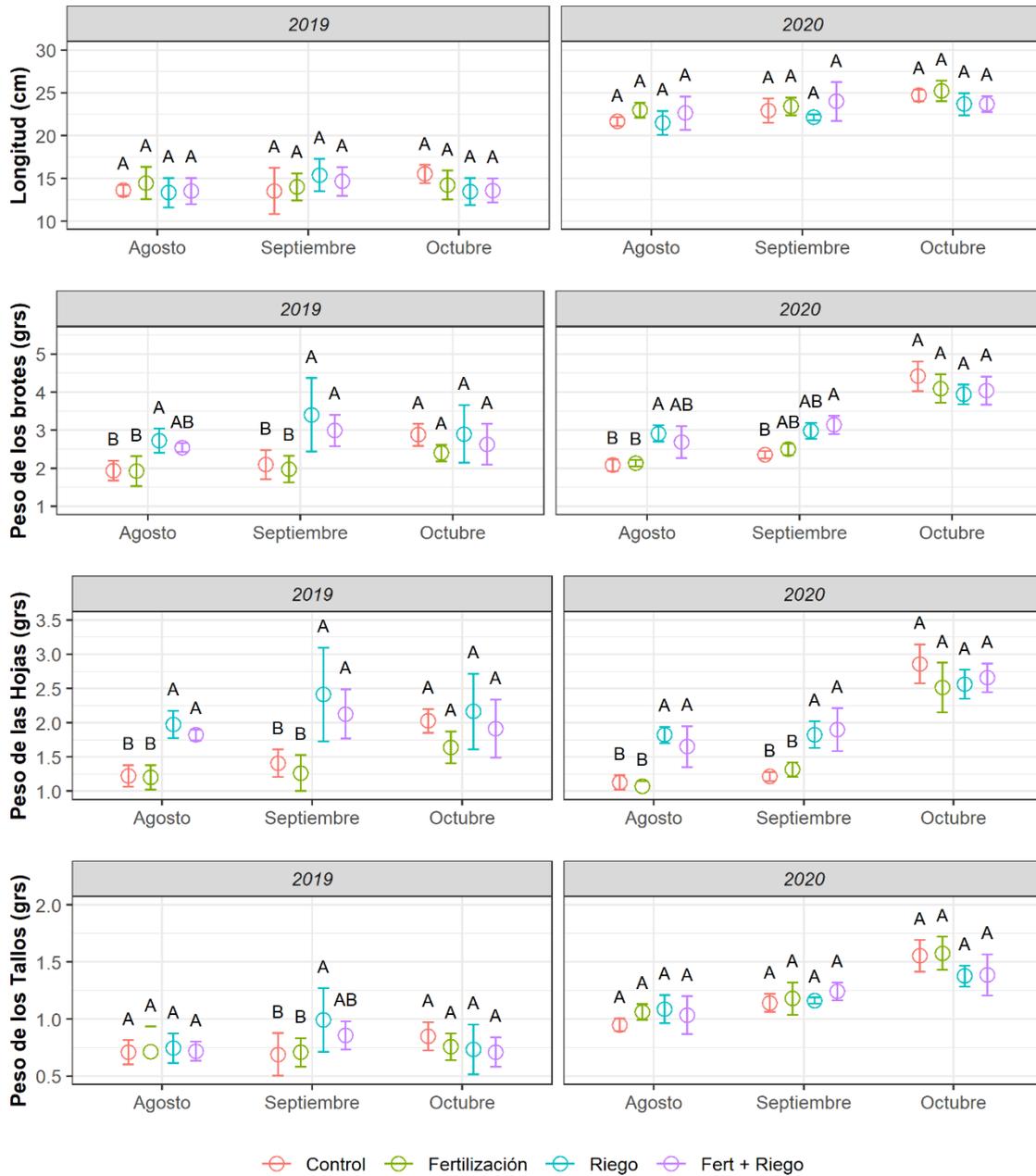


Figura 22. Variables morfológicas estimadas por tratamiento y fecha de recolección. Los valores son expresados como media \pm SD. Para cada fecha de recolección, distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el test de Tukey (HSD) por tratamientos.

Los resultados de rendimiento en aceite esencial (% v/p.s) obtenidos en respuesta a los factores año, fechas de recolección y tratamiento, se muestran en las Figuras 23. Los resultados del ANOVAmr mostraron un rendimiento en aceite esencial

Capítulo 5

significativamente mayor en el año 2019 frente al 2020 ($F_{1,48} = 39,29$; $P < 0,001$). Además, el análisis también exhibió un efecto significativo para los factores fecha de recolección ($F_{2,48} = 153,61$; $P < 0,001$) y tratamiento ($F_{3,48} = 16,71$; $P < 0,001$). De este modo, el rendimiento mostró un aumento progresivo y estadísticamente significativo conforme se avanzaba en los tres periodos de cosecha estudiados, alcanzando la mayor producción de aceite esencial en octubre. Por otro lado, las parcelas tratadas con riego presentaron un rendimiento significativamente mayor en comparación con las parcelas control en los periodos de recolección de agosto y septiembre. Sin embargo, este efecto positivo del riego frente al control se diluyó al llegar a la última recolección de octubre ($P = 0,94$). A su vez, el aporte de fertilización orgánica al suelo no mostró un efecto significativo con respecto al control en ninguna de las recolecciones realizadas (agosto, $P = 0,94$; septiembre, $P = 0,23$; octubre, $P = 0,99$). Además, el efecto combinado de aplicar riego y fertilización a las parcelas mostró un efecto similar al tratamiento con riego, pero en todos los casos el rendimiento en este tratamiento fue ligeramente menor que solo con riego. Por último, el efecto de interacción entre los tres factores no resultó significativo en el modelo ($F_{6,48} = 0,874$; $P = 0,52$).

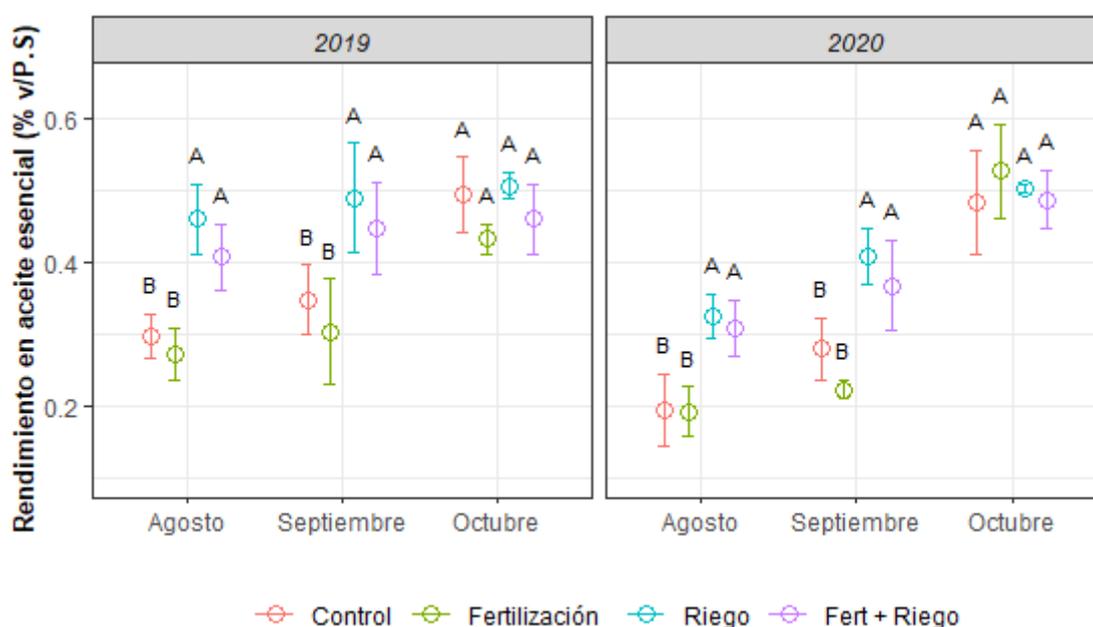


Figura 23. Rendimiento en aceite esencial (% v/P.S.) por tratamiento y fecha de recolección. Los valores son expresados como media \pm SD. Para cada fecha de recolección, distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el test de Tukey (HSD) por tratamientos.

Finalmente, con el objetivo de determinar que parte del efecto del tratamiento descrito en el rendimiento de aceite esencial se podía deber a cambios en las variables morfológicas estimadas, se llevó un análisis de correlación y regresión lineal múltiple entre el rendimiento en aceite esencial y estas variables morfológicas. El modelo final obtenido ($F_{2,93} = 147,8$; $P < 0,001$) explicaba el 75,5 % de la variabilidad observada en la repuesta, y retuvo como variables predictoras la longitud de brotes y el peso de las hojas. A su vez, la importancia relativa parcial (método LGM) de cada predictor mostró que el peso de las hojas explicaba el 93,2 % de la varianza total detectada y la longitud solo el 6,8 %. Por otro lado, en la Figura 24 podemos ver que la longitud y el peso de los tallos presentaron una correlación muy débil o nula con el rendimiento en aceite esencial. Además, se puede observar también que el peso de las hojas presenta una correlación muy alta con el rendimiento, lo que nos indica junto con los resultados del modelo de regresión descritos, que las variaciones observadas en el rendimiento son debidas en gran medida a un aumento de la biomasa foliar de las plantas.

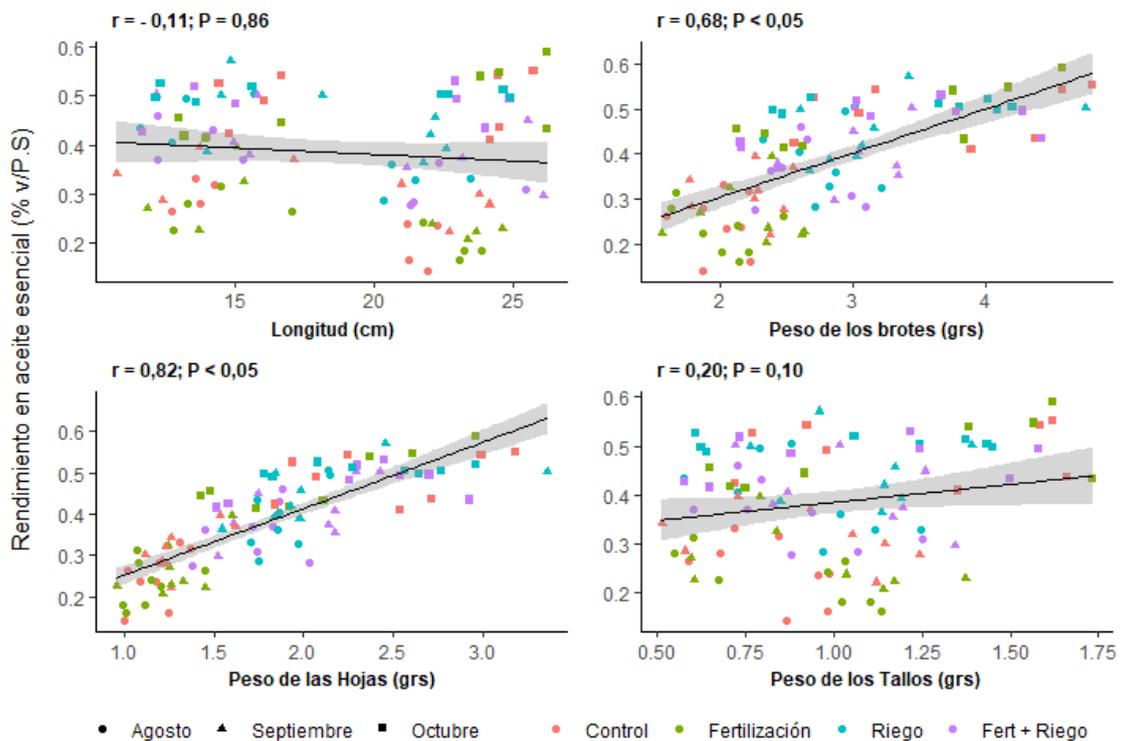


Figura 24. Relación entre las cuatro variables morfológicas estimadas y el rendimiento en aceite esencial (% v/P.S) de la planta bajo distintos tratamientos y fechas de recolección. Se muestra en cada gráfico el resultado del análisis de correlación por el método de Pearson.

Capítulo 5

3.3. Composición química del aceite esencial

Se identificaron un total 103 compuestos en el análisis GC-MS (Tabla 20 del Anexo 1), de los que 21 fueron considerados compuestos mayoritarios e incluidos en los análisis estadísticos. Estos componentes mayoritarios representaban del 57,70 al 61,33 % del total integrado en el análisis cromatográfico, y sus porcentajes relativos se detallan en la Tabla 9. El ANOVAmr presentó un efecto significativo del factor año únicamente en los compuestos 2,2,6-trimetilciclohexano, pinocarveol, borneol, terpinen-4-ol, bornil acetato y espatulenol. Por otro lado, el tratamiento con riego en comparación con el control, produjo en el primer periodo de recolección un aumento estadísticamente significativo de los compuestos α -Pino, canfeno, p-Cimeno, α -Camfolenal, pinocarvone, terpinen-4-ol, aloaromadendreno y δ -Cadineno, y una disminución del 2,2,6-trimetilciclohexano, viridifloreño, viridiflorol, cadaleno y 15-nor-labdan-8-ol. Este efecto descrito anteriormente se mantuvo para la mayoría de los compuestos en la recolección de septiembre, pero desapareció por completo en todos ellos en octubre. Por otro lado, la aplicación combinada de riego y fertilización mostró una tendencia similar al riego, pero con un efecto ligeramente inferior en todos los compuestos. Además, aunque mostró ligeras variaciones con el control, la fertilización no tuvo prácticamente ningún efecto significativo en la composición química de los componentes mayoritarios. En cuanto a la fecha de recolección, se observó que los mismos compuestos que aumentaban o disminuían su porcentaje relativo tras el aporte de riego, también lo hacían manteniendo ese mismo patrón creciente o decreciente a medida que avanzábamos en el periodo de recolección. Finalmente, todos los ANOVAmr testados en los compuestos individuales mostraron un efecto no significativo para la interacción de los tres factores analizados.

En cuanto a los grupos de compuestos, podemos destacar el aumento significativo de los grupos de monoterpenos con el riego, tanto en las fechas de agosto como en septiembre. A su vez, estos grupos alcanzaron el máximo porcentaje relativo en el aceite al final del periodo de cosecha de octubre) en todas las parcelas estudiadas (tratadas y control). Por el contrario, las parcelas regadas mostraron tanto en agosto como en septiembre, una disminución significativa en los grupos sesquiterpenos oxigenados y otros. Además, de manera inversa a los monoterpenos, estos dos grupos

presentaba porcentajes relativos significativamente menores en octubre con respecto a las anteriores recolecciones. La fertilización no mostró de nuevo un efecto claro sobre los grupos compuestos analizados (Figura 25).

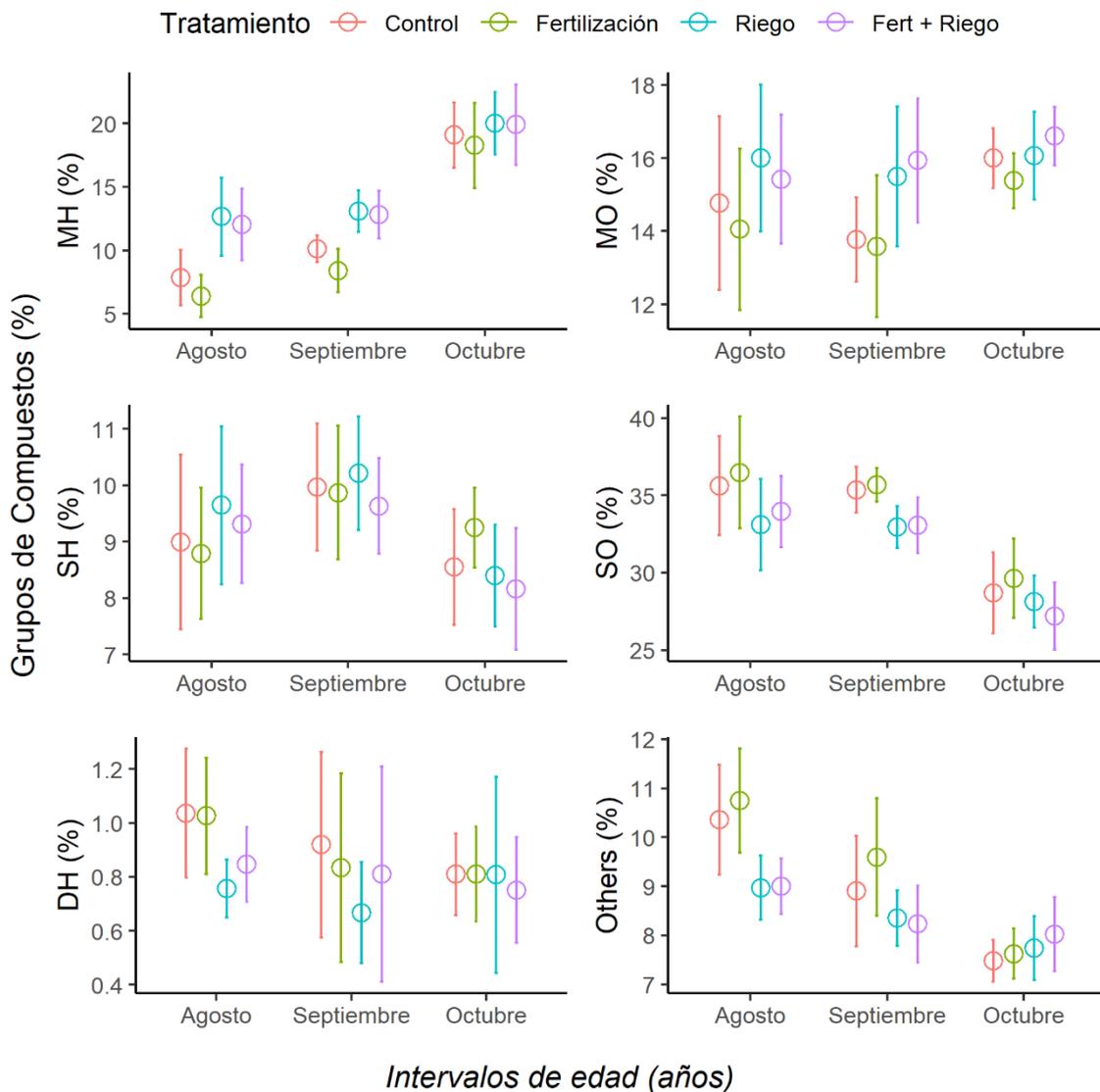


Figura 25. Porcentaje relativo (%) de los grupos de compuestos bajo tratamientos y fechas de recolección. Los valores son expresados como media \pm SD. MH: monoterpenos hidrocarbonados; MO: monoterpenos oxigenados; SH: sesquiterpenos hidrocarbonados; SO: sesquiterpenos oxigenados; DH: diterpenos hidrocarbonados.

Tabla 9. Composición química (%) del aceite esencial de *C. ladanifer* para los cuatro tratamientos y las tres fechas de recolección.

Compuestos	IK	Agosto				Septiembre				Octubre			
		C	F	R	F + R	C	F	R	F + R	C	F	R	F + R
α-Pineno	936	3,38 b	2,36 b	7,21 a	7,05 a	5,37 b*	3,76 b*	7,58 a	7,42 a	12,91 a	11,82 a	13,15 a	12,95 a
canfeno	951	0,63 b	0,63 b	1,26 a	0,83 ab	0,72 bc	0,61 c	1,31 a	1,20 ab	1,36 b	1,76 ab	1,98 a	2,01 a
p-Cimeno	1026	1,36 b	1,20 b	1,58 a	1,63 a	1,49 ab	1,36 b	1,54 a	1,61 a	1,62 a	1,44 b	1,57 ab	1,59 ab
2,2,6-trimetilciclohexano	1037	2,39 a	2,31 a	1,82 b	1,91 b	1,83 a	1,82 a	1,38 b	1,44 b	1,16 a	1,12 a	1,15 a	1,22 a
α-Camfolenal	1126	0,72 b	0,68 b	0,93 a	0,93 a	0,75 b	0,68 b	0,90 a	0,93 a	1,08 a	1,05 a	1,09 a	1,15 a
L-trans-pinocarveol	1139	3,91 ab	3,59 b	4,21 a	3,99 ab	3,49 b	3,53 b	4,24 a	4,28 a	3,76 a	3,50 a	3,90 a	3,91 a
pinocarvone	1162	1,40 b	1,30 bc	1,63 a	1,57 ab	1,37 b	1,36 b	1,64 a	1,69 a	1,72 a	1,65 a	1,77 a	1,78 a
borneol	1166	1,12 a	1,26 a	1,33 a	1,05 a	0,98 a	1,06 a	1,04 a	1,13 a	0,87 a	1,12 a	1,11 a	1,17 a
terpinen-4-ol	1177	0,64 b	0,57 b	0,99 a	1,01 a	0,72 b	0,66 b	0,87 a	0,94 a	1,24 a	1,16 a	1,20 a	1,21 a
bornil acetato	1285	3,19 a	3,44 a	3,30 a	3,00 a	2,90 a	3,17 a	3,26 a	3,04 a	2,98 a	3,18 a	3,30 a	3,31 a
aloaromadendreno	1454	1,09 b	1,03 b	1,28 a	1,26 a	1,27 a	1,21a	1,30 a	1,33 a	1,21 a	1,23 a	1,14 a	1,16 a
viridifloreño	1488	1,59 ab	1,66 a	1,41 b	1,43 ab	1,82 b	1,89 a	1,60 bc	1,50 c	1,28 a	1,46 a	1,25 a	1,29 a
δ-Cadineno	1518	0,56 b	0,60 b	1,01 a	0,84 ab	0,82 a	0,68 a	1,01 a	0,87 a	0,80 a	1,08 a	0,87 a	0,81 a
espatulenol	1570	1,47 a	1,37 a	1,61 a	1,57 a	1,45 a	1,40 a	1,46 a	1,51 a	1,27 a	1,14 a	1,08 a	1,12 a
viridiflorol	1585	20,38 b	21,09 ab	17,98 c	18,76 bc	20,03 a	20,16 a	17,86 b	18,69 ab	15,97 a	17,03 a	15,74 a	15,73 a
ledol	1594	8,92 a	9,25 a	8,59 a	8,78 a	9,08 a	9,18 a	8,74 a	8,27 a	7,26 a	7,41 a	7,25 a	6,59 a
1-epi-cubenol	1621	0,93 a	0,93 a	1,05 a	0,94 a	0,92 a	0,90 a	1,04 a	0,92 a	0,82 a	0,91 a	0,85 a	0,79 a
β-eudesmol	1641	1,29 a	1,19 a	1,28 a	1,24 a	1,23 a	1,39 a	1,44 a	1,21 a	1,14 a	0,86 a	1,04 a	0,95 a
cadaleno	1668	1,31 a	1,17 ab	1,03 b	0,98 b	1,16 a	1,23 a	1,18 a	1,06 a	0,94 a	0,99 a	0,88 a	0,76 a
15-nor-labdan-8-ol	1961	2,12 a	2,40 a	1,46 b	1,63 b	1,91 b	2,32 a	1,34 c	1,50 c	1,26 a	1,34 a	1,28 a	1,36 a
16-kaureno	2020	1,04 a	1,03 a	0,76 a	0,85 a	0,92 a	0,83 a	0,67 a	0,81 a	0,81 a	0,81 a	0,81 a	0,75 a
Total Representado (%)		57,95	57,70	60,11	59,66	58,80	57,80	59,92	59,82	60,20	60,90	61,33	60,48
Total Identificado (%)		78,63	77,48	81,13	80,57	79,03	77,96	80,78	80,49	80,61	80,98	81,16	80,62
Monoterpenos hidrocarbonados		7,85 b	6,38 b	12,65 a	12,03 a	10,12 b	8,39 b	13,10 a	12,83 a	19,08 a	18,28 a	20,02 a	19,91 a
monoterpenos oxigenados		14,77 b	14,05 c	16,00 a	15,42 ab	13,77 b	13,59 b	15,49 a	15,93 a	15,99 a	15,38 a	16,07 a	16,60 a
Sesquiterpenos hidrocarbonados		8,99 a	8,79 a	9,64 a	9,31 a	9,97 a	9,86 a	10,21 a	9,63 a	8,55 ab	9,25 a	8,39 ab	8,16 b
Sesquiterpenos oxigenados		35,63 b	36,48 a	33,11 c	33,95 bc	35,35 a*	35,70 a	32,96 b	33,06 b*	28,69 a	29,64 a	28,13 a	27,18 a
Diterpenos hidrocarbonados		1,04 a	1,03 a	0,76 a	0,85 a	0,92 a	0,83 a	0,67 a	0,81 a	0,81 a	0,81 a	0,81 a	0,75 a
Otros		10,36 a	10,75 a	8,97 b	9,01 b	8,91 ab	9,59 a	8,35 b	8,23 b	7,48 a	7,63 a	7,74 a	8,02 a

Componentes listados por orden de elución en una columna apolar HP-5; IR: índices de retención de Kovats relativos a n-alcános en una columna apolar HP-5; Control (C), Fertilización (F), Riego (R), Fertilización + Riego (F + R); valores expresados como media de 4 bloques y 2 años (n=8). Por fecha de recolección, valores seguidos de distintas letras indican diferencias significativas (P<0,05) en el test de Tukey (HSD) entre tratamientos

Tabla 10. Coeficientes canónicos, valores propios y varianza para el análisis CCA entre los componentes mayoritarios del aceite esencial de *C. ladanifer* y las variables morfológicas estimadas.

variables	CCA 1	CCA 2
Componentes aceite esencial		
α -Pino	0,92	- 0,14
canfeno	0,90	0,26
p-Cimeno	0,10	0,07
2,2,6-trimetilciclohexano	- 0,53	0,18
α -Camfolenal	0,34	- 0,04
L-trans-pinocarveol	0,08	0,59
pinocarvone	0,20	0,08
borneol	- 0,01	0,58
terpinen-4-ol	0,49	- 0,18
bornil acetato	0,01	0,33
aloaromadendreno	- 0,03	- 0,09
viridifloreo	- 0,34	- 0,33
δ -Cadineno	0,15	- 0,49
espatulenol	- 0,18	- 0,36
viridiflorol	- 0,27	0,00
ledol	- 0,22	- 0,12
1-epi-cubenol	- 0,11	- 0,10
β -eudesmol	- 0,17	- 0,08
cadaleno	- 0,27	- 0,33
15-nor-labdan-8-ol	- 0,56	- 0,16
16-kaureno	- 0,21	- 0,18
Variables de restricción		
Peso de las hojas	0,989	- 0,118
Peso de los tallos	0,423	- 0,816
Longitud de brotes	0,107	- 0,987
Eigenvalores	0,034	0,003
Varianza (%)	0,916	0,079
Varianza acumulada (%)	0,916	0,994

La Tabla 10 describe los resultados del análisis de correlación canónica (CCA) empleado para estimar el efecto de las variables morfológicas (longitud, peso de hojas y peso de tallos) sobre la variabilidad en la composición química del aceite. Los coeficientes del CCA para los conjuntos canónicos composición química, variables morfológicas y muestras explicaron una varianza total superior al 99 %. Así, la primera componente principal explicó un 91,6 % de la variación y estaba muy influenciada de forma positiva por el peso de las hojas. En cuanto a la composición química, esta primera componente presentó una correlación positiva con α -Pino, canfeno y terpinen-4-ol,

Capítulo 5

mientras negativamente se correlacionó con 2,2,6-trimetilciclohexano y 15-nor-labdano-8-ol. Por otro lado, la segunda componente explicaba solo el 7,9 % de la varianza canónica, y estaba correlacionada negativamente con la longitud y el peso de los tallos. A su vez, los compuestos químicos L-trans-pinocarveol y borneol mostraron un efecto moderado y positivo con esta componente.

4. DISCUSIÓN

4.1. Estimación indirecta del estrés hídrico

El patrón mostrado por ambos índices de vegetación es típico de sistemas semiáridos como la región mediterránea, y refleja la conjunción del efecto de la temperatura y la precipitación sobre los niveles de agua en el suelo y la planta, así como sobre el vigor vegetativo (Chakroun et al., 2015). De este modo, los niveles de estrés hídrico más acusados se concentran principalmente desde finales de julio a principios de septiembre. El NDVI responde a cambios tanto en el contenido de clorofila como en los espacios intracelulares del mesófilo esponjoso de las hojas. Por tanto, valores de este índice altos se han relacionado con un mayor vigor y capacidad fotosintética, mientras que valores más bajos reflejan un estrés hídrico traducido en una reducción de la clorofila y cambios en la estructura interna de las hojas debido al marchitamiento (Gu et al., 2008). Por otro lado, el NDWI responde a cambios en el contenido de agua y en el mesófilo esponjoso de la planta que interactúa con la radiación solar entrante (Gao, 1996), y ha sido especialmente concebido para estimar el contenido de agua en el suelo y en la planta, resultando más eficaz que otros índices de vegetación (Das et al., 2021). En línea con nuestros resultados, varios autores y bajo distintas coberturas de vegetación monoespecíficas continuas (> 70 % de pasto, matorral, cultivo o forestal), han relacionado niveles negativos en el índice NDMI (aproximadamente de -0,1 a -0,4) con muy bajo contenido de agua en la planta y en el suelo, y por tanto, con niveles de sequía severos (Hunt et al., 2013; Yilmaz et al., 2008). En una zona de dehesa del sur de Portugal, (J. Serrano et al., 2019) relacionaron el contenido (%) de humedad del pasto y del suelo con el índice de vegetación NDMI obtenido de imágenes Sentinel-2. Los resultados muestran una alta correlación entre los valores de NDMI y el contenido de humedad tanto del pasto ($R^2 = 0,89$) como del suelo ($R^2 = 0,76$). Además, los valores

mínimos que detectaron también en julio (- 0,126), agosto (- 0,108) y septiembre (- 0,129), se correspondían con contenidos muy bajos de humedad en el suelo (7 %) y en el pasto (14 %).

4.2. Rendimiento en aceite esencial y variables morfológicas

En condiciones de déficit hídrico, se produce un descenso en la turgencia que origina una disminución tanto del crecimiento como del desarrollo celular en la parte aérea de la planta, especialmente en tallos y hojas (García-Caparrós et al., 2019). En nuestro experimento, la disminución del estrés por sequía tras el aporte de riego provocó un aumento de la biomasa entendida como peso total de brotes y hojas, para las recolecciones de agosto y septiembre, pero no en octubre. En un estudio con tres niveles de riego en *Mentha spicata*, Marino et al. (2019) también encontraron un incremento progresivo del peso seco total y del peso seco de hojas con el aporte de agua. A su vez, varios autores han descrito efectos similares en la biomasa de la parte aérea de diferentes especies de plantas tras la aplicación de riego (Babaei et al., 2021; Bahreininejad et al., 2014). La menor biomasa encontrada como consecuencia de un estrés hídrico severo en las parcelas control frente a las regadas, podría ser debida tanto al resultado de asignación preferente de producción de biomasa en las raíces, como a una reducción del contenido de clorofila y, en consecuencia, de la eficiencia fotosintética (Bettaieb et al., 2009).

Episodios de sequía severa pueden causar estrés oxidativo debido a la formación de especies reactivas de oxígeno y daños fotosintéticos, especialmente bajo altas temperaturas y radiación solar (Delfine et al., 2005). El aporte de riego incrementó considerablemente el contenido en aceite esencial (% v/p.s) en las recolecciones de agosto y septiembre. En este sentido, numerosos estudios han mostrado como niveles hídricos de estrés de bajos a moderados pueden aumentar la biosíntesis de aceite esencial, pero que a su vez, este efecto desciende cuando avanzamos hacia niveles más severos o agudos (Bettaieb Rebey et al., 2012; Misra & Srivastava, 2000). De este modo, Abdi et al. (2019) encontraron un incremento muy significativo del rendimiento en aceite esencial (%) en plantas de *Mentha piperita* sometidas a un nivel moderado de estrés, seguido de un descenso brusco en condiciones severas. A su vez, el estrés hídrico

Capítulo 5

provocó una disminución del rendimiento en aceite esencial (%) en *Salvia sclarea*, pero no tuvo efecto en *Lavandula latifolia*, *Mentha piperita*, *Salvia lavandulifolia*, *Thymus capitatus* y *Thymus mastichina* (García-Caparrós et al., 2019). Este aumento en el contenido de aceite esencial bajo condiciones de sequía moderada ha sido relacionado con una mayor densidad de tricomas glandulares, debido principalmente a la reducción del área foliar como consecuencia del estrés hídrico generado (Bettaieb et al., 2009). Además, la estimulación de la producción de aceite esencial bajo estrés hídrico moderado podría ser debido a una baja translocación de fotosintetizados a los órganos de crecimiento, lo que permite utilizarlo para sintetizar metabolitos secundarios, sugiriendo una compensación entre crecimiento y defensa (Stagnari et al., 2016). Sin embargo, la reducción de la biosíntesis del aceite esencial observada en condiciones de estrés hídrico severo puede ser atribuida a un daño en los tejidos fotosintéticos de las hojas jóvenes, que su vez, tienen mayor capacidad de sintetizar aceite esencial (Babaei et al., 2021). Por otro lado, nuestros resultados concuerdan con la hipótesis oportunista descrita por Owen & Peñuelas (2005). Esta hipótesis sugiere que el empleo del precursor común DMAPP (dimetilalil pirofosfato) para sintetizar isoprenoides esenciales (carotenoides, ácido abscísico o ácido giberélico) que reparen los tejidos dañados o protejan a la planta frente al estrés, puede restringir su uso para la producción y emisión de isoprenoides volátiles no esenciales.

Por otro lado, como vimos en el capítulo anterior, las hojas poseen mayor contenido en aceite esencial que los tallos, y por tanto, la proporción de cada uno de ellos influye en el rendimiento final del aceite esencial. Como regla general, se espera que con el aporte de agua a la planta, la proporción de hojas aumente, y en consecuencia, la de tallos disminuya (Tabrizi et al., 2011). Sin embargo, hay autores que han encontrado mayores variaciones en el peso de los tallos que en el de hojas tras el aporte de riego (Babaei et al., 2021). En nuestro estudio, los tallos no vieron modificados su peso con el riego, mientras que el peso de las hojas aumentó considerablemente y, por tanto, la ratio hoja/tallo también. De este modo, se observó que este aumento en la biomasa foliar explicaba gran parte de las variaciones encontradas en el rendimiento en aceite esencial. En este sentido, aunque la gran mayoría de trabajos consultados sobre estrés hídrico, incluidos los citados en este capítulo, emplean mezclas de diferentes partes de la planta, no se ha detectado que tengan en cuenta estas

variaciones en la proporción de órganos a la hora de explicar los efectos del estrés hídrico en la planta.

La aplicación de fertilización no afectó ni a las variables morfológicas ni al rendimiento en aceite esencial. Además, el efecto combinado de ambos riego y fertilización mostró un patrón similar a las parcelas solo regadas, y por tanto, su efecto se debió únicamente al aporte de agua. Los estudios encontrados en la literatura muestran una gran variabilidad en los resultados en cuanto al efecto de la fertilización orgánica en diferentes especies de plantas. Por un lado, un efecto positivo en la biomasa y el rendimiento en aceite esencial (%) de varias especies de plantas ha sido descrito por varios autores tras la aplicación de diferentes tipos de fertilizantes orgánicos (Aghaei et al., 2019; Bajeli et al., 2016). Por el contrario, en línea con nuestros resultados, otros autores no detectaron tampoco cambios en el rendimiento en aceite esencial (%) con el aporte de este tipo de fertilización al suelo (Moradi et al., 2011; Silva et al., 2007). En un estudio con aporte de fertilizante orgánico (10 t/Ha) a base de residuos vegetales en *Lippia origanoides*, Teles et al. (2014) encontraron también que la biomasa de la parte aérea y el contenido en aceite esencial no difería entre tratamiento y control. Sin embargo, algunas otras razones intrínsecas al diseño experimental como dosis insuficiente, poca incorporación al suelo o liberación lenta del fertilizante, podrían explicar la ausencia de efecto en este estudio.

Coincidiendo con menores niveles de estrés como consecuencia de mayores precipitaciones y menores temperaturas, el año 2019 y el periodo de recolección de octubre presentaron los mayores rendimientos en aceite esencial en el estudio. En *Salvia lavandulifolia* cultivadas en cuenca, (Usano-Aleman et al., 2012) encontraron también rendimientos en aceite esencial más elevados durante el otoño, que además como en nuestra especie, coincide con el periodo de completa maduración del fruto. Por tanto, el mayor contenido de aceite esencial en los tricomas glandulares cuando la evapotranspiración es menor al comienzo del otoño, sugiere que podría jugar un papel importante en funciones de protección de la planta y las semillas frente a organismos fitopatógenos durante el periodo húmedo y frío (Maffei, 2010). Además, el aporte de hojas al suelo durante este periodo con un mayor contenido en aceite esencial de compuestos terpenoides, podría cumplir una función alelopática impidiendo la nascencia de otras semillas (Croteau et al., 2000).

Capítulo 5

4.3. Composición química

Bajo el estrés por sequía bajo o moderado, para mantener el contenido de agua, las plantas reducen al mínimo sus hojas y cierran los estomas, de modo que la asimilación de CO₂ a través del ciclo de Calvin disminuye y se consume menos contenido de NADPH + H⁺ como equivalente reducido (Selmar et al., 2017). En esta situación, las plantas potencian las reacciones para consumir este equivalente reducido, como la biosíntesis de terpenoides (Kleinwächter et al., 2015). Sin embargo, en situaciones de estrés hídrico severo y prolongado en el tiempo, el suministro de carbono fotosintético disminuye hasta volverse un recurso limitante, y por tanto, la producción y emisión de compuestos terpénicos puede disminuir (Bertin & Staudt, 1996; Delfine et al., 2005). Variaciones importantes en la composición química del aceite esencial bajo condiciones de estrés hídrico han sido detectadas en diferentes especies de plantas como *Cuminum cyminum* (Bettaieb Rebey et al., 2012), *Thymus carmanicus* (Bahreininejad et al., 2014) o *Mentha piperita* (Khorasaninejad et al., 2011). En el presente estudio, los aceites esenciales de las plantas con menor estrés hídrico por el aporte de riego mostraron un aumento de los monoterpenos, representados especialmente por el α -Pineno, mientras que el grupo de los sesquiterpenos oxigenados descendió impulsado en este caso por el compuesto viridiflorol. Babaei et al. (2021) encontraron que el aumento del estrés por sequía en *Tagetes minuta* disminuyó el porcentaje de monoterpenos hidrocarburos, mientras que los grupos monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos aumentaban. En otro estudio en *Mentha piperita*, los monoterpenos hidrocarbonados y algunos oxigenados de menor peso molecular disminuyeron con el nivel de estrés, pero en este caso los monoterpenos oxigenados de mayor peso molecular aumentaban (Abdi et al., 2019). Las variaciones detectadas en la composición química del aceite esencial bajo condiciones de estrés hídrico, pueden deberse probablemente a cambios en la actividad enzimática que regula su biosíntesis como respuesta al estrés (Tholl, 2015). A su vez, el incremento de la temperatura aumenta considerablemente las emisiones de monoterpenos de bajo peso molecular como mecanismo de protección fotosintética, reemplazando a los procesos de fotorespiración de la planta (Llusià & Peñuelas, 1998). Incluso en una especie no almacenadora como *Quercus ilex*, Loreto et al. (1996) encontraron que las emisiones de α -pineno se triplicaban al aumentar la temperatura

de 20 a 30 °C. Por tanto, las alteraciones detectadas en los ratios entre sesquiterpenos y monoterpenos de bajo peso molecular principalmente, podrían ser atribuidas a diferentes volatilidades de los compuestos (Gil et al., 2007). Por último, la elevada correlación encontrada entre el peso de las hojas y los monoterpenos de bajo peso molecular como α -pineno y canfeno, apoyan las hipótesis descritas anteriormente.

La composición química del aceite no se vio significativamente modificada con la fertilización, y de nuevo, el efecto combinado de ésta con el riego mostró resultados similares al tratamiento con riego. Los diferentes estudios consultados en la literatura sobre el efecto de la fertilización orgánica en la composición química del aceite esencial, han mostrado resultados contradictorios. De este modo, mientras Teles et al. (2014) no encontraron diferencias en la composición del aceite esencial de *Lippia origanoides* tras la aplicación fertilizante, Burducea et al. (2018) y Moradi et al. (2011) sí mostraron variaciones significativas en varios compuestos en *Ocimum basilicum* y *Foeniculum vulgare*, respectivamente.

En algunas especies, la composición química del aceite esencial puede variar a lo largo del año, por lo que determinar el momento adecuado de la cosecha puede ser de gran importancia desde un punto de vista productivo y económico (Figueiredo et al., 2008). Las variaciones detectadas en algunos de los compuestos a lo largo del periodo de recolección, mostraban un patrón de comportamiento similar al descrito en el riego. De este modo, los monoterpenos hidrocarbonados aumentaron significativamente a medida que avanzamos en el periodo de recolección hasta alcanzar su máximo en octubre, mientras que por el contrario los sesquiterpenos oxigenados disminuían hasta porcentajes mínimos en esta última recolección. Numerosos estudios en varias especies de plantas han encontrado fluctuaciones significativas en los grupos de monoterpenos y sesquiterpenos a lo largo del año (Ben Farhat et al., 2019; M. J. Jordán et al., 2006; Usano-Aleman et al., 2012). Además, estos componentes terpenoides han sido asociados con funciones ecológicas en la planta tales como protección, defensa o alelopatías (Croteau et al., 2000), y por tanto, sus variaciones a lo largo del año podrían responder a diferentes necesidades para cumplir estas funciones.

CAPÍTULO 6

Influencia del secado del material vegetal sobre el rendimiento y la composición química de aceite esencial de *C. ladanifer*

1. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles producidos por organismos vivos y aislados únicamente por medios físicos (prensado y destilación) de una planta entera o de una parte de la planta de origen taxonómico conocido (Franz & Novak, 2010). En la naturaleza, los aceites esenciales desempeñan un papel muy importante en los mecanismos de defensa y señalización de las plantas (Zuzarte & Salgueiro, 2015). A su vez, los patrones de composición, la concentración de los compuestos individuales y el rendimiento de estos aceites esenciales dependen de numerosos factores intrínsecos y extrínsecos a la planta (Figueiredo et al., 2008; Moghaddam & Mehdizadeh, 2017). Entre los factores externos más estudiados por su influencia en la producción de aceite esencial se encuentran los factores ambientales y las condiciones de cultivo (Barra, 2009). Sin embargo, los aceites esenciales pueden verse también fuertemente afectados por las condiciones y técnicas en poscosecha tales como métodos de secado y extracción, tiempo de destilación, métodos de cuantificación y condiciones de análisis (Moghaddam & Mehdizadeh, 2017).

La deshidratación es la forma más habitual y económica de conservar los materiales vegetales destinados a la industria (Buchailot et al., 2009). Las plantas aromáticas y medicinales, al igual que otros materiales vegetales con alto contenido en humedad, son susceptibles a un deterioro de su calidad o incluso a su putrefacción debido a procesos microbianos, por lo que requieren unas condiciones adecuadas para su conservación (Stepień et al., 2019). El secado de plantas es un método que evita estos procesos indeseables, pero también puede impactar negativamente en la calidad del producto final. En este sentido, numerosos estudios publicados indican que el proceso de secado tiene una gran influencia en los componentes químicos volátiles y el rendimiento del aceite esencial de las plantas aromáticas y medicinales (Figueiredo et al., 2008; Sellami et al., 2011; Shahhoseini et al., 2013). Los resultados han demostrado que estos cambios en las concentraciones de los compuestos volátiles durante el secado dependen de varios aspectos, como el método y las condiciones de secado, además de parámetros característicos del tipo de producto (Venskutonis, 1997). El secado natural a la sombra y el secado en horno siguen siendo los métodos tradicionales más utilizados por la industria debido a su menor coste (Hassanpouraghdam & Hassani, 2014). De

Capítulo 6

manera general, el secado en horno bajo diferentes temperaturas ha sido considerado el método de secado más adecuado por varios autores en la literatura, debido principalmente a su relación favorable entre costes y tiempo de procesado (Özer et al., 2018).

Las plantas del género *Cistus* L. son un grupo de arbustos nativos de la Región Mediterránea, pertenecientes a la familia Cistaceae (Barrajón-Catalán et al., 2016). Varias especies de este género, incluida *C. ladanifer*, producen aceites esenciales de gran interés para la industria perfumera, agroalimentaria y farmacológica (Papanikolaou et al., 2014). Hasta la fecha, la extracción de aceite esencial de *C. ladanifer* se ha llevado a cabo tradicionalmente con plantas en fresco (Mediavilla et al., 2021). Sin embargo, para estas aplicaciones industriales, podría ser interesante evaluar las condiciones óptimas del proceso de secado para minimizar cualquier cambio adverso en la composición química del aceite esencial y asegurar la mejor calidad posible del producto final.

Algunos autores han evaluado el efecto de diferentes métodos de secado sobre la composición de compuestos volátiles en plantas de *C. creticus* (Matłok et al., 2020; Stępień et al., 2019). No obstante, hasta donde sabemos, no existen estudios que evalúen la posibilidad del secado previo del material vegetal sobre la producción de aceite esencial en otras especies del género, incluida *C. ladanifer*. Por lo tanto, este estudio se ha centrado en determinar el efecto de diferentes métodos de secado sobre el rendimiento y la composición química del aceite esencial de *C. ladanifer*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental y material vegetal

El material vegetal empleado para este experimento provenía tanto de la parcela de Guijo de Granadilla descrita anteriormente (ver capítulo 5), como de otra parcela de jaral cercana al centro de trabajo en el norte de Cáceres (Plasencia, 40°0'22,4"N 6°05'11,1"O). La última población, denominada en adelante Plasencia, se sitúa a una altitud de 436 m y presenta un clima típicamente mediterráneo, con veranos muy calurosos e inviernos fríos. La temperatura media anual en la zona es de 16,7 °C, mientras que la precipitación total acumulada es de 760 mm y se encuentra concentra

mayoritariamente en invierno. En cada una de estas dos poblaciones, se seleccionaron a su vez tres puntos de muestreo al azar, y en cada punto, se recolectaron las partes aéreas jóvenes (tallos, hojas y frutos) de un mínimo de 20 pies individuales hasta componer una muestra homogénea de aproximadamente 2-3 Kg de peso. Las recolecciones se llevaron a cabo durante los días 15 y 19 de octubre del año 2020. Las muestras fueron transportadas al centro de trabajo, y una vez allí, se les aplicaron distintos tratamientos. En primer lugar, se realizó una destilación de cada una de las muestras en fresco (dentro de las primeras 24 horas desde su recogida). Por otro lado, una parte del material vegetal extraído (0,5 Kg) de cada muestra se secó durante 20 días a temperatura ambiente extendido (1 m^2) en una nave del centro de trabajo. Se tomaron datos de temperatura y humedad en la nave diariamente durante el proceso de secado ($T_{\text{media}} = 18,9 \pm 1,8 \text{ }^\circ\text{C}$; $H_{\text{media}} = 61,6 \pm 14 \%$). Por último, el material vegetal restante se secó con aire forzado en un horno/estufa a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 7 días hasta peso constante. Los datos de la estación meteorológica de Plasencia en los últimos 5 años mostraban una media de temperaturas máximas de $35,8 \pm 3,4 \text{ }^\circ\text{C}$ en julio y $35,9 \pm 3,3 \text{ }^\circ\text{C}$ en agosto, y además, se superaban temperaturas de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ en ambos meses aproximadamente 19 días de media. Por tanto, se ha seleccionado una temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ prolongada durante varios días con el objetivo de simular condiciones extremas que se podrían dar en esta zona si secamos el material vegetal a temperatura ambiente a lo largo del verano.



Figura 26. Material vegetal secado a temperatura ambiente en la nave y en estufa a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura.

Capítulo 6

2.2. Extracción y análisis químico del aceite esencial

Tanto la extracción del material vegetal como la caracterización química mediante GC-MS del mismo se llevaron a cabo conforme a la metodología descrita en los apartados 1 y 3 del capítulo 2. En este caso, se emplearon 150 gramos de material vegetal en cada destilación y se realizaron un total de 18 destilaciones (2 poblaciones x 3 puntos x 3 tratamientos). A su vez, se determinó la humedad de todas las muestras en el momento previo a cada destilación (ver metodología en apartado 2 del capítulo 2), y de este modo, el rendimiento (%) en aceite esencial se expresó tanto en peso fresco como en seco. Además, nuevamente solo los compuestos mayoritarios (porcentaje relativo igual o superior al 1%) derivados de la caracterización química del aceite esencial fueron incluidos en los análisis estadísticos.

2.3. Análisis de datos

Se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para evaluar el efecto de los factores tanto sobre el rendimiento (%) en aceite esencial de peso fresco y seco, como en el porcentaje relativo (%) de los diferentes compuestos individuales y grupos de compuestos. Como factores independientes se incluyeron la población y el tratamiento, así como la interacción entre ellos. Además, la normalidad de los datos se comprobó con la prueba de Shapiro-Wilks y la homocedasticidad mediante el test de Bartlett. El test de Tukey (HSD) a un nivel de significación $P < 0.05$ fue empleado para comparar las medias y establecer diferencias entre los diferentes niveles de tratamiento.

Además, se empleó una técnica descriptiva multivariante (análisis de componentes principales) para explorar las diferencias entre los distintos tratamientos de secado en relación con los componentes mayoritarios encontrados en el aceite esencial. Se retuvieron los dos primeros componentes del análisis obtenido a partir de la matriz de correlaciones de datos estandarizados, debido a que recogían la mayor parte de variabilidad presentada por la composición química.

Todos estos análisis fueron realizados con el software estadístico R Core Team (2020) y se usaron las siguientes librerías: ggplot2 para la realización de gráficos

(Wickham, 2016), plyr para la manipulación de datos (Wickham et al., 2011), dplyr para la manipulación de datos (Wickham et al., 2020), ggpubr para la realización de gráficos (Kassambara, 2020), Rmisc para obtener funciones útiles (Hope, 2013), comparaciones múltiples Post hoc con emmeans (Lenth, 2020), análisis multivariantes con vegan (Oksanen et al., 2020), dendrogramas y gráficos biplot con factoextra (Kassambara and Mundt, 2020)

3. RESULTADOS

3.1. Rendimiento en aceite esencial

La Tabla 11 muestra los resultados para el rendimiento (%) en aceite esencial expresado tanto en peso fresco como en peso seco, y en función de los dos factores analizados (población y tratamiento). El análisis ANOVA no mostró un efecto significativo de la población ni para el rendimiento en peso fresco ($F_{1,12} = 2,48$; $P = 0,14$), ni en peso seco ($F_{1,12} = 0,80$; $P = 0,39$). Por otro lado, el factor tratamiento tuvo un efecto significativo en el ANOVA para el rendimiento en aceite esencial en peso fresco ($F_{2,12} = 6,61$; $P = 0,012$), pero no en seco ($F_{2,12} = 2,68$; $P = 0,109$). El material vegetal secado naturalmente presentó los mayores rendimientos en el ensayo (0,62 % v/P.F y 0,50 % v/P.S). Además, en ambas poblaciones, el material vegetal secado naturalmente presentaba un rendimiento en peso fresco estadísticamente mayor que aquellas plantas sin tratamiento de secado, mientras que el secado forzado a 40°C mostraba valores intermedios y no difería del resto de tratamientos. Por último, el efecto de interacción no resultó significativo en ninguno de los dos ANOVAs ajustados.

Tabla 11. Rendimiento en aceite esencial (%) para las dos poblaciones de *C. ladanifer* y los tres tratamientos de secado aplicados.

	Guijo de Granadilla			Plasencia		
	Fresco	Secado natural	Secado 40 °C	Fresco	Secado natural	Secado 40 °C
Rendimiento (% v/P.F)	0,40 ± 0,09 b	0,62 ± 0,09 a	0,55 ± 0,13 ab	0,33 ± 0,08 b	0,56 ± 0,09 a	0,44 ± 0,13 ab
Rendimiento (% v/P.S)	0,47 ± 0,09 a	0,50 ± 0,08 a	0,40 ± 0,09 a	0,46 ± 0,11 a	0,46 ± 0,07 a	0,33 ± 0,11 a
Humedad (%)	44,4 ± 3,2	17,3 ± 0,9	8,4 ± 1,2	51,4 ± 0,23	19,5 ± 1,42	10,9 ± 2,1

v: volumen; P.F: Peso Fresco; P.S: Peso Seco.

Capítulo 6

3.2. Composición química del aceite esencial

Se identificó un total de 103 compuestos en las muestras de aceite esencial obtenidas en el ensayo, que representaban del 76,62 % al 82,33 % del total integrado por cromatografía (Anexo I, Tabla 21). Además, 19 de estos compuestos (55,38-61,67 % del total) fueron considerados mayoritarios, y por tanto, analizados estadísticamente (Tabla 12). Así, mientras que la composición química del aceite esencial apenas varió entre localidades, la mayoría de compuestos individuales y grupos de compuestos se vieron muy afectados por el efecto del secado. Los monoterpenos hidrocarbonados de bajo peso molecular, especialmente el compuesto α -pineno, mostraron un descenso brusco en su porcentaje relativo tras la aplicación de secado a 40 °C en estufa. A su vez, los monoterpenos oxigenados presentaban un porcentaje menor en las muestras destiladas en fresco, en comparación sobre todo con aquellas secadas naturalmente. Al contrario que los monoterpenos oxigenados, los grupos de mayor peso molecular como sesquiterpenos hidrocarbonados y oxigenados, con representación destacada en este caso del viridiflorol, mostraban los mayores porcentajes relativos en las muestras secadas a 40 °C en comparación con el resto de tratamientos. Además, las muestras destiladas en fresco también presentaban porcentajes significativamente mayores de sesquiterpenos oxigenados que las secadas al natural. Por último, el tratamiento no afectó significativamente ni al grupo diterpenos ni al denominado "Otros".

La Figura 27 muestra el efecto de los distintos tratamientos de secado aplicados sobre los tres principales componentes (α -Pineno, viridiflorol y ledol) detectados en el aceite esencial. Como podemos observar, los porcentajes del compuesto α -Pineno muestran un comportamiento antagonista con respecto al viridiflorol y ledol, o lo que es lo mismo, cuando el primero aumenta los otros disminuyen, y viceversa. De este modo, el componente α -Pineno mostró los mayores porcentajes en el tratamiento secado natural y los menores en el secado a 40 °C. Por el contrario, los compuestos viridiflorol y ledol presentaban mayores porcentajes en el secado a 40 °C y menores en el secado al natural.

Tabla 12. Composición química (%) del aceite esencial de *C. ladanifer* para los tres tratamientos y las dos poblaciones.

Compuestos	Guijo de Granadilla				Plasencia			P-valor
	IK	Fresco	Secado natural	Secado 40 °C	Fresco	Secado natural	Secado 40 °C	
α-Pineno	936	11,33 ab	14,57 a	6,99 b	14,46 a	17,67 a	5,50 b	0,169
canfeno	951	1,35 a	1,47 a	1,00 a	0,66 a	0,83 a	0,30 a	0,052
p-Cimeno	1026	1,59 a	1,74 a	1,16 b	1,95 a	1,77 a	1,20 b	0,062
2,2,6-trimetilciclohexano	1037	0,98 a	1,03 a	0,99 a	0,76 a	0,92 a	0,73 a	0,002
α-Camfolenal	1126	0,87 b	1,13 a	1,05 ab	0,91 b	1,16 a	1,01 ab	0,794
trans-Pinocarveol	1139	2,97 a	3,50 a	3,00 a	3,14 a	3,67 a	3,38 a	0,178
pinocarvone	1162	1,69 ab	1,83 a	1,47 b	1,91 a	2,08 a	1,52 b	0,022
terpinen-4-ol	1177	1,20 ab	1,39 a	1,04 b	1,46 ab	1,63 a	1,28 b	< 0,001
bornil acetato	1285	2,62 a	3,08 a	2,80 a	2,36 a	2,42 a	2,35 a	0,043
aloaromadendreno	1454	1,14 a	1,15 a	1,25 a	1,05 a	1,03 a	1,12 a	0,087
viridifloreño	1488	1,26 b	1,29 b	1,80 a	1,05 b	1,06 b	1,39 a	< 0,001
espatulenol	1570	1,38 a	1,33 a	1,31 a	1,32 ab	1,05 b	1,62 a	0,781
viridiflorol	1585	17,19 ab	14,69 b	19,35 a	17,00 ab	15,55 b	19,15 a	0,813
ledol	1594	8,70 a	6,53 b	7,94 ab	8,27 ab	6,93 b	9,61 a	0,383
1-epi-Cubenol	1621	0,87 a	0,70 a	0,90 a	0,77 b	0,77 b	1,02 a	0,704
β-eudesmol	1641	1,12 a	0,94 a	0,69 a	1,13 a	0,74 a	1,23 a	0,589
cadaleno	1668	0,83 a	0,74 a	1,07 a	1,20 ab	1,00 b	1,56 b	0,004
15-nor-labdan-8-ol	1961	1,85 a	1,23 b	1,66 ab	2,06 a	1,64 a	1,86 a	0,064
16-kaureno	2020	1,30 a	0,84 b	0,99 ab	0,74 a	0,52 a	0,57 a	0,003
Total Representado		59,37	58,48	55,53	61,42	61,67	55,38	
Total Identificado		78,90	80,29	76,86	80,08	82,33	76,62	
Monoterpenos hidrocarbonos		17,40ab	21,6 a	11,8 b	20,7 a	24,2 a	9,3 b	0,413
monoterpenos oxigenados		13,2 b	16,2 a	14,2 ab	13,8 b	16,4 a	15,6 ab	0,226
Sesquiterpenos hidrocarbonos		8,00 b	7,95 b	9,50 a	6,97 b	7,00 b	8,92 a	< 0,001
Sesquiterpenos oxigenados		31,74 a	26,33 b	32,95 a	30,63 b	26,91 c	35,11 a	0,656
Diterpenos hidrocarbonos		1,30 a*	0,84 a*	0,99 a	0,74 a	0,52 a	0,57 a	0,003
Otros		7,28 a	7,42 a	7,40 a	7,24 a	7,22 a	7,16 a	0,372

Listado de componentes por orden de elución en una columna apolar HP-5; IR: índices de retención de Kovats relativos a n-alcenos en una columna apolar HP-5; valores expresados como media (n=3); valores ≥ 5 % en negrita. Por población, valores seguidos de distintas letras indican diferencias significativas (P<0,05) en el test de Tukey (HSD) entre tratamientos.

Capítulo 6

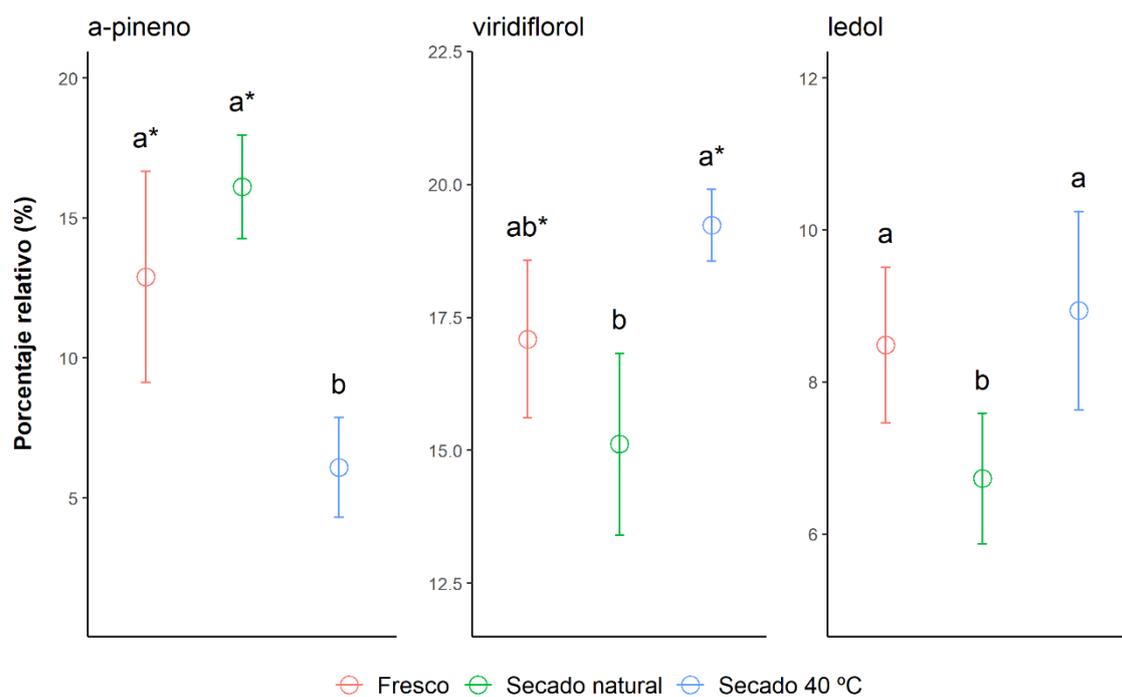


Figura 27. Porcentaje relativo (%) de los tres componentes principales del aceite esencial en función de los tres tratamientos de secado aplicados. Los valores son expresados como media \pm SD. Distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el test de Tukey (HSD). Asteriscos (*) en dos letras iguales indican diferencias marginalmente significativas ($0,10 < P > 0,05$).

El análisis de componentes principales (PCA) ajustado en base a la composición química de los componentes principales identificados en las muestras de aceite esencial se muestra en la Figura 28. Los dos primeros componentes analizados conjuntamente explicaban un 57,8% de la varianza total, distribuidos en un 36,3 % para la componente 1 y en un 21,5 % para la componente 2. El primer componente está altamente correlacionado de forma positiva con el viridiflorol y ledol, y de manera negativa con α -pineno, p-cimeno, pinocarvone y terpinen-4-ol. El segundo componente tiene una alta correlación negativa con el 2-2-6-trimethylcyclohexanone, bornil acetato, alloaromadendreno y viridifloreño, mientras que muestra una correlación positiva con el cadaleno y el 15-nor-labdan-8-ol. De esta forma, el análisis PCA empleado nos permitió separar correctamente las diferentes muestras secadas al natural de aquellas que se secaron a 40 °C. Además, las muestras destiladas en fresco se encontraban mayoritariamente distribuidas en la zona intermedia de la figura y no consiguieron separarse del resto de tratamientos con este análisis.

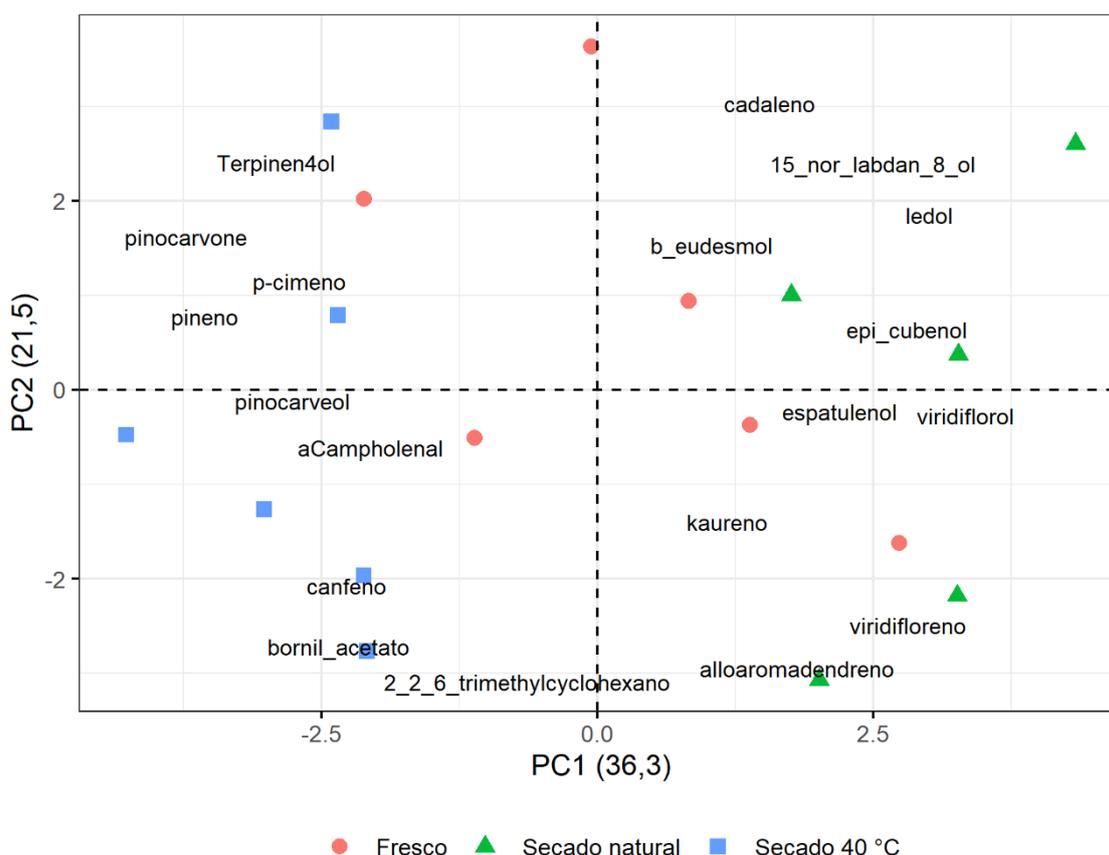


Figura 28. Distribución de variables (texto) e individuos (puntos) del análisis PCA realizado con los componentes mayoritarios del aceite esencial de *C. ladanifer*.

4. DISCUSIÓN

4.1. Rendimiento en aceite esencial

El secado de material vegetal tiene efectos significativos en el rendimiento y la composición química del aceite esencial de varias especies de plantas aromáticas y medicinales (Moghaddam & Mehdizadeh, 2017). En general, este secado del material vegetal previo a la destilación puede dar lugar tanto a un aumento como a una reducción del rendimiento del aceite esencial, dependiendo del tiempo de secado y de la temperatura (Sellami et al., 2011). En nuestro estudio, los mayores rendimientos de aceite esencial en peso seco se observaron en las muestras secadas naturalmente, mientras que el rendimiento descendió en las muestras secadas al horno a 40 °C. Nuestros resultados concuerdan con otros datos observados en la literatura. Así, en

Capítulo 6

ajenjo dulce (*Artemisia annua*) de Irán, Khangholi & Rezaeinode (2008) encontraron también mayores rendimientos de aceite esencial en aquel material vegetal secado a temperatura ambiente en la sombra, seguido de un descenso progresivo a medida que se aumentaba la temperatura del horno. A su vez, resultados similares se han descrito para el rendimiento en aceite esencial de otras especies como *Mentha pulegium* (Hassanpouraghdam & Hassani, 2014) y *Laurus nobilis* (Sellami et al., 2011). Por otro lado, Sárosi et al. (2013) no encontraron ningún efecto sobre el rendimiento en aceite esencial de *Thymus vulgaris* entre los tratamientos destilado en fresco, secado al natural y secado a 30 y 40 °C, pero sí se observó un descenso pronunciado del rendimiento al aumentar la temperatura del horno a 50 °C. De acuerdo a Braga et al. (2005), esta pérdida de aceite esencial puede deberse a que al principio del secado de las plantas aromáticas, la humedad se desplaza por difusión hacia la superficie de las hojas y arrastra el aceite esencial con ella.

En contraposición a los resultados anteriores, otros autores demostraron que un incremento de la temperatura puede dar lugar a un aumento en el rendimiento en aceite esencial, pero esta tasa de aumento puede ser diferente en función de la especie (Moghaddam & Mehdizadeh, 2017). Rahimmalek & Goli (2013) encontraron en *Thymus daenensis* subsp. *Daenensis* que los tratamientos secado al sol, secado en horno a 50 °C y liofilización mostraban rendimientos significativamente mayores que aquellas plantas destiladas en fresco o secadas a la sombra. En *Satureja hortensis* de Irán, Sefidkon et al. (2006) observaron también los mayores rendimientos en el material vegetal secado en horno a 45 °C frente a muestras secadas a temperatura ambiente en la sombra.

Estas diferencias han sido asociadas con la variabilidad de los tejidos secretores, su localización y a la composición especial de cada tipo de aceite esencial (Khangholi & Rezaeinode, 2008). Como ya hemos mencionado, el tipo de estructura secretora es importante para explicar esta variabilidad. De este modo, las estructuras secretoras internas son menos propensas a las pérdidas o transformaciones de volátiles, mientras que las estructuras secretoras externas (tricomas) pueden liberar naturalmente su secreción por ruptura de la cutícula (Figueiredo et al., 2008). Con todo lo anterior por tanto, podemos deducir que es necesario un análisis individual en cada especie vegetal para optimizar la forma más adecuada de secado.

4.2. Composición química del aceite esencial

El porcentaje relativo de la mayoría de compuestos individuales se vio afectado en mayor o menor medida por los diferentes métodos de secado. En general, el secado rápido a alta temperatura provoca cambios degradativos complejos y físicos, además de pérdidas de compuestos volátiles responsables del aroma en el material vegetal (Sellami et al., 2012). En un gran número de plantas aromáticas y medicinales, se ha encontrado una disminución de muchos compuestos del aceite esencial cuando son secados a altas temperaturas (Sárosi et al., 2013; Sellami et al., 2011; Venskutonis, 1997). Con el incremento de la temperatura, la estructura biológica de las glándulas oleaginosas de estas plantas puede verse afectada y se puede observar el colapso de las células epiteliales en las muestras secas de algunas de estas plantas sensibles (Venskutonis, 1997). Además, puede producirse una mayor destrucción de la estructura de la membrana plasmática a temperaturas más altas y esto puede influir a su vez en la permeabilidad de la membrana (Sellami et al., 2011).

En nuestro estudio, el secado del material vegetal en el horno a 40 °C en comparación sobre todo con el secado a la sombra, provocó un descenso pronunciado en los monoterpenos hidrocarbonados, mientras que los sesquiterpenos aumentaron. Estos resultados están en consonancia con los descritos por Khangholi & Rezaeinode (2008) en *Artemisia annua*, en los cuales, el aumento de la temperatura del horno con respecto al material vegetal secado a la sombra provocaba un descenso de los monoterpenos y un aumento en los sesquiterpenos. Rahimmalek et al. (2013) encontraron un descenso e incluso la pérdida total en los monoterpenos hidrocarbonados con el aumento de la temperatura de secado. De acuerdo con Venskutonis (1997), el descenso de los compuestos monoterpenos no oxigenados probablemente pueda deberse a diferentes volatilidades asociadas al peso molecular o a la oxidación de algunos de estos componentes durante el proceso de secado. Gil et al. (2007) también mostraron que alteraciones detectadas en los ratios entre sesquiterpenos y monoterpenos de bajo peso molecular, podrían ser explicadas por diferentes volatilidades en los compuestos. Además, parece que la mayoría de los monoterpenos hidrocarbonados, entre los que se incluye α -pineno, pueden estar almacenados en la superficie de la hoja o cerca de ella (Sellami et al., 2011). Asekun et

Capítulo 6

al. (2007) demostraron que estos compuestos almacenados en la superficie de las hojas, podrían verse considerablemente más afectados por los distintos métodos de secado del material vegetal. Por tanto, teniendo en cuenta la composición del aceite, los dos métodos de secado utilizados podrían considerarse apropiados, la elección de uno u otro va a depender estrictamente del destino final de los constituyentes de interés. Además, para seleccionar el mejor método de secado, deberán también tenerse en cuenta otros criterios diferentes tales como la especie vegetal, el consumo de energía, el coste global y el tiempo necesario de secado.

CAPÍTULO 7

Actividad antifúngica y fitotóxica del aceite esencial y el hidrolato de *C. ladanifer* bajo condiciones *in vitro*

Los resultados presentados en este capítulo han sido enviados en el artículo “Chemical composition, antifungal and phytotoxic activities of *Cistus ladanifer* L. essential oil and hydrolate” a la revista *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. El artículo ha pasado la primera revisión y se encuentra actualmente con el editor para la decisión final.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de plantas causadas por hongos y oomicetos provocan graves reducciones en el rendimiento de los cultivos y en la calidad de los productos agrícolas en todo el mundo (Kordali et al., 2016). En los países en desarrollo, las pérdidas de cosechas debidas a los daños causados por hongos fitopatógenos pueden ser incluso superiores al 12% (Al-Reza et al., 2010). En las últimas décadas, se han utilizado de forma generalizada productos químicos sintéticos como fungicidas para proteger de forma eficaz los cultivos. Sin embargo, estos fungicidas sintéticos con componentes químicos no biodegradables (benzimidazoles, hidrocarburos aromáticos e inhibidores de la biosíntesis de esteroides) están asociados con un elevado riesgo para el medio ambiente y la salud humana. Además, debido a la aplicación sistemática e inadecuada de productos químicos, las especies de hongos han desarrollado resistencia a varias de las sustancias químicas comúnmente disponibles (Stević et al., 2014). Recientemente, la normativa europea y la concienciación de las personas en cuanto a seguridad alimentaria y sistemas sostenibles, han impulsado limitaciones al uso de productos químicos (Diáñez et al., 2018). Por todo ello, ha aumentado el interés por la búsqueda de productos vegetales naturales más sostenibles como alternativa a los agroquímicos.

En este contexto, los aceites esenciales de plantas y otros subproductos derivados del proceso de hidrodestilación, como los hidrolatos, podrían desempeñar un papel importante en la protección de cultivos debido a su alta biodegradabilidad, seguridad ambiental y su limitada toxicidad para los organismos no diana (Sharma et al., 2017). Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos naturales derivados del metabolismo secundario de las plantas que pueden contener entre 20 y 60 componentes en concentraciones muy diferentes. En la mezcla suele haber dos o tres componentes principales con un porcentaje elevado (20-70%) en comparación con el resto de componentes (Bakkali et al., 2008). A su vez, los hidrolatos están constituidos en su mayoría por agua de condensación con una pequeña cantidad (normalmente menos de 1 g/l) de componentes del aceite esencial disueltos (Aćimović et al., 2020). En los últimos años, muchos estudios han informado del notable efecto antifúngico de varios aceites esenciales contra hongos fitopatógenos (Liu et al., 2016; Nazzaro et al., 2017; Palfi et al., 2019). Giamperi et al. (2002) testaron los aceites esenciales de ocho

Capítulo 7

especies de plantas y encontraron un efecto de inhibición del crecimiento micelial sobre *Phytophthora cinnamomi*, *Pyrenochaeta lycopersici* y *Verticillium dahlia*. Por otro lado, cada vez se presta más atención al uso de hidrolatos como producto alternativo a los fungicidas sintéticos (D'Amato et al., 2018; Tabet Zatlá et al., 2017; Tabti et al., 2014). De este modo, Boyraz & Özcan (2006) mostraron la actividad antifúngica *in vitro* de diferentes hidrolatos vegetales contra cuatro hongos fitopatógenos (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria citri*). Este creciente interés se debe a que los hidrolatos, como subproductos de la destilación, pueden proporcionar ventajas sobre el aceite esencial, tales como una mayor producción, un menor coste y su mejor aplicabilidad por métodos de pulverización o de riego para controlar los patógenos transmitidos por el aire y el suelo, respectivamente.

C. ladanifer L. (Cistaceae), también conocida como jara pringosa, es un arbusto nativo de la región mediterránea que crece ampliamente en los suelos silíceos ácidos de la Península Ibérica (Raimundo et al., 2018). Además, es considerada una especie pirófito y coloniza grandes áreas en forma de masas densas monoespecíficas, debido en parte a su capacidad de inhibir el crecimiento de otras plantas mediante la liberación de compuestos alelopáticos (Alías et al., 2020; Chaves & Escudero, 1997; Frazão et al., 2018). Este arbusto secreta a través de las hojas y tallos jóvenes un exudado particular, llamado ládano, ampliamente utilizado por la industria perfumera como fijador natural (Barrajón-Catalán et al., 2016). España es el principal país productor de goma de ládano, que se obtiene de la recolección de plantas silvestres de *C. ladanifer*. Además de la goma de ládano, de esta planta se pueden obtener otros productos aromáticos muy apreciados también por la industria perfumera y cosmética, como el aceite esencial y el hidrolato (Alves-Ferreira et al., 2020). De hecho, hay un interés creciente asociado con las propiedades antioxidantes (Tavares et al., 2020; Zidane et al., 2013) y antimicrobianas (Benali et al., 2020; Greche et al., 2009) del aceite esencial y el hidrolato de *C. ladanifer*.

Hasta donde sabemos, algunos estudios han detectado el efecto del aceite esencial de *C. ladanifer* contra hongos fitopatógenos (Greche et al., 2009), pero no hay estudios previos que evalúen el efecto del hidrolato. Por lo tanto, los objetivos de este estudio son (1) evaluar el efecto del aceite esencial y el hidrolato de *C. ladanifer* sobre cuatro hongos fitopatógenos *in vitro*, (2) evaluar el efecto antifúngico del hidrolato

contra *Phytophthora cinnamomi* en un patosistema *in situ*, y por último (3) evaluar el posible efecto fitotóxico tanto del aceite esencial como del hidrolato sobre dos especies de plantas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y extracción

Las plantas de *C. ladanifer* empleadas en este ensayo se recolectaron en la parcela localizada en Guijo de Granadilla (ver capítulo 5). En septiembre de 2019, se recogieron unos 5 kg de partes aéreas de un número elevado de plantas seleccionadas al azar por toda la zona. Las muestras se secaron al aire a temperatura ambiente en la nave del centro de trabajo y se almacenaron a continuación en condiciones de oscuridad hasta la extracción del aceite. La extracción del aceite se llevó a cabo conforme a la metodología descrita en el apartado 1 del capítulo 2. Se empleó en cada extracción una cantidad de material vegetal de aproximadamente 200 g y se realizaron un total de 20 extracciones. En cada una de estas extracciones, el aceite esencial y el hidrolato se separaron por decantación y se almacenaron respectivamente en recipientes de vidrio a -18 °C y 4 °C para evitar su degradación.

2.2. Análisis químico del aceite esencial

Para este estudio, a diferencia de los anteriores, no se empleó la misma metodología y condiciones para la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El análisis GC-MS de las muestras de aceite esencial e hidrolato se realizó con la ayuda de Servicios de Apoyo a la Investigación y al Desarrollo Empresarial de la Universidad de Extremadura (SAIUEx). Además, la metodología de ambos aceite esencial e hidrolato fue diferente y se describe de forma independiente a continuación.

El aceite esencial se analizó en un cromatógrafo de gases (modelo Agilent 7820 A) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent simple cuadrupolo 5977E MSD) y con una columna capilar Agilent DB-WAXETR (polietilenglicol, 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interior y 0,25 µm de espesor de película). Se utilizó helio como gas portador con un flujo de 1 ml/min. La temperatura del horno se ajustó de acuerdo con el siguiente

Capítulo 7

ciclo: 5 minutos a 70 °C; aumento de la temperatura a un ritmo de 1°C/min hasta 95 °C; 10 minutos a 95 °C; aumento de la temperatura a un ritmo de 2°C/min hasta 200 °C; 40 minutos a 200 °C. La temperatura del inyector y del detector se mantuvo a 250 °C y 280 °C, respectivamente. El detector a 70 eV funcionó en el modo de barrido (1 barrido/s) para un rango de masas de 20 a 450 m/z, y con una temperatura de la fuente de 178 °C. Se diluyó una cantidad de 20 µl de aceite esencial en 1 ml de diclorometano, y a continuación se inyectó 1 µl de la muestra diluida en modo Splitless (50:1).

A su vez, el hidrolato se sometió a un análisis GC-MS (triple cuadrupolo) con HS-SPME (microextracción en fase sólida de espacio en cabeza) y utilizando una fibra adsorbente DVB/PDMS (divinilbenceno-polidimetilsiloxano) para la extracción. Se transfirió un ml de hidrolato a un vial de espacio en cabeza y se incubó a 40 °C durante 15 minutos. Los compuestos volátiles se extrajeron introduciendo la fibra en el puerto del inyector a 250 °C durante 15 minutos. En el análisis cromatográfico se utilizó una columna capilar Agilent VF5MS (30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interior y 0,25 µm de espesor de película), con helio como gas portador. El ciclo de temperatura del horno fue: 5 min a 40 °C; aumento de la temperatura a un ritmo de 3 °C/min hasta 195 °C; aumento de la temperatura a un ritmo de 10 °C/min hasta 240 °C. El análisis MS se operó para un rango de masas de 30 a 500 m/z.

Los compuestos volátiles se identificaron mediante comparación de sus espectros de masas y tiempos de retención con datos recogidos en librerías (Wiley A y NIST 2.0 MS) y en la bibliografía. El porcentaje de composición relativa (%) de cada compuesto individual se calculó dividiendo cada área de pico individual entre el área total del cromatograma, y los resultados se expresaron como valores medios de 2 inyecciones para cada análisis.

2.3. Efecto sobre el crecimiento micelial

Los efectos del aceite esencial y del hidrolato se testaron en cuatro aislados de diferentes especies fitopatógenas: tres especies de hongos (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis y Shoem, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr) y uno especie de oomiceto (*Phytophthora cinnamomi* Rands). La cepa de *F. oxysporum* se obtuvo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Murcia (1989) y la cepa

de *R. solani* de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) en Murcia (2016), y ambas fueron proporcionadas por el Dr. J.C. Tello Marquina (Universidad de Almería, España). La cepa de *P. cinnamomi* (MYC 018) se obtuvo de encina (*Quercus ilex* L.) en Badajoz (2014) y la cepa de *C. parasitica* (LP 66) de un castaño (*Castanea sativa*) en Cáceres (2019), y ambas pertenecen a la Colección de Cultivos de Hongos y Oomicetos de CICYTEX.

En el caso del aceite esencial, se ensayó el efecto de los compuestos volátiles liberados mediante un método de disco difusión basado en la metodología descrita previamente por Serrano-Pérez et al. (2017). Para cada aislado, se colocó un disco de 5 mm de diámetro tomado de un cultivo en crecimiento activo en el centro de una placa de Petri (9 cm de diámetro), que contenía 12 ml de CMA (medio de Agar de harina de maíz) y se incubó a 25 °C durante 24 horas antes previo a la aplicación del aceite. A continuación, se invirtió la placa y se colocó un disco de papel de filtro Whatman nº 1 estéril (de 9 cm de diámetro) en la cara interior de la tapa. Se aplicó una sola gota de aceite esencial en el centro del papel con una micropipeta. Se testaron ocho dosis de aceite esencial (0,013, 0,026, 0,040, 0,066, 0,090, 0,130, 0,330 y 0,660 µl/ml de espacio libre en cabeza en la placa Petri), y se utilizaron placas con 0,660 µl/ml de agua destilada como control. Se prepararon cuatro réplicas (placas) para cada aislado y dosis. Todas las placas se sellaron con Parafilm y se incubaron durante 3-7 días a 25 °C hasta que el micelio alcanzó el borde de la placa en el tratamiento control.

El efecto del hidrolato se analizó añadiéndolo al medio CMA a 40 °C antes de la solidificación a dosis finales de 62,5, 125, 250 y 500 µl/ml (Gea et al., 2019). Para cada aislado y dosis se utilizaron 4 placas Petri de 9 cm de diámetro (réplicas) con 12 ml de CMA enmendado. Como control se utilizaron 4 placas sin hidrolato. En el centro de cada placa de Petri, se colocó un disco de 5 mm de diámetro del aislado. Todas las placas se sellaron con Parafilm y se incubaron en las mismas condiciones que las descritas para el aceite esencial.

Se midió el crecimiento radial de cada aislado para evaluar el efecto del tratamiento sobre el crecimiento micelial. Para ello, se registraron dos diámetros perpendiculares por placa a las 24 horas (para excluir la fase *lag* inicial), y posteriormente, tras 3-7 días de incubación, justo antes de que el micelio del control alcanzara el borde de la placa. A continuación, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM en adelante) a partir de la siguiente ecuación $ICM = (DC -$

Capítulo 7

DT/DC) x 100, donde DC y DT corresponden al diámetro medio de crecimiento del control y del tratamiento, respectivamente (Diáñez et al., 2018). Además, los discos de las placas en las que no se observó crecimiento micelial se transfirieron a nuevas placas con medio CMA y se incubaron nuevamente durante 7 días a 25 °C, con el objetivo de determinar si el efecto del tratamiento era fungistático o fungitóxico. En virtud de los resultados positivos en cuanto al efecto antifúngico y considerando ciertas ventajas sobre el aceite esencial (como la mayor disponibilidad y la buena solubilidad en agua), se eligió el hidrolato para realizar ensayos adicionales que evalúen su actividad antifúngica y fitotóxica.

2.4. Efecto del hidrolato en el patosistema *P. cinnamomi* - *L. luteus*

Se seleccionó el patosistema *P. cinnamomi* - *L. luteus* para evaluar el potencial efecto antifúngico del hidrolato *in situ*. *L. luteus* es una especie altamente susceptible a *P. cinnamomi* (Serrano et al., 2010) y, por tanto, este patosistema ha sido utilizado en estudios previos para evaluar la eficacia de diferentes productos para el control de *P. cinnamomi* (Ríos et al., 2017; Rodríguez-Molina et al., 2018). En este ensayo se utilizaron tres aislados de *P. cinnamomi* de la Colección de Cultivos de Hongos y Oomicetos de CICYTEX: MYC 018 (descrito anteriormente), CA 04 y CA 09 ambas obtenidas de castaños enfermos en Cáceres (2017 y 2018, respectivamente). La patogenicidad de los 3 aislados había sido evaluada previamente en dos hospedadores primarios (encina y castaño) y en *L. luteus*.

El inóculo de clamidosporas se elaboró de acuerdo a la metodología descrita por Romero et al. (2007) y modificada por Rodríguez-Molina et al. (2021). Para ello, se prepararon placas Petri (20 cm de diámetro) con 200 ml de medio con caldo de zanahoria y se transfirieron al medio trozos de los aislados de *P. cinnamomi*. Tras 4 semanas de incubación a 22 °C en oscuridad, se extrajo el micelio desarrollado en cada placa, se lavó cuidadosamente con agua destilada y se mezcló con 250 ml de agua destilada durante 5 minutos. La concentración de clamidosporas/ml en la suspensión se estimó utilizando una cámara de recuento Neubauer.

El experimento se desarrolló en dos etapas: una primera fase de tratamiento (Fase 1) y una segunda fase de agua (Fase 2). La fase 1 se llevó a cabo en tubos de ensayo

de polipropileno de 5 ml (75 mm de longitud x 12 mm de diámetro). En cada tubo se dispensó un volumen total de 5 ml de una suspensión mezcla de hidrolato e inóculo de clamidosporas. Se ensayaron cinco dosis de hidrolato en esta suspensión mezcla (30, 62,5, 125, 250 y 500 µl/ml), y el inóculo de clamidosporas (añadido hasta completar el volumen de 5 ml) se ajustó previamente para alcanzar en todos los casos una concentración final de 1000 clamidosporas/ml de suspensión mezcla (5000 clamidosporas por tubo). Además, se emplearon como control en el ensayo tubos con inóculo de clamidosporas pero sin hidrolato (dosis a 0 µl/ml), y tubos con sólo agua destilada no tratada (WT). Los tubos se movieron con cuidado para homogeneizar la mezcla-suspensión y se dispusieron verticalmente en gradillas metálicas. En cada tubo, se colocó una plántula de *L. luteus* var. "Albuquerque" (2 días de edad y 1,5-2 cm de longitud de raíz) con la raíz sumergida en la suspensión de la mezcla. Se utilizaron diez plántulas por tratamiento y aislado. Las gradillas con los tubos y las plántulas se colocaron en una cámara de crecimiento con ciclos de 16 h de luz a 25 °C y 8 h de oscuridad a 19 °C.

Transcurrido cuatro días, se sacaron todas las plántulas de los tubos y se lavaron cuidadosamente las raíces con agua destilada para eliminar el hidrolato y el inóculo. A continuación, las plántulas se transfirieron a tubos de ensayo de vidrio de 27 ml que contenían únicamente agua destilada, y partir de entonces comenzó la fase 2. Las plántulas se cultivaron durante 10 días más en la cámara y bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Se estimó el número de plántulas muertas (marchitas y con podredumbre de la raíz) y se midió la longitud (hipocótilo más radícula) de las plántulas vivas al final de la Fase 1, justo previamente al comienzo de la Fase 2 (el cuarto día del experimento), y a continuación también, a lo largo de la Fase 2, los días 7, 10 y 14 del experimento.

2.5. Efecto fitotóxico en semillas de *R. sativus* y *L. luteus*

En este experimento se incluyó rabanito (*Raphanus sativus* L.) por tratarse de una especie sensible a los compuestos fitotóxicos y *L. luteus* por ser huésped natural de *P. cinnamomi*. Se colocaron sets de diez semillas de cada especie previamente desinfectadas en placas de Petri (con diámetros acordes al tamaño de las semillas: 5,5

Capítulo 7

cm de diámetro para *R. sativus* y 9 cm de diámetro para *L. luteus*) sobre dos capas de papel de filtro Whatman nº 1. En el test con aceite esencial, el papel de filtro de las placas se humedeció con 1 ml de agua destilada en *R. sativus* y 2 ml para *L. luteus*, y el aceite esencial se depositó como una sola gota en el centro de las placas a diferentes volúmenes (1, 2, 4 y 8 µl en *R. sativus* y a 2, 4, 8 y 16 µl en *L. luteus*). Por otro lado, en el test de hidrolato, se prepararon varias diluciones de hidrolato al 6,25, 12,5, 25 y 50 % (v/v) en agua destilada y se utilizaron para humedecer el papel de filtro de las placas, utilizando 1 ml y 2 ml por placa para *R. sativus* y *L. luteus*, respectivamente. Se emplearon como control placas Petri que contenían sólo agua destilada (1 ml o 2 ml, según la especie). Se prepararon diez réplicas por producto (aceite esencial e hidrolato), dosis y especie. Las placas Petri se sellaron con Parafilm y se incubaron a 25 °C en oscuridad. Al cabo de 5 días, se registraron los porcentajes de germinación y la longitud de las plántulas. Se calculó el índice de germinación (IG) para cada especie, según la siguiente fórmula: $IG = G/G_c \times L/L_c$, donde G y G_c son los porcentajes de germinación en las placas tratadas y de control, respectivamente, y L y L_c son las longitudes medias de las plántulas en las placas tratadas y control, respectivamente (Carballo et al., 2009).

2.6. Efecto fitotóxico del hidrolato en plántulas de *L. luteus*

La fitotoxicidad del hidrolato sobre las plántulas de *L. luteus* se testó siguiendo el mismo procedimiento metodológico descrito en la sección 2.4., pero sin inóculo de clamidosporas. En la primera fase de tratamiento (Fase 1), se dispensaron en los tubos de ensayo diluciones de hidrolato en agua a concentraciones de 3, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 % (v/v). Se utilizaron como controles tubos de ensayo con 5 ml de agua destilada y se colocó en cada tubo una plántula de *L. luteus* de dos días de edad (1,5-2 cm de longitud) con la raíz sumergida en la suspensión. Se utilizaron diez plántulas por concentración. Las plántulas se cultivaron durante 4 días en una cámara de crecimiento (ciclos de 16 h de luz a 25 °C y 8 h de oscuridad a 19 °C). A continuación, se extrajeron las plántulas de los tubos, se lavaron las raíces con agua destilada y se transfirieron las plántulas a tubos de ensayo de vidrio de 27 ml con agua destilada. En ese momento, comenzó el período de incubación de 10 días de la fase 2. La longitud de las plántulas

(hipocótilo más radícula) y el número de raíces secundarias desarrolladas se registraron al principio de la fase 2 y en los días 7, 10 y 14 del experimento.

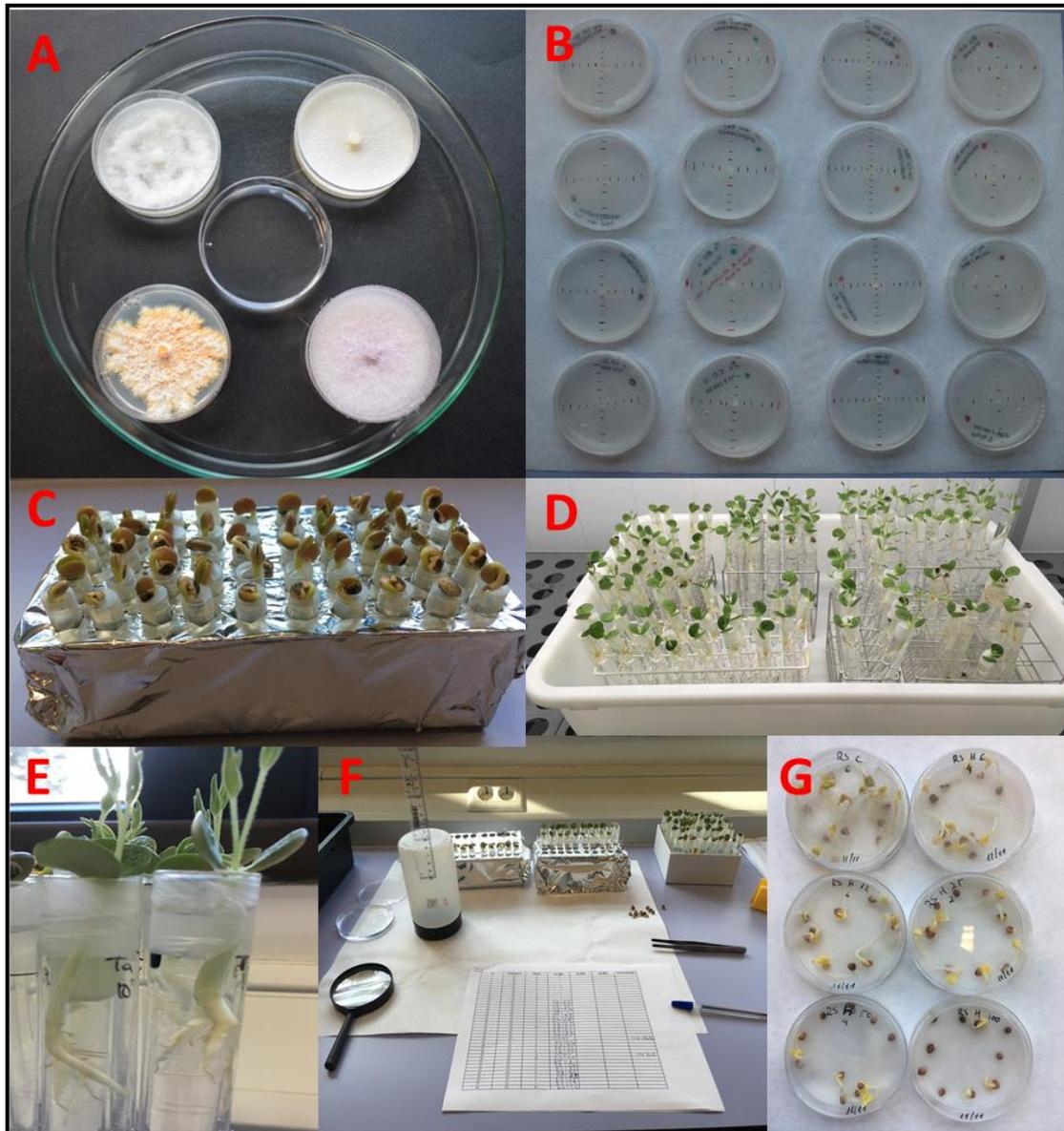


Imagen 6. Descripción de los ensayos. (A)-detalle de las cuatro especies fitopatógenas empleadas; (B)-medición del crecimiento micelial; (C)-efecto del hidrolato en el patosistema *P. cinnamomi* - *L. luteus* al comienzo de la fase 1; (D)-efecto del hidrolato en el patosistema *P. cinnamomi* - *L. luteus* durante el desarrollo de la fase 2; (E)-detalle de una plántula de *L. luteus* en fase 2; (F)-toma de datos en el laboratorio; (G)-efecto fitotóxico del hidrolato en *R. sativus*.

Capítulo 7

2.7. Análisis de datos

Para evaluar el efecto de la dosis sobre la ICM, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis debido a la falta de normalidad en los datos. A su vez, las comparaciones múltiples se llevaron a cabo con el test Kruskal-Nemenyi del paquete PMCMR en R. Por otro lado, se calcularon los valores ED50 (dosis efectiva 50) utilizando un análisis logit con la función `drm` de la librería `drc` (Ritz et al., 2015), empleando como variable dependiente el porcentaje de ICM (Ritz et al., 2019).

Se construyó un modelo lineal generalizado (MLG) con una distribución de error binomial y enlace logit (variable dependiente binaria: muerte/no muerte), con el fin de evaluar el efecto del hidrolato sobre las plántulas *L. luteus* en el patosistema junto a *P. cinnamomi*. La especie y el tratamiento se incluyeron en el modelo como factores independientes. Además, la mortalidad de plántulas se incluyó como variable de respuesta binaria en un análisis logit para determinar los valores de ED50 (Ritz et al., 2019). A lo largo de todo el experimento, el efecto del hidrolato sobre la longitud de plántulas (hipocótilo más radícula) se analizó mediante un Modelo Lineal Mixto (MLM), con la identidad de plántulas como factor aleatorio. El modelo incluyó tres factores fijos independientes en interacción: especie, tiempo (días) y dosis.

Los datos para el IG de semillas como respuesta al tratamiento con aceite esencial se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para *L. luteus*, y mediante un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis (falta de normalidad de los datos) para *R. sativus*. A su vez, el efecto del hidrolato sobre el IG se analizó mediante un ANOVA de dos vías con la especie y la dosis como factores.

Se ajustó de nuevo un MLM para evaluar el efecto fitotóxico del hidrolato sobre la longitud total (hipocótilo más radícula) de las plántulas de *L. luteus*. En este caso, la dosis de hidrolato y el tiempo (días) se introdujeron en el modelo como variables independientes, y la planta a su vez como factor aleatorio. Los datos del número de raíces secundarias se analizaron mediante un ANOVA de una vía con la dosis como factor.

A menos que se indique lo contrario en el texto, todas las comparaciones de medias se realizaron con la prueba de Tukey (HSD) a un nivel de significación de $P < 0,05$. Además, todos los análisis fueron realizados con el software estadístico R Core Team

(2020), y se emplearon las siguientes librerías: modelos lineales mixtos con nlme (Pinheiro et al. 2020), modelos lineales generalizados con MASS (Venables & Ripley 2002), ggplot2 para la realización de gráficos (Wickham, 2016), plyr para la manipulación de datos (Wickham et al., 2011), dplyr para la manipulación de datos (Wickham et al., 2020), ggpubr para la realización de gráficos (Kassambara, 2020), Rmisc para obtener funciones útiles (Hope, 2013), comparaciones múltiples Post hoc con emmeans (Lenth, 2020) y comparaciones múltiples con PMCMR (Pohlert 2014).

3. RESULTADOS

3.1. Composición química del aceite esencial y el hidrolato

Se identificaron 31 y 26 componentes (76,1 y 72,0 % del total integrado) mediante GC-MS en el aceite esencial y el hidrolato, respectivamente (Tabla 13). El grupo más representativo en el aceite esencial fueron los sesquiterpenos oxigenados (28,4%), mientras que los monoterpenos oxigenados dominaron en el hidrolato (43,6%). A su vez, los principales componentes en el aceite esencial fueron el ledol (18,63%), el α -pineno (14,8%), el viridiflorol (7,11%) y el acetato de bornilo (4,8%). Por el contrario, el principal componente del hidrolato fue el trans-pinocarveol (10,9%), seguido del 2,2,6-trimetilciclohexano (10,31%) y el pinocarvona (6,3%). El rendimiento medio del aceite esencial obtenido de 20 destilaciones fue de $0,35 \pm 0,05$ % (v/p.s).

Tabla 13. Composición química (%) y tiempo de retención (RT) del aceite esencial y el hidrolato de *C. ladanifer*.

Compuestos	Aceite esencial		Hidrolato	
	TR (min)	Area (%)	TR (min)	Área (%)
Monoterpenos hidrocarbonados:		20,93		
α-Pineno	11,29	14,81		
Canfeno	13,53	2,23		
Limoneno	22,43	0,71		
Y-Terpineno	26,55	0,36		
p-cimeno	29,12	2,24		
p-Cymenene	49,46	0,58		
Monoterpenos oxigenados:		15,44		43,62
1,8-cineole	23,31	0,60		
α -canfolenal	54,96	1,15	21,95	0,48
alcanfor	57,44	0,53	23,92	2,24

Capítulo 7

Compuestos	Aceite esencial		Hidrolato	
	TR (min)	Area (%)	TR (min)	Área (%)
Isopinocanfene	60,04	1,15		
acetato de bornilo	62,60	4,80	31,59	4,38
terpinen-4-ol	64,29	1,67	26,82	2,25
Mirtenal	66,69	0,94		
Borneol	71,46	1,83	26,66	2,75
Verbenona	72,31	0,52	28,15	2,64
Mirtenol	77,30	1,25	27,87	2,62
trans-Carveol	79,74	0,60	28,93	1,57
p-Cimen-8-ol	80,64	0,40		
carvona			29,76	0,96
cis-ocimenone			29,14	1,59
acetato de mirtenilo			33,17	0,51
pinocarvona			25,94	6,31
trans-pinocarveol			25,07	10,96
trans-verbenol			25,24	4,38
Sesquiterpenos hidrocarbonados:		7,96		2,06
Ciclosativeno	53,54	0,73		
α-copaeno	54,45	0,69		
allo-aromadendreno	67,51	1,78	38,88	0,95
ledeno	71,01	2,36	40,23	1,11
δ-cadineno	75,04	1,13		
cis-calameneno	79,89	0,56		
α-calacoreno	84,85	0,71		
Sesquiterpenos oxigenados:		28,36		10,79
palustrol	85,45	0,91	43,42	1,02
viridiflorol	90,89	7,11		3,66
ledol	93,64	18,63	44,88	4,60
espatulenol	95,64	1,71	43,84	0,57
1-epi-cubenol			45,67	0,93
Otros:		3,36		15,53
2,2,6-trimethylciclohexano	34,35	2,82	19,30	10,31
3,3,5-trimethyl-ciclohexeno	51,92	0,54		
Benzaldehido			15,26	1,54
ácido benzoico			26,25	1,12
Isoforona			20,40	2,57
Total identificado (%)		76,06		72,00

Listado de componentes del aceite esencial y el hidrolato obtenidos en las columnas DB-WAXETR y VF5MS, respectivamente; área (%): porcentaje relativo de cada compuesto analizado; valores $\geq 5\%$ en negrita.

3.2. Efecto del aceite esencial en la inhibición del crecimiento micelial

Los resultados del ensayo indican que el aceite esencial de *C. ladanifer* mostró la capacidad de inhibir el crecimiento de todos los hongos fitopatógenos ensayados *in vitro* (Tabla 14). De este modo, todas las dosis de aceite ensayadas mostraron un efecto de inhibición parcial o total sobre el crecimiento micelial de las cuatro especies ensayadas, y estuvo significativamente influenciado por la dosis de aceite esencial aplicada. Por un lado, el aislado *R. solani* fue el más sensible al aceite esencial, con un valor ED50 de 0,017 $\mu\text{l/ml}$, mientras que *F. oxysporum* mostró el valor ED50 más alto (0,033 $\mu\text{l/ml}$), y por tanto, este aislado fue el más tolerante al efecto del aceite esencial. Por otro lado, *C. parasitica* y *P. cinnamomi* mostraron sensibilidades intermedias, con valores ED50 de 0,027 y 0,024 $\mu\text{l/ml}$, respectivamente. Por último, todas las dosis que provocaron la inhibición total del crecimiento micelial (100 %) mostraron un efecto fungitóxico (letal) en todas las especies, excepto *F. oxysporum*, en la que sólo se encontró una actividad fungistática.

Tabla 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial a diferentes dosis de aceite esencial de *C. ladanifer* y valores ED50 para las tres especies de hongos fitopatógenos y un oomiceto.

Dosis ($\mu\text{l/ml}$) *	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) #			
	<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
0,013	31,23 \pm 2,84 a	32,91 \pm 6,46 a	19,96 \pm 1,95 a	48,83 \pm 5,83 a
0,026	46,65 \pm 5,81 b	50,31 \pm 3,90 b	50,76 \pm 22,70 b	57,04 \pm 6,99 b
0,040	58,55 \pm 13,87 b	56,81 \pm 4,18 c	83,95 \pm 7,86 c	73,00 \pm 8,15 c
0,066	83,08 \pm 5,39 c	65,41 \pm 1,99 d	96,75 \pm 6,18 d	79,58 \pm 3,08 c
0,090	93,87 \pm 3,93 d	72,12 \pm 5,52 e	100,00 \pm 0,00 d	91,08 \pm 1,66 d
0,130	100 \pm 0,00 e	92,03 \pm 3,67 f	100,00 \pm 0,00 d	100,00 \pm 0,00 e
0,330	100 \pm 0,00 e	100,00 \pm 0,00 g	100,00 \pm 0,00 d	100,00 \pm 0,00 e
0,600	100 \pm 0,00 e	100,00 \pm 0,00 g	100,00 \pm 0,00 d	100,00 \pm 0,00 e
ED50 ($\mu\text{l/ml}$)	0,027	0,033	0,024	0,017

* Dosis de aceite esencial en $\mu\text{l/ml}$ de espacio libre en cabeza de la placa Petri; ED50: dosis efectiva 50 (análisis logit).

Valores expresados como media \pm desviación estándar (n=4). Valores seguidos de letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Nemenyi (P < 0,05)).

3.3. Efecto fitotóxico del aceite esencial en *R. sativus* y *L. luteus*

La aplicación de aceite esencial tuvo un efecto significativo sobre el índice de germinación de las semillas tanto en la especie *L. luteus* (ANOVA: $F_{3,35} = 28,29$; $P < 0,001$) como en *R. sativus* (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 32,89$; $df = 3$; $P < 0,001$). Sin embargo, el efecto fitotóxico de las distintas dosis varió en función de la especie analizada (Figura 29). Así, las semillas de *L. luteus* presentaron el mayor índice de germinación con la dosis de 4 μl , y disminuía gradualmente al aumentar la dosis de aceite esencial. En *R. sativus*, el índice de germinación disminuyó drásticamente a partir de la dosis de 1 μl y alcanzó un valor cercano a cero con la dosis más alta (8 μl).

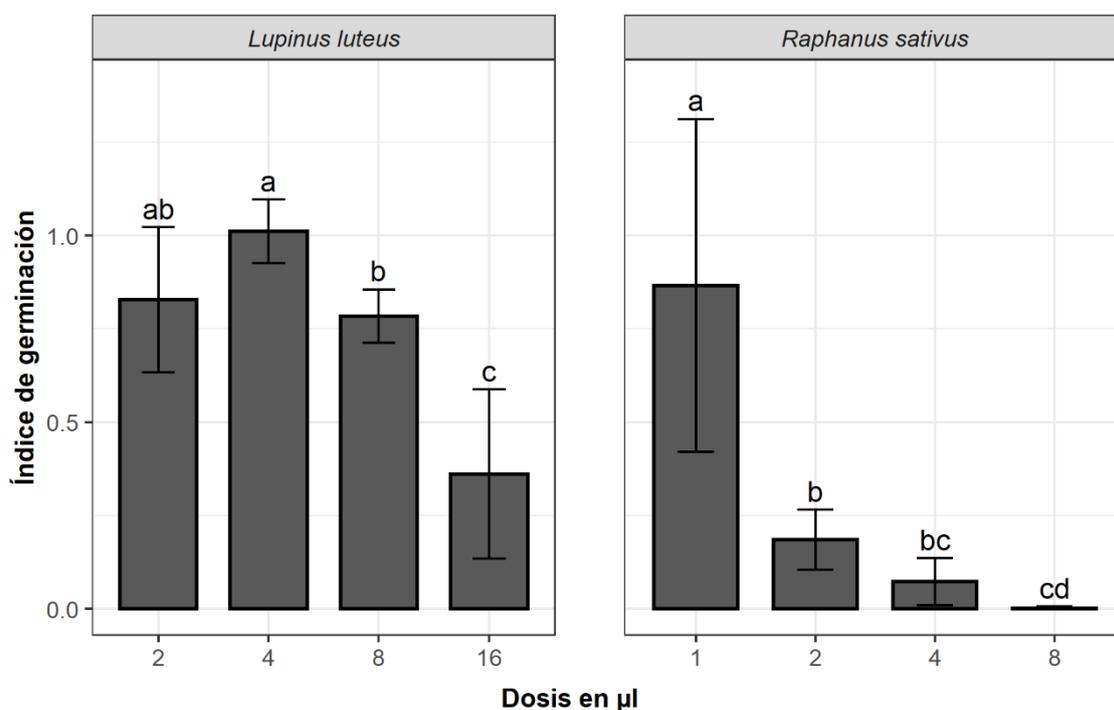


Figura 29. Actividad fitotóxica del aceite esencial de *C. ladanifer* a diferentes dosis (μl) sobre el índice de germinación de semillas de rabanito (*R. sativus*) y altramuz (*L. luteus*). Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($n=10$). Para cada especie, las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA para *L. luteus* y Kruskal-Wallis para *R. sativus* seguido del test de comparación múltiple de Tukey ($P < 0,05$)).

3.4. Efecto del hidrolato en la inhibición del crecimiento micelial

Todas las dosis de hidrolato testadas inhibieron el crecimiento micelial de los cuatro aislados (especies) estudiados, pero el efecto de inhibición en cada especie fue significativamente dependiente de la dosis ($P < 0,05$) (Tabla 15). El crecimiento micelial de todas las especies fue completamente inhibido a dosis de hidrolato de 250 y 500 $\mu\text{l/ml}$, excepto en *F. oxysporum*, que mostró una ICM máximo de 86,9% con la dosis más alta de hidrolato. Sin embargo, la dosis de hidrolato a 250 $\mu\text{l/ml}$ sólo tuvo un efecto fungistático en los aislados en los que había inhibido completamente el crecimiento, mientras que el efecto a la dosis de 500 $\mu\text{l/ml}$ fue fungitóxico (letal) en todos los casos. De igual modo que con el aceite esencial, *R. solani* fue la especie más susceptible al hidrolato, con un nivel de ED50 de 88,1 $\mu\text{l/ml}$, y *F. oxysporum* fue la menos sensible, con un valor de ED50 de 235,2 $\mu\text{l/ml}$.

Tabla 15. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial a diferentes dosis de hidrolato de *C. ladanifer* y valores ED50 para las tres especies de hongos fitopatógenos y un oomiceto

Dosis ($\mu\text{l/ml}$) *	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) #			
	<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
62,5	17,75 \pm 5,23 a	16,49 \pm 2,62 a	29,25 \pm 1,79 a	43,13 \pm 3,30 a
125	38,20 \pm 6,09 b	31,52 \pm 1,59 b	37,98 \pm 2,71 b	63,76 \pm 2,30 b
250	100,00 \pm 0,00 c	60,08 \pm 4,47 c	100,00 \pm 0,00 c	100,00 \pm 0,00 c
500	100,00 \pm 0,00 c	86,90 \pm 8,66 d	100,00 \pm 0,00 c	100,00 \pm 0,00 c
ED50 ($\mu\text{l/ml}$)	141,9	235,2	144,4	88,1

* Dosis de hidrolato en $\mu\text{l/ml}$ de medio CMA en placas Petri de 9-cm; ED50: dosis efectiva 50 (análisis logit).

Valores expresados como media \pm desviación estándar (n=4). Valores seguidos de letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Nemenyi ($P < 0,05$)).

3.5. Efecto *in situ* del hidrolato sobre el patosistema *P. cinnamomi*-*L. luteus*

El hidrolato mostró un efecto antifúngico contra *P. cinnamomi* en el patosistema experimental *in situ* *P. cinnamomi* - *L. luteus* (Tabla 16). En el MLG ajustado, la mortalidad de plántulas a lo largo del experimento no fue significativamente diferente entre los tres aislados analizados ($\chi^2 = 1,49$; $df = 2$; $P = 0,48$), pero si entre los diferentes tratamientos ($\chi^2 = 199,44$; $df = 6$; $P < 0,001$). A dosis crecientes, se observó una

Capítulo 7

reducción significativa ($P < 0,05$) de la mortalidad de las plántulas, alcanzando un valor del 0 % en la dosis más alta (tratamiento 500 $\mu\text{l/ml}$). Al final del experimento, las dosis inferiores a 125 $\mu\text{l/ml}$ no fueron eficaces para controlar los daños de *P. cinnamomi* en las plántulas, aunque estos tratamientos retrasaron la mortalidad en comparación con las plántulas no tratadas e inoculadas (tratamiento 0 $\mu\text{l/ml}$) (Datos no mostrados). El aislado MYC-18 mostró la mayor sensibilidad al hidrolato, con un valor ED50 de 165,5 $\mu\text{l/ml}$, mientras que los aislados CA-4 y CA-9 mostraron valores ED50 más altos y similares entre ellos (234,1 y 238,1 $\mu\text{l/ml}$, respectivamente). Por último, en el modelo estadístico final ajustado (MLG), la interacción *tratamiento x aislado* no fue estadísticamente significativa ($\chi^2 = 4,11$; $df = 12$; $P = 0,98$).

Tabla 16. Efecto del hidrolato de *C. ladanifer* a diferentes dosis ($\mu\text{l/ml}$) sobre la mortalidad de plántulas de *L. luteus* causada por tres aislados de *P. cinnamomi* al final de la fase 2.

Dosis de hidrolato ($\mu\text{l/ml}$) *	Mortalidad de plántulas (%) #					
	Aislados de <i>Phytophthora cinnamomi</i>					
	CA-4		CA-9		MYC-18	
0	100	a	100	a	100	a
30	100	a	100	a	90	a
62.5	100	a	100	a	90	a
125	90	a	100	a	100	a
250	50	ab	30	b	10	b
500	0	b	0	b	0	b
WT	0	b	0	b	0	b
ED50 ($\mu\text{l/ml}$)	234,1		238,1		165,5	

* Dosis de hidrolato en $\mu\text{l/ml}$ por tubo de 5 mls; WT: Tratamiento con agua; ED50: dosis efectiva 50 (análisis logit).

Los valores se expresan como porcentaje de plántulas muertas ($n=10$). Los valores seguidos de letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas (MLG seguido del de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0,05$)).

La longitud total de las plántulas se registró regularmente a lo largo de la fase 2 para estimar la progresión de la enfermedad en plántulas vivas, cuando se eliminó el efecto del hidrolato (Figura 30). De este modo, el modelo ajustado (MLM) para la longitud total de las plántulas mostró un efecto significativo en la interacción entre los tres factores analizados (dosis, tiempo y aislado) ($F_{36,561} = 1,533$; $P = 0,0186$). La gravedad de la enfermedad al inicio de la Fase 2, entendida como longitud de plántulas de *L. luteus*

supervivientes, fue el resultado de las interacciones planta-patógeno-hidrolato a lo largo de la Fase 1, en la que a su vez el hidrolato tuvo simultáneamente un efecto fungicida sobre el patógeno y un efecto fitotóxico sobre las plantas.

Al inicio de la Fase 2 (4^º día del experimento), las plántulas que habían sido expuestas a las dosis más altas de hidrolato (tratamientos 250 y 500 $\mu\text{l/ml}$) mostraron diferencias significativas en la longitud total en comparación con los controles (tratamientos 0 $\mu\text{l/ml}$ y WT) de los tres aislados ensayados. En este caso, el efecto fitotóxico del hidrolato fue muy evidente. Además, dado que ese efecto fue eliminado en la fase 2, las plántulas de estos tratamientos (250 y 500 $\mu\text{l/ml}$) pudieron desarrollarse, demostrando la actividad antifúngica del hidrolato al final del experimento. Sin embargo, sólo las plántulas inoculadas y expuestas a la dosis más alta de hidrolato (500 $\mu\text{l/ml}$) mostraron una longitud total comparable a la del control de agua no inoculado (tratamiento WT) al final del experimento (Figura 30).

Por último, las plántulas inoculadas con el aislado MYC-18 mostraron la mayor longitud total y alcanzaron mayor longitud al comienzo de la fase 2 (cuarto día del experimento) que las inoculadas con CA-9 (estimate = - 0,36; t = - 1,89; P = 0,084) y con CA-4 (estimate = - 0,27; t = - 31,42; P < 0,001). Estas diferencias están asociadas a las diferencias de patogenicidad entre aislados, lo que podría haber influido en el resultado final del experimento.

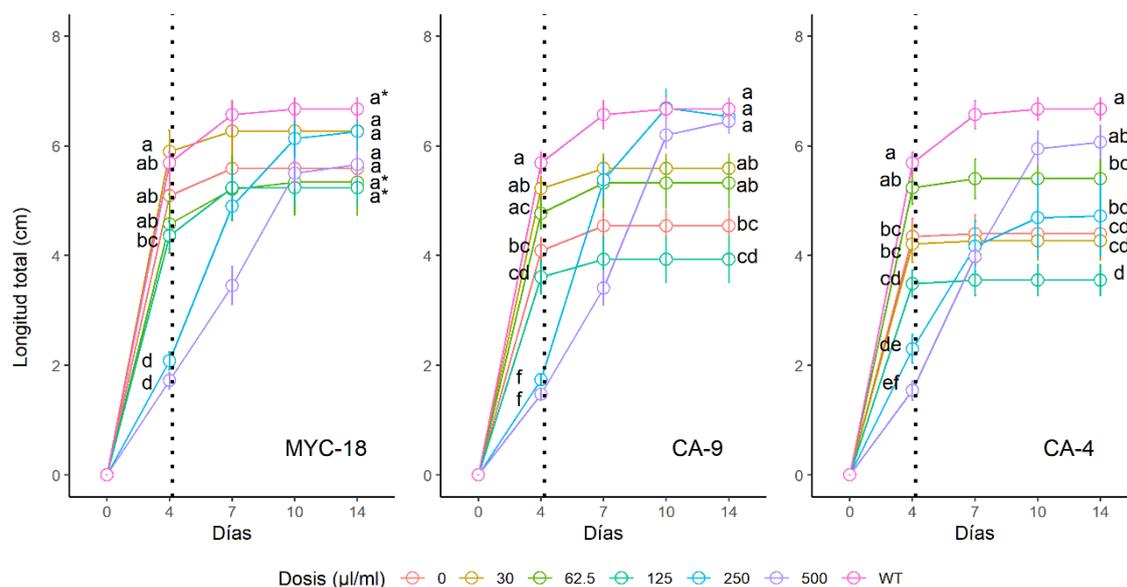


Figura 30. Longitud total (cm) de plántulas de altramuz (*L. luteus*) inoculadas con *P. cinnamomi* y tratadas con diferentes dosis de hidrolato (%; v/v en agua) y medidas durante 14 días. WT: control de agua sin inoculación y sin tratar con hidrolato. Las líneas discontinuas separan cada una de las dos fases (Fase 1 y Fase 2). Los valores se expresan como medias \pm desviaciones estándar ($n = [1-10]$). Para cada aislado, las letras diferentes al final de cada fase indican diferencias estadísticamente significativas (MLM seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0,05$)).

3.6. Efecto fitotóxico del hidrolato en semillas de *R. sativus* y *L. luteus*

El efecto del hidrolato sobre el índice de germinación de las semillas de *L. luteus* y *R. sativus* se presenta en la Figura 31. El ANOVA de dos vías para el índice de germinación de las semillas mostró interacciones significativas entre los factores dosis y especie ($F_{4,88} = 3,980$; $P < 0,001$). A su vez, los valores del índice de germinación de *L. luteus* fueron significativamente mayores que los de *R. sativus* (estimate = 0,484; $t = 11,49$; $P < 0,001$), lo que indica una mayor tolerancia de *L. luteus* al tratamiento con hidrolato. Además, un aumento de la concentración a partir del 12,5 % para *L. luteus* y del 6,25 % para *R. sativus*, dio lugar a una reducción gradual del índice de germinación, que fue además considerablemente más significativa ($P < 0,05$) en *R. sativus* que en *L. luteus*.

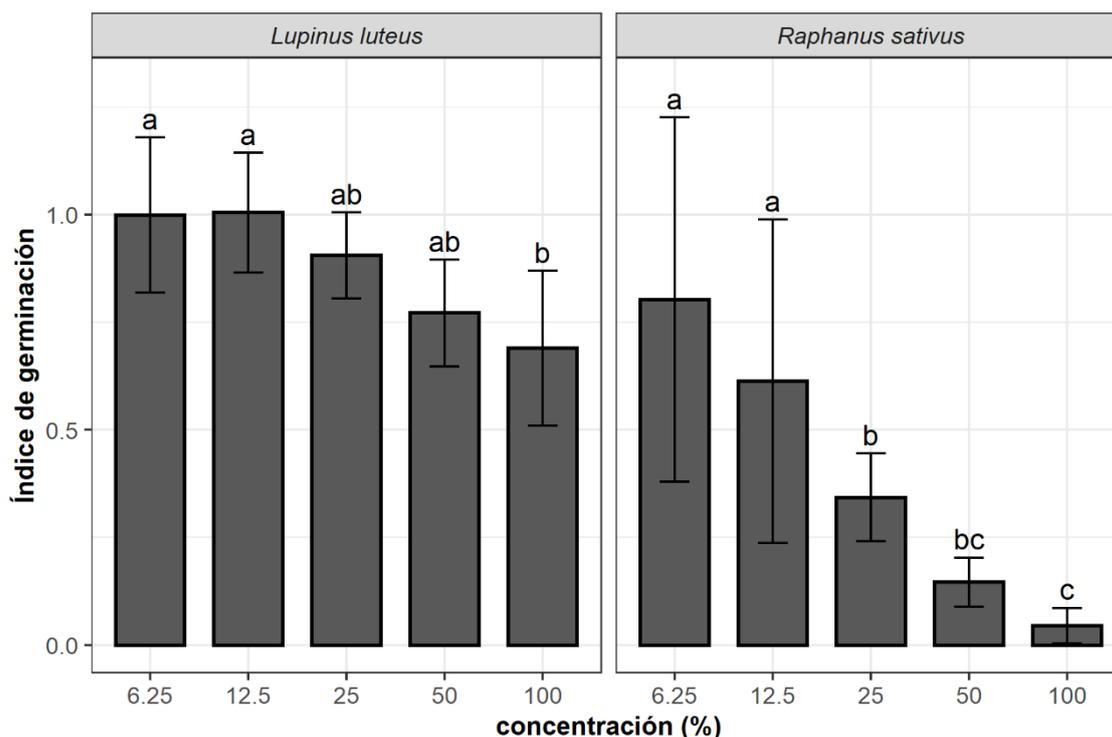


Figura 31. Actividad fitotóxica del hidrolato de *C. ladanifer* a diferentes concentraciones (%; v/v en agua) sobre el índice de germinación de las semillas de rabanito (*R. sativus*) y altramuz (*L. luteus*). Los valores se expresan como medias \pm desviaciones estándar ($n=10$). Para cada especie, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0,05$)).

3.7. Efecto fitotóxico del hidrolato en plántulas de *L. luteus*

La longitud total de plántulas se estimó regularmente a lo largo de la Fase 2 para evaluar el desarrollo de la planta cuando se eliminó el efecto del hidrolato (Figura 32). En general, la longitud total se redujo las concentraciones de hidrolato más elevadas, pero este efecto fue parcialmente reversible a lo largo de la Fase 2, cuando se retiró el hidrolato. Para los datos de longitud total de plántulas, el análisis estadístico (MLM) reveló una interacción significativa entre los factores concentración y tiempo ($F_{18,175} = 8,402$; $P < 0,001$). Al final de la Fase 1 (4º día del ensayo), cuando se retiró el hidrolato, las plántulas que habían sido expuestas a las mayores concentraciones de hidrolato (25, 50 y 100 %) mostraron una longitud significativamente menor que el control, mientras que las expuestas a las restantes dosis intermedias (3, 6,25 y 12,5 %) no diferían del control. Por su parte, al final de la Fase 2 (día 14 del ensayo), sólo se detectaron diferencias significativas en la longitud total de las plántulas entre la concentración del

Capítulo 7

100% y el control (tratamiento del 0%) (estimate = - 2,269; t = - 3,756; P = 0,0069). En esa fecha (14^º día del ensayo), las plántulas que habían sido expuestas a una concentración de hidrolato del 12,5% mostraron la mayor longitud total de todo el experimento, aunque no fue significativamente diferente del control (tratamiento del 0%) (estimate = - 1,452; t = - 2,378; P = 0,226).

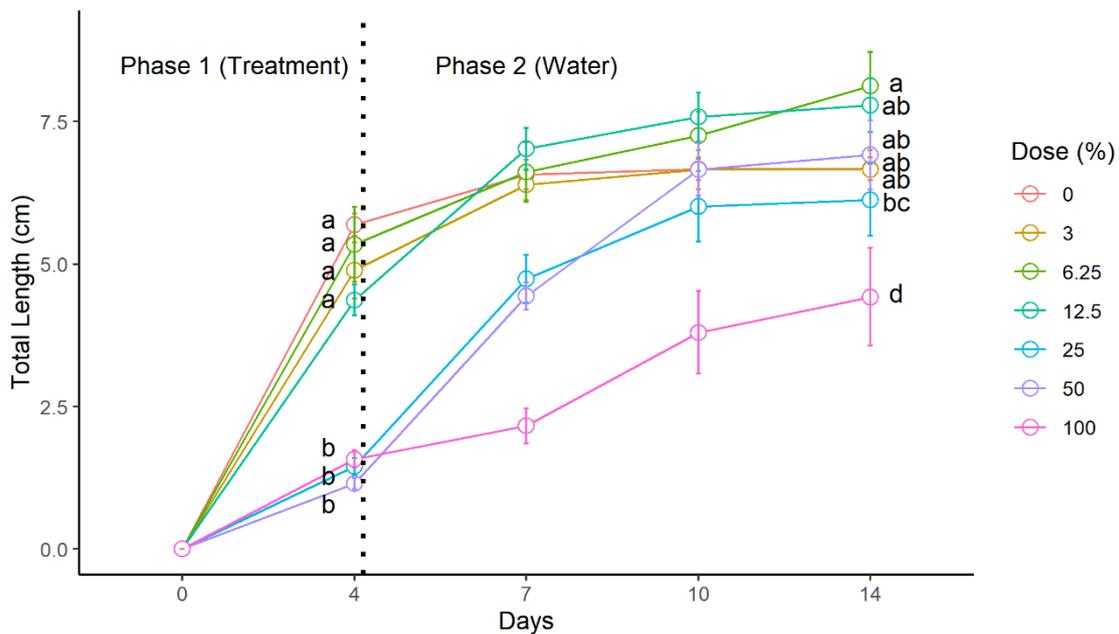


Figura 32. Longitud total (cm) de plántulas de altramuz (*L. luteus*) tratadas con diferentes concentraciones de hidrolato (%; v/v en agua) y medidas durante 14 días. Las líneas discontinuas separan cada una de las dos fases (Fase 1 y Fase 2). Los valores se expresan como medias \pm desviaciones estándar (n = [1-10]). Letras diferentes al final de cada fase indican diferencias estadísticamente significativas (MLM seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (P < 0,05)).

Además, el análisis (ANOVA) para número de raíces secundarias desarrolladas a lo largo del experimento indicó un efecto significativo en el factor tratamiento ($F_{6,50} = 7,275$; P < 0,001) (Figura 33). Sin embargo, las comparaciones entre grupos sólo detectaron diferencias significativas entre el tratamiento control y la concentración intermedia del 25 % (estimate = - 5,611; t = - 4,483; P < 0,001) y del 50 % (estimate = - 5,011; t = - 4,234; P < 0,01).

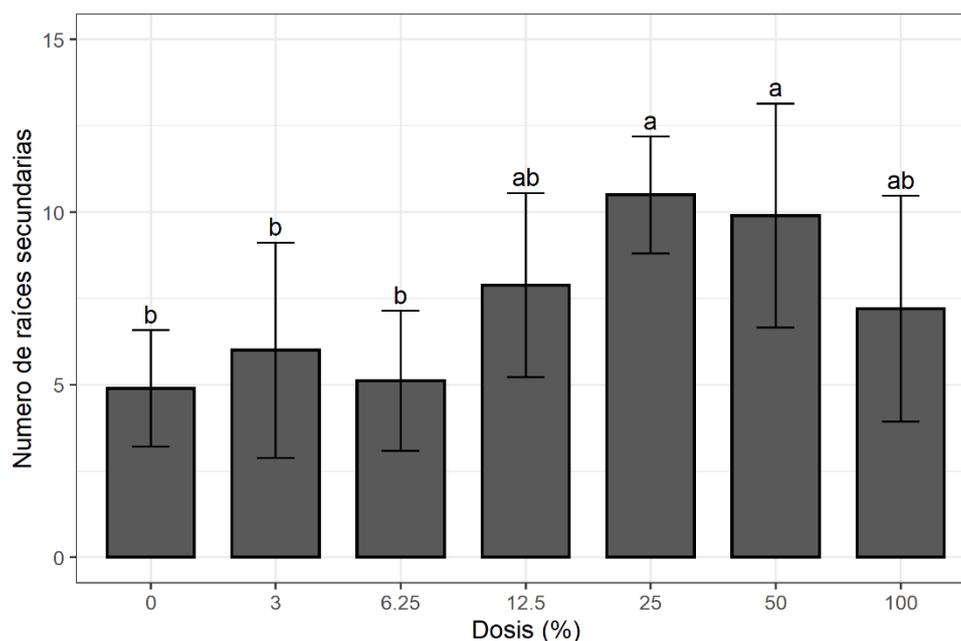


Figura 33. Número de raíces secundarias desarrolladas en plántulas de altramuz (*L. luteus*) tratadas con hidrolato a diferentes concentraciones (%; v/v en agua). Los valores se expresan como medias \pm desviaciones estándar (n=10). Letras diferentes al final de cada fase indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0,05$)).

4. DISCUSIÓN

4.1. Composición química del aceite esencial y el hidrolato

Varios estudios han determinado la composición química del aceite esencial de *C. ladanifer* obtenido de plantas recolectadas en diferentes zonas de España (Tavares et al., 2020; Verdeguer et al., 2012), así como de otros países como Portugal (Gomes et al., 2005), Francia (Robles et al., 2003) y Marruecos (Viuda-Martos et al., 2011). Comparando estos estudios previos, la composición del aceite esencial puede ser muy variable entre diferentes regiones. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Mariotti et al. (1997) en Francia, en los que los principales componentes del aceite esencial fueron también α -pineno, viridiflorol, ledol y acetato de bornilo. Estas diferencias en la composición del aceite esencial podrían estar probablemente relacionadas con factores geográficos, climáticos, fisiológicos y estacionales (Barra, 2009; Herraiz-Peñalver et al., 2013; M. J. Jordán et al., 2006), como ha sido ampliamente documentado en otras especies y en nuestros estudios anteriores. En el caso del hidrolato, los componentes volátiles identificados en este estudio fueron similares a los

Capítulo 7

descritos previamente por Tavares et al. (2020), que también encontraron hidrolatos ricos en monoterpenos oxigenados, y que a su vez, contenían trans-pinocarveol como componente mayoritario.

4.2. Efecto del aceite esencial en la inhibición del crecimiento micelial

En un estudio que evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial obtenido de *Thymus zygis*, *R. solani* también fue el aislado más sensible entre los 5 hongos fitopatógenos ensayados (*Pythium irregulare*, *R. solani*, *Colletotrichum acutatum*, *F. oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*) (Pérez-Sánchez et al., 2007). En contraposición a nuestros resultados, en un test con aceites esenciales de 40 especies de plantas, la mayoría de los aceites mostraron una actividad muy débil contra *C. parasitica*, excepto el aceite esencial de pachuli (*Pogostemon patchouli*), que tuvo un efecto de inhibición moderado del 51% (Lee et al., 2009). Lukovic et al. (2019) reportaron el efecto de 15 aceites esenciales sobre la inhibición del crecimiento micelial en dos aislados de *C. parasitica*, y 7 de ellos (menta, eucalipto, pino negro, salvia, abeto y cade) mostraron efectos fungicidas sobre el patógeno. Además, en ensayos con varios aceites esenciales y especies de *Fusarium*, se han encontrado diferentes susceptibilidades entre especies y tipos de aceites esenciales utilizados (Houicher et al., 2016; Sharma et al., 2017; Stević et al., 2014). De acuerdo con nuestros resultados, no se alcanzaron dosis fungitóxicas para *Fusarium* utilizando aceites de eucalipto y clavo (Byron & Hall, 2002). Por último, se han descrito también variaciones en la susceptibilidad a los aceites esenciales de diferentes especies de plantas en el caso de *P. cinnamomi* (Giamperi et al., 2002).

Dado que los aceites esenciales son mezclas complejas, la actividad antifúngica suele ser el resultado del efecto sinérgico de muchos compuestos y no puede atribuirse a un único componente (Daferera et al., 2003; Stević et al., 2014; Thomidis & Filotheou, 2016). Se ha propuesto que la naturaleza lipofílica de los aceites esenciales facilita la penetración en la bicapa lipídica de la membrana del hongo y causa su disrupción (Bakkali et al., 2008; Nazzaro et al., 2017). Sin embargo, se ha destacado una fuerte relación entre los efectos antimicrobianos de los aceites esenciales y sus componentes principales (Dorman & Deans, 2000; Elshafie et al., 2019; Tabet Zatla et al., 2017). En nuestro estudio por tanto, la actividad antifúngica del aceite esencial de *C. ladanifer*

podría estar relacionada con la presencia de un alto porcentaje de sesquiterpenos oxigenados, como el viridiflorol y el ledol, y también con un alto contenido del monoterpeno α -pineno. Estos resultados son coherentes con los descritos por Greche et al. (2009), que también encontraron una efectiva actividad antifúngica contra varios hongos patógenos empleando un aceite esencial de *C. ladanifer* rico en sesquiterpenos oxigenados (viridiflorol y ledol principalmente). Del mismo modo, Houicher et al. (2016) demostraron que el aceite esencial de *Artemisia campestris* con alta concentración de α -pineno, tenía actividad antifúngica contra algunos hongos filamentosos (entre ellos, *Fusarium* spp.).

4.3. Efecto fitotóxico del aceite esencial en las semillas de *R. sativus* y *L. luteus*

Estudios previos han mostrado el efecto fitotóxico de los aceites esenciales sobre diferentes semillas de malas hierbas y cultivos (Boukaew et al., 2017; Jouini et al., 2020; Mahdavia & Saharkhiz, 2015; Uremis et al., 2009). Este efecto negativo de los aceites esenciales sobre la germinación está relacionado con la presencia de compuestos aleloquímicos, que pueden producir cambios fisiológicos al alterar el funcionamiento de las membranas celulares o inhibir la síntesis de ADN y ARN (Abd El-Gawad, 2016; Benchaa et al., 2019; Tworkoski, 2002). Nuestros resultados mostraron un efecto fitotóxico significativo a altas dosis de aceite esencial en las semillas de *R. sativus*, mientras que el efecto fue mínimo en las semillas de *L. luteus*. Estos resultados coinciden con los descritos por De Almeida et al. (2010), que también encontraron un efecto fitotóxico dosis-dependiente de diferentes aceites esenciales de plantas aromáticas mediterráneas sobre las semillas de *R. sativus*. Se han descrito potentes efectos fitotóxicos del aceite esencial de *C. ladanifer* sobre tomate (Benali et al., 2020) y malas hierbas (Verdeguer et al., 2012). Por tanto, todas estas observaciones sugieren que es necesario evaluar el potencial efecto fitotóxico del aceite esencial de *C. ladanifer* en especies de cultivo específicas antes de utilizarlo como biofungicida en dichos cultivos.

Capítulo 7

4.4. Efecto del hidrolato en la inhibición del crecimiento micelial

A pesar de las diferencias en la composición química encontradas entre el aceite esencial y el hidrolato, la ordenación según la susceptibilidad de las cuatro especies testadas fue similar para los dos productos. Aunque no hay estudios previos que aborden el efecto antifúngico del hidrolato de *C. ladanifer*, varios autores han demostrado la eficacia de algunos hidrolatos de distintas especies vegetales contra varios hongos fitopatógenos (Boyras & Özcan, 2006; Tabet Zatlá et al., 2017). Los efectos observados en el presente estudio pueden estar asociados a un alto contenido de monoterpenos oxigenados como el trans-pinocarveol, pinocarvona y el acetato de bornilo. Zatlá et al. (2020) encontraron que el hidrolato de *Marrabium vulgare* con monoterpenos oxigenados como componentes principales mostraba una elevada actividad antifúngica sobre *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*. De forma similar, el efecto del hidrolato de *Ocimum basilicum*, *Cuminum cyminum*, *Echinophora tenuifolia*, *Rosmarinus officinalis* y *Satureja hortensis* contra diferentes especies de hongos (incluyendo *F. oxysporum* y *R. solani*) fue descrito por Boyras & Özcan (2005), quienes observaron resultados similares a los descritos en este estudio. Su actividad antagonista parece deberse a la composición química, que puede interferir con la membrana plasmática, la pared celular o la acción de las enzimas microbianas (D'Amato et al., 2018).

4.5. Efecto *in situ* del hidrolato sobre el patosistema *P. cinnamomi*-*L. luteus*

Nuestros resultados mostraron que en el patosistema experimental con plántulas de *L. luteus*, la aplicación hidrolato de *C. ladanifer* a altas dosis tuvo un fuerte efecto antifúngico sobre *P. cinnamomi*. De forma similar, Bowers & Locke (2004) también encontraron que altas dosis de algunos aceites esenciales y extractos de plantas suprimían el desarrollo de la enfermedad causada por *P. nicotianae* en plántulas de *Vinca minor* bajo condiciones de invernadero. En otro experimento en invernadero con *P. capsici* sobre plántulas de calabacín, Bi et al. (2012) encontraron que la aplicación de aceite esencial de orégano y tomillo rojo en el suelo redujo casi totalmente la gravedad de la enfermedad causada por el patógeno. Por lo tanto, varios estudios han evaluado

la eficacia de los aceites esenciales para el control de enfermedades causadas por *Phytophthora spp. in vivo*. Sin embargo, hasta donde sabemos, no hay estudios anteriores que evalúen la eficacia de los hidrolatos en el control de la enfermedad en plántulas.

4.6. Efecto fitotóxico del hidrolato en semillas de *R. sativus* y *L. luteus*

En contraste con los numerosos estudios fitotóxicos encontrados con aceites esenciales, muy pocos trabajos han evaluado la actividad fitotóxica de los hidrolatos. Martino et al. (2010) reportaron el efecto fitotóxico de varios monoterpenos oxigenados individuales sobre la germinación y la elongación de la radícula de *R. sativus*. Además, varios autores han demostrado que los monoterpenos oxigenados inhiben el crecimiento de las raíces y la síntesis de ADN en el meristemo apical de *Brassica campestris* L. (Koitabashi et al., 1997; Nishida et al., 2005). Estos resultados sugieren que el intenso efecto fitotóxico encontrado en nuestros ensayos, especialmente en *R. sativus*, podría estar relacionado con la alta proporción de monoterpenos oxigenados encontrados en el hidrolato de *C. ladanifer*. De hecho, en consonancia con nuestros resultados, Politi et al. (2020) encontraron un fuerte efecto fitotóxico del hidrolato de lavandín (*Lavandula × intermedia* Emeric ex Loisel.), con una elevada proporción de linalol y 1,8-cineol, sobre la germinación de las semillas de *R. sativus*.

4.7. Efecto fitotóxico del hidrolato en plántulas de *L. luteus*

La reducción en la longitud de las plántulas que se observó durante la fase inicial de crecimiento en respuesta al tratamiento con hidrolato ha sido descrita previamente por algunos autores (Dias et al., 2009; Hamdi et al., 2017). En un experimento similar al nuestro, en el que se colocaron bulbos de cebolla sobre una solución de hidrolato de *Artemisia absinthium* L. y agua, Pino-Otín et al. (2019) encontraron un efecto negativo en el crecimiento de las raíces asociado a dosis crecientes de hidrolato. Además, el hidrolato ensayado en ese estudio también presentaba un monoterpeno oxigenado ((Z)-2,6-dimetilocta-5,7-dieno-2,3-diol) como componente principal. Por otro lado, Sourì & Bakhtiarizade (2019) encontraron que la aplicación foliar y al suelo de aceite esencial de

Capítulo 7

romero diluido en agua a baja concentración, indujo un efecto estimulante del crecimiento en plántulas de tomate, y este efecto fue significativamente mayor en las raíces que en la parte aérea de las plántulas. En esta línea, (Tena et al., 2021) observaron recientemente que tres componentes fenólicos presentes en la goma de ládano de *C. ladanifer* (p-cresol, 2-feniletanol y 3-fenil-1-propanol) a bajas concentraciones, en lugar de tener un efecto inhibitor, estimularon el crecimiento en longitud de los cotiledones de *Allium cepa* y *Lactuca sativa*. Los incrementos en el número de raíces secundarias observados en nuestro experimento con las concentraciones intermedias de hidrolato, están en línea con los resultados obtenidos por otros autores en experimentos realizados con otros compuestos orgánicos (Canellas et al., 2015; Sánchez-Sánchez et al., 2002). Estos estudios testaron el efecto estimulante de otras sustancias orgánicas, como los ácidos húmicos, que pueden inducir cambios en la arquitectura de las raíces, estimular el crecimiento de raíces laterales y aumentar el volumen y la longitud radicular.

En resumen, los productos de origen natural, como los aceites esenciales y el hidrolato, han despertado un gran interés en las estrategias de biocontrol contra patógenos de las plantas. El aceite esencial y el hidrolato de *C. ladanifer* mostraron un fuerte efecto antifúngico sobre las cuatro especies de hongos fitopatógenos y oomicetos testados *in vitro*. Además, la aplicación del hidrolato tuvo un alto efecto antifúngico contra *P. cinnamomi* en un experimento *in situ* utilizando plántulas de *L. luteus*. Por lo tanto, nuestros resultados muestran el gran potencial del hidrolato de *C. ladanifer* para la producción de biofungicidas que se podrían incluir en las nuevas estrategias ecológicas de Gestión Integrada de Plagas. Hasta donde sabemos, este trabajo ha reportado por primera vez la actividad antifúngica y fitotóxica del hidrolato de *C. ladanifer*. Sin embargo, se necesitan más experimentos para evaluar la eficacia del hidrolato en condiciones de campo y la potencial fitotoxicidad específica en los cultivos. El uso del hidrolato en la agricultura implicaría una revalorización del producto, que hasta ahora se considera un subproducto de las destilerías de aceites esenciales.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN GENERAL

1. DISCUSIÓN GENERAL

Los compuestos del metabolismo secundario de plantas, entre los que se encuentran los aceites esenciales, están presentes sólo en determinadas especies y no se consideran primordiales para el crecimiento y desarrollo vegetal (Croteau et al., 2000). Sin embargo, se ha demostrado que estos compuestos desempeñan un papel importante en las interacciones de estas plantas con el ambiente. En este aspecto, se han descrito funciones relacionadas con la defensa de la planta frente a microorganismos patógenos, insectos o herbívoros, la atracción de polinizadores y de animales dispersores de semillas, la regulación del uso de agua y con interacciones alelopáticas entre plantas (Maffei, 2010). A su vez, una reevaluación de las funciones biológicas de estos productos naturales, han derivado en importantes aplicaciones prácticas en el ámbito de la medicina, la nutrición o la cosmética (Edreva et al., 2008).

Generalmente, cuando se pretende aprovechar un producto de origen vegetal como el aceite esencial con fines industriales o comerciales, es fundamental asegurar su disponibilidad y homogeneidad como garantía de la calidad final de ese producto. Un aceite esencial es apropiado para un uso específico si posee una composición química concreta. Sin embargo, se ha descrito que la mayoría de aceites esenciales obtenidos de plantas presentan una gran variabilidad química en su composición, lo que dificulta la homogeneidad del producto final, y por consiguiente, limita la calidad, seguridad y eficacia de sus aplicaciones industriales o comerciales. Estas variaciones que afectan a la producción de aceites esenciales han sido asociadas principalmente con factores genéticos, geográficos, fisiológicos y ambientales (Barra, 2009; Zuzarte & Salgueiro, 2015). En este sentido, un mayor estudio y comprensión de estos factores que determinan la biosíntesis del aceite esencial, supone un avance que ayudaría a predecir, controlar e incluso modelar tanto el rendimiento como la composición química del producto final, y por tanto, mejoraría la calidad desde el punto de vista comercial.

Por otro lado, como se ha constatado en numerosos estudios, la composición química obtenida en los aceites esenciales puede llegar a ser extremadamente compleja, y sus propiedades por tanto, no suelen estar determinadas por un compuesto concreto, sino que es la proporción de todos ellos la que marcará la calidad final del producto. Por este motivo, en la gran mayoría de especies aromáticas y medicinales, el

Discusión general

producto final destinado al comercio es el aceite esencial, y no los compuestos individuales que lo componen. En nuestro caso, varios estudios han demostrado que la composición química del aceite esencial de *C. ladanifer* puede llegar a ser muy compleja, detectándose en algunos casos hasta 300 compuestos diferentes, de los cuales solo un pequeño grupo reducido se encuentran en proporciones significativas (Mariotti et al., 1997). Sin embargo, dada su importancia para la industria perfumera desde un punto de vista organoléptico, y aunque no exista una norma de calidad específica para el aceite esencial de *C. ladanifer*, algunos autores han establecido que aquellos aceites esenciales con mayor interés comercial deben presentar un alto contenido en los sesquiterpenos viridiflorol y ledol, y bajo en el monoterpeno α -pineno. Además, aunque se encuentran en menor proporción, otros compuestos como el 2-2-6-trimethylcyclohexano, ambrox, oxoisoambrox, sclareolóxido y 15-nor-labdan-8-ol son considerados también de gran importancia en el aceite, debido a su relación con el fuerte olor a ámbar característico de esta especie (Gomes et al., 2005; Weyerstahl et al., 1998).

Este contexto previo sentó las bases para desarrollar esta tesis doctoral, cuyo objetivo principal se centró en determinar qué grado de influencia ejercen aquellos factores tanto intrínsecos como extrínsecos a la planta sobre la producción de aceite esencial de *C. ladanifer*, con especial atención en aquellos compuestos de mayor importancia para la industria perfumera y cosmética.

1.1. Influencia del ambiente edafoclicático en poblaciones naturales

En la bibliografía es común encontrar grandes variaciones en el rendimiento y la composición química del aceite esencial de *C. ladanifer* en diferentes poblaciones naturales y orígenes geográficos distintos (Benali et al., 2020; Gomes et al., 2005; Robles et al., 2003; Verdeguer et al., 2012). De este modo, aunque los rendimientos en aceite esencial mostrados en este estudio variaron sustancialmente entre las diferentes localizaciones de recolección y tipos de suelo, se encontraban en rangos similares a los descritos por otros autores para esta especie (Benali et al., 2020; Gomes et al., 2005). De manera general, las poblaciones naturales del norte de Extremadura estudiadas en nuestro trabajo se han caracterizado por presentar un contenido elevado en viridiflorol y ledol, mientras que el compuesto α -pineno se encontró en menores proporciones. Así,

de las diferentes referencias encontradas en la literatura con alguno de estos tres compuestos como mayoritarios en el aceite esencial (El Karkouri et al., 2021; Mediavilla et al., 2021; Tavares et al., 2020), se deduce un marcado carácter antagonista entre los porcentajes por un lado de viridiflorol y ledol, y por otro, de α -pineno. Además, otros componentes destacados como el 2-2-6-trimethylcyclohexano y el 15-nor-labdan-8-ol se encontraron en proporciones relativamente importantes en el aceite esencial de las poblaciones estudiadas. Por lo tanto, estas características químicas y los rendimientos relativamente elevados demuestran el alto potencial productivo de esta especie en el norte de Extremadura para su aplicación por parte de la industria perfumera (Gomes et al., 2005).

En nuestro estudio sin embargo, se detectaron importantes variaciones en el rendimiento y la composición del aceite esencial entre las poblaciones estudiadas, y aunque en menor grado, también se observó cierta variabilidad dentro de ellas. Aunque estas variaciones podrían estar asociadas fuertemente con el componente genético de esta especie (Mariotti et al., 1997), el efecto del ambiente edafoclimático sobre el que se desarrolla un recurso también puede ejercer una fuerte influencia (Llorens et al., 2014; Mollaei et al., 2020; Palá-Paúl et al., 2008; Rahimmalek et al., 2013; Rapposelli et al., 2015; Ray et al., 2018). Para unas condiciones fisiológicas y climáticas constantes, nuestros resultados mostraron que parte de esta variabilidad estaba asociada con las condiciones edáficas imperantes en la zona de estudio. De este modo, aquellas zonas asentadas sobre granito, que de manera general presentaron suelos con un contenido más elevado en materia orgánica y CIC, mostraban también un mayor rendimiento en aceite esencial y una proporción más elevada en los monoterpenos α -Pineno, pinocarveol, pinocarvona y mirtenol, que a su vez, se han asociado negativamente con la calidad de este aceite (Oller-López et al., 2005). Por el contrario, los suelos asentados sobre pizarras, con unas características edáficas más pobres, favorecían la acumulación de aquellos compuestos más interesantes desde el punto de vista organoléptico, tales como el viridiflorol, ledol y 15-nor-labdan-8-ol (Gomes et al., 2005). Finalmente, aunque debido a las condiciones de estudio no se puede concluir que existan diferentes quimiotipos en las muestras, estos resultados pueden indicar que las poblaciones de los dos tipos de suelo podrían haber conformado dos ecotipos separados, debido a la presión adaptativa ejercida por las características edafológicas.

Discusión general

1.2. Influencia de factores ontogénicos de la planta

En muchas especies de interés comercial, los rendimientos y composición química en aceite esencial pueden sufrir cambios a lo largo de las diferentes etapas del ciclo de desarrollo de la planta (Franz & Novak, 2010). Este hecho puede llegar a ser un factor fundamental desde el punto de vista económico, ya que ayuda a determinar las condiciones y momentos óptimos para llevar a cabo la recolección (Figueiredo et al., 2008). Diferentes estudios en la bibliografía describen fluctuaciones en la biosíntesis de aceite esencial en relación al estado fenológico de distintas especies de plantas (Ben Farhat et al., 2019; Blanco Salas et al., 2012; Maria J. Jordán et al., 2013; Usano-Aleman et al., 2012), mientras que por otro lado, muy pocos estudios han analizado el factor edad (Hudaib et al., 2002; C. P. dos Santos et al., 2015). Los resultados obtenidos mostraron en nuestro caso que el efecto asociado al estado fenológico de la planta ejercía una mayor influencia sobre la producción de aceite esencial que aquel asociado a la edad. Así, la mayor biosíntesis de aceite esencial detectada en esta especie durante la fructificación, puede probablemente responder a diversas funciones biológicas descritas en los compuestos volátiles de las plantas, tales como protección y defensa de semillas (Maffei, 2010), respuesta frente a diversas situaciones de estrés (Figueiredo et al., 2008), o a efectos de inhibición de la germinación de otras semillas (Alías et al., 2020; Chaves & Escudero, 1997). En cuanto a la composición química, en este trabajo se identificaron cinco grupos de compuestos que covariaban simultáneamente en respuesta a los diferentes niveles de estado fenológico y edad. Concretamente, las rutas metabólicas descritas para estos grupos de compuestos son diferentes (Croteau et al., 2000), y por tanto, la activación de una ruta metabólica específica como respuesta a distintas funciones biológicas determinará la mayor o menor proporción de compuestos en el aceite esencial. Por un lado, dada su enorme variabilidad e importancia en relación con la calidad del aceite esencial, habría que destacar el grupo formado por los compuestos α -pineno, p-cimeno, pinocarveol y pinocarvona, que presentaron porcentajes considerablemente más elevados en fructificación, lo que corrobora las funciones de protección de semillas frente a patógenos y herbívoros, así como efectos alelopáticos atribuidos previamente por otros autores a estos compuestos (Langenheim,

1994; Maffei, 2010). Otro grupo que varió sustancialmente y que presenta un gran interés desde el punto de vista organoléptico fue el formado por los compuestos 2-2-6-trimethylcyclohexanona, 15-nor-labdan-8-ol y 16-kaureno, que presentaban sus mayores porcentajes en plantas jóvenes durante la floración, y que muy probablemente, pueda responder a funciones de señalización, defensa y crecimiento en la planta (Demetzos & Dimas, 2001; Salazar-Cerezo et al., 2018; Serra, 2015). Además, otro compuesto relevante en el aceite esencial como el viridiflorol, no vio sustancialmente modificada su proporción en respuesta al estado de desarrollo de la planta. Por tanto, aunque durante el periodo de floración, y concretamente las plantas jóvenes, mostraron una composición química más interesante desde el punto de vista comercial (Gomes et al., 2005), su bajo rendimiento en aceite esencial en comparación con las plantas adultas, y en especial con el periodo de fructificación, podrían hacer inviable su explotación.

Por otro lado, en aquellas especies en las cuales los porcentajes de ciertos compuestos representativos varíen considerablemente con respecto a distintas partes de la planta utilizada, es probable que la calidad del aceite esencial resultante también se altere en función de la proporción que tenga cada una de estas partes en la muestra. De este modo, se ha encontrado que mientras los tallos y hojas ven modificada su composición química cuantitativamente, las flores, además, lo hacen cualitativamente (Heil, 2008). De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro estudio, las hojas presentan un mayor rendimiento en aceite esencial que los tallos (Yuan et al., 2016), pero también una proporción significativamente mayor de α -pineno y menor de viridiflorol, ledol y 15-nor-labdan-8-ol. En este sentido por tanto, favorecer una mayor proporción de hojas en la muestra garantizará mayores producciones de aceite esencial, pero este aumento irá en detrimento de la calidad final del producto.

1.3. Influencia del aporte de agua y nutrientes a la producción de aceite esencial

Las diferentes situaciones de estrés causadas por patógenos, herbívoros, daños tisulares o factores abióticos, pueden inducir la síntesis de compuestos orgánicos volátiles (Heil, 2008), y por tanto, influir considerablemente en la producción de aceite esencial. En este sentido, algunos autores han mostrado que factores de estrés abióticos tales como la sequía o el déficit de nutrientes en el suelo (Aghaei et al., 2019;

Discusión general

Bahreinejad et al., 2014; Bettaieb et al., 2009; Marino et al., 2019), pueden afectar en gran medida tanto a parámetros de crecimiento de la planta, como al rendimiento y la composición química de los aceites esenciales. En las zonas donde se asienta nuestra especie de estudio, las plantas durante el verano se ven sometidas a condiciones de sequía severa y alta exposición solar, y además, los suelos se caracterizan por su escasez de nutrientes y alta degradación (Frazão et al., 2018). En este contexto, nuestros resultados muestran que mientras que el aporte de riego modifica considerablemente la biomasa de la planta y su biosíntesis de aceite esencial (Babaei et al., 2021), el aporte de fertilización no tiene un efecto sustancial sobre estas variables (Teles et al., 2014). Concretamente, el aporte de riego durante el verano incrementa principalmente la biomasa foliar de la planta y, por consiguiente, el rendimiento en aceite esencial. En condiciones de déficit hídrico, se ha encontrado que la biomasa de la parte aérea de las plantas destinadas a la producción de aceite esencial disminuye (Babaei et al., 2021; Bahreinejad et al., 2014), debido por un lado a la asignación preferente de la mayoría de los recursos a la producción de biomasa radicular (García-Caparrós et al., 2019), y por otro, a una reducción de la eficiencia fotosintética tras el descenso del contenido en clorofila (Bettaieb et al., 2009). En este sentido, como se ha demostrado previamente, las hojas presentan un mayor contenido en aceite esencial que los tallos, y por tanto, este aumento de la biomasa foliar detectado tras el riego (Tabrizi et al., 2011), altera la proporción de ambos órganos en la muestra y explica parte del aumento en el rendimiento en aceite esencial encontrado.

Sin embargo, a pesar de este aumento en el rendimiento de aceite y la biomasa de la planta, el aporte de agua afectó negativamente a la calidad del aceite, en el sentido en que por un lado aumenta significativamente la síntesis de monoterpenos como el α -pineno, y por otro, disminuye la de otros compuestos importantes como el viridiflorol, ledol, 2-2-6-trimethylcyclohexano y 15-nor-labdan-8-ol (Babaei et al., 2021), como repuesta a diferentes volatilidades de los compuestos asociadas a su peso molecular y que altera sus ratios en el aceite (Gil et al., 2007). Como ya hemos observado, además, las hojas en comparación con los tallos presentan un mayor porcentaje de α -pineno y menor de viridiflorol, ledol, 2-2-6-trimethylcyclohexano y 15-nor-labdan-8-ol, por lo que el aumento de biomasa foliar tras el riego explica parte de estas fluctuaciones detectadas en la composición química.

Asimismo, con la disminución del estrés hídrico en octubre tras las primeras precipitaciones, una respuesta idéntica a la observada con el riego se muestra tanto en la biomasa de la planta, como en el rendimiento y composición química del aceite esencial, que se asocia con funciones ecológicas tales como protección y defensa de la planta, así como la producción de compuestos alelopáticos (Croteau et al., 2000).

1.4. Actividad biológica del aceite esencial

Finalmente, aunque productos derivados de *C. ladanifer* como el aceite esencial son destinados principalmente a la industria perfumera, otras aplicaciones asociadas con sus funciones biológicas tales como la capacidad antioxidante y la actividad antimicrobiana han sido recientemente demostradas (Benali et al., 2020; Greche et al., 2009; Tavares et al., 2020; Zidane et al., 2013). En este contexto, el aceite esencial de *C. ladanifer* y otros subproductos de la destilación, como el hidrolato, pueden ser empleados como biofungicidas alternativos a los productos químicos sintéticos. Como se ha demostrado en otras especies de plantas (Boyras & Özcan, 2006; Giamperi et al., 2002; Palfi et al., 2019; Tabet Zatla et al., 2017), el aceite esencial y el hidrolato de *C. ladanifer* inhibieron fuertemente el crecimiento micelial de tres hongos fitopatógenos (*F. oxysporum*, *R. solani* y *C. parasitica*) y un oomiceto (*P. cinnamomi*). Por primera vez además, se demostró cómo un subproducto de fácil aplicabilidad y gran disponibilidad como el hidrolato (D'Amato et al., 2018), resulta eficaz para controlar la enfermedad causada por *P. cinnamomi* sobre *L. luteus in situ*. Por tanto, estos resultados muestran el potencial del hidrolato de *C. ladanifer* como biofungicida en el control de hongos fitopatógenos, lo que implicaría una revalorización económica del subproducto. Sin embargo, el efecto fitotóxico dependiente de la dosis y de la especie mostrado por el hidrolato tanto de *C. ladanifer*, como de otras especies de plantas (Pino-Otín et al., 2019; Politi et al., 2020), implicaría estudios específicos adicionales en campo antes de su aplicación.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES GENERALES

1. Los aceites esenciales de poblaciones naturales de *C. ladanifer* en el norte de Extremadura se caracterizaron por presentar porcentajes elevados de componentes importantes desde el punto de vista organoléptico como viridiflorol y ledol, en comparación con el porcentaje de α -pineno. Además, otros componentes destacados como el 2-2-6-trimethylcyclohexano y el 15-nor-labdan-8-ol se encontraron en proporciones relativamente importantes en el aceite.
2. La composición química de todos los aceites esenciales de *C. ladanifer* en el norte de Extremadura no presentó diferencias cualitativas pero si cuantitativas.
3. Las poblaciones naturales mostraron variabilidad inter e intrapoblacional en el rendimiento y la composición química del aceite esencial. Esta variabilidad se asoció por un lado con las características edáficas de cada tipo de suelo, y por otro, con el efecto genético.
4. El contenido en materia orgánica se relacionó positivamente con la biosíntesis de aceite esencial, pero a su vez, esta variable favorecía también la acumulación de compuestos menos interesantes como α -pineno y sus derivados pinocarveol y pinocarvona.
5. El estado fenológico de la planta tuvo un mayor efecto sobre el rendimiento y la composición química del aceite esencial que la edad. Así, el rendimiento en aceite esencial aumenta considerablemente durante el periodo de fructificación, pero de nuevo, este incremento en la biosíntesis fue acompañado de una mayor acumulación de α -Pineno, pinocarveol y pinocarvona.
6. Las hojas presentaban un mayor rendimiento en aceite esencial que los tallos. Sin embargo, los tallos acumulaban un porcentaje significativamente mayor de compuestos interesantes tales como viridiflorol, ledol y 15-nor-labdan-8-ol.
7. La disminución del estrés hídrico tras el aporte de riego aumentó tanto la biomasa de la planta como el rendimiento en aceite esencial. Además, el aporte de riego incrementó considerablemente el porcentaje de α -pineno en detrimento del viridiflorol.
8. La aplicación de fertilización orgánica parece no tener efectos significativos sobre la producción de aceite esencial. Sin embargo, algunas condiciones relacionadas con

Conclusiones generales

- diseño experimental, tales como dosis insuficiente, poca incorporación al suelo o liberación lenta del fertilizante, podrían explicar la ausencia de efecto en este factor.
9. Los dos métodos de secado del material vegetal previo a la destilación empleados resultaron eficaces, pero su efecto sobre la composición química del aceite esencial difería considerablemente. Por tanto, la elección del método de secado dependerá por un lado del destino final de los constituyentes de interés, y por otro, de factores asociados al proceso productivo como costes, consumo de energía y tiempo de secado.
 10. El aceite esencial y el hidrolato de *C. ladanifer* mostraron un fuerte efecto antifúngico sobre las cuatro especies de hongos fitopatógenos y oomicetos testados *in vitro*.
 11. La aplicación de hidrolato controló eficazmente la enfermedad causada por *P. cinnamomi* en un patosistema experimental *in situ* utilizando plántulas de *L. luteus*.
 12. El aceite esencial y el hidrolato mostraron efecto fitotóxico en semillas de *R. sativus* y *L. luteus*. Sin embargo, la magnitud de este efecto dependía de la dosis aplicada y de la especie ensayada. Además, el hidrolato también mostró efecto fitotóxico dosis dependiente en plántulas de *L. luteus* en condiciones *in situ*.
 13. Con los resultados aportados en esta memoria, se puede concluir que los aceites esenciales de la especie *C. ladanifer* en Extremadura presenta un elevado potencial para la aplicación en diversos sectores industriales, con especial atención en sus características organolépticas para perfumería y cosmética, así como su posible utilización como biofungicida.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Gawad, A. M. (2016). Chemical constituents, antioxidant and potential allelopathic effect of the essential oil from the aerial parts of *Cullen plicata*. *Industrial Crops and Products*, *80*, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.054>
- Abdi, G., Shokrpour, M., & Salami, S. A. (2019). Essential Oil Composition at Different Plant Growth Development of Peppermint (*Mentha x piperita* L.) Under Water Deficit Stress. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *22*(2), 431–440. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1581095>
- Abu-Orabi, S. T., Al-Qudah, M. A., Saleh, N. R., Bataineh, T. T., Obeidat, S. M., Al-Sheraideh, M. S., Al-Jaber, H. I., Tashtoush, H. I., & Lahham, J. N. (2020). Antioxidant activity of crude extracts and essential oils from flower buds and leaves of *Cistus creticus* and *Cistus salviifolius*. *Arabian Journal of Chemistry*, *13*(7), 6256–6266. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.05.043>
- Aćimović, M., Tešević, V., Smiljanić, K., Cvetković, M., Stanković, J., Kiproviski, B., & Sikora, V. (2020). Hydrolates: By-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses. *Advanced Technologies*, *9*(2), 54–70. <https://doi.org/10.5937/savteh2002054A>
- Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition*.
- Aghaei, K., Ghasemi Pirbalouti, A., Mousavi, A., Badi, H. N., & Mehnatkesh, A. (2019). Effects of foliar spraying of L-phenylalanine and application of bio-fertilizers on growth, yield, and essential oil of hyssop [*Hyssopus officinalis* l. subsp. *angustifolius* (Bieb.)]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *21*(August), 101318. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101318>
- Al-Reza, S. M., Rahman, A., Ahmed, Y., & Kang, S. C. (2010). Inhibition of plant pathogens in vitro and in vivo with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *96*(2), 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.09.005>
- Alboukadel Kassambara (2020). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.4.0.
- Alboukadel Kassambara and Fabian Mundt (2020). factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7.
- Aldana, C., Revilla, M., Gonzales, J., Saavedra, Y., Moncada, W., & Maicelo, J. (2020). Relación de firmas espectrales para la identificación de bosque seco en imágenes de satélite Sentinel 2, cuenca baja del río Chira, Región Piura. *Revista de Teledetección*, *56*, 147.

- <https://doi.org/10.4995/raet.2020.14110>
- Alías, J. C., Caro, J. G., Campos, V. H., & Lobón, N. C. (2020). Effect of Leaf Litter from *Cistus ladanifer* L. on the Germination and Growth of Accompanying Shrubland Species. *Plants*, 9(5), 593. <https://doi.org/10.3390/plants9050593>
- Alves-Ferreira, J., Duarte, L. C., Lourenço, A., Roseiro, L. B., Fernandes, M. C., Pereira, H., & Carvalheiro, F. (2019). Distillery Residues from *Cistus ladanifer* (Rockrose) as Feedstock for the Production of Added-Value Phenolic Compounds and Hemicellulosic Oligosaccharides. *BioEnergy Research*, 12(2), 347–358. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-09975-8>
- Alves-Ferreira, J., Miranda, I., Duarte, L. C., Roseiro, L. B., Lourenço, A., Quilhó, T., Cardoso, S., Fernandes, M. C., Carvalheiro, F., & Pereira, H. (2020). *Cistus ladanifer* as a source of chemicals: structural and chemical characterization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 10(2), 325–337. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00448-8>
- Angelopoulou, D., Demetzos, C., & Perdetzoglou, D. (2001). An interpopulation study of the essential oils of *Cistus parviflorus* L. growing in Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(4), 405–415. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(00\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(00)00071-5)
- Asekun, O. T., Grierson, D. S., & Afolayan, A. J. (2007). Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. *Food Chemistry*, 101(3), 995–998. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.052>
- Asl Roosta, R., Moghaddasi, R., & Hosseini, S. S. (2017). Export target markets of medicinal and aromatic plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 7(July), 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.06.003>
- Babaei, K., Moghaddam, M., Farhadi, N., & Ghasemi Pirbalouti, A. (2021). Morphological, physiological and phytochemical responses of *Mexican marigold* (*Tagetes minuta* L.) to drought stress. *Scientia Horticulturae*, 284(February), 110116. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110116>
- Babushok, V. I., Linstrom, P. J., & Zenkevich, I. G. (2011). Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(4), 043101. <https://doi.org/10.1063/1.3653552>
- Baghalian, K., Abdoshah, S., Khalighi-Sigaroodi, F., & Paknejad, F. (2011). Physiological and phytochemical response to drought stress of German chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(2), 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.11.010>
- Bahreininejad, B., Razmjoo, J., & Mirza, M. (2014). Effect of Water Stress on Productivity and Essential Oil Content and Composition of *Thymus carmanicus*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(5), 717–725. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.901605>

Bibliografía

- Bajeli, J., Tripathi, S., Kumar, A., Tripathi, A., & Upadhyay, R. K. (2016). Organic manures a convincing source for quality production of Japanese mint (*Mentha arvensis* L.). *Industrial Crops and Products*, *83*, 603–606. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.064>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Barbieri, C., & Borsotto, P. (2018). Essential Oils: Market and Legislation. *Potential of Essential Oils, January*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77725>
- Barra, A. (2009). Factors Affecting Chemical Variability of Essential Oils: A Review of Recent Developments. *Natural Product Communications*, *4*(8), 1934578X0900400. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400827>
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Saura, D., Guillén, E., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., & Micol, V. (2010). Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(8–9), 2273–2282. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.060>
- Barrajón-Catalán, E., Tomás-Menor, L., Morales-Soto, A., Bruñá, N. M., López, D. S., Segura-Carretero, A., & Micol, V. (2016). Rockroses (*Cistus* sp.) Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 649–658). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00074-2>
- BCC Research report, 2017. Botanical and Plant-derived Drugs: Global Markets. Report Buyer. (Acceso diciembre 2020). <https://www.reportbuyer.com>.
- Ben Farhat, M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2019). *Salvia verbenaca* L. essential oil: Variation of yield and composition according to collection site and phenophase. *Biochemical Systematics and Ecology*, *82*(September 2018), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.12.002>
- Benali, T., Bouyahya, A., Habbadi, K., Zengin, G., Khabbach, A., Achbani, E. H., & Hammani, K. (2020). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Cistus ladaniferus* subsp. *ladanifer* and *Mentha suaveolens* against phytopathogenic bacteria and their ecofriendly management of phytopathogenic bacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *28*(February), 101696. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101696>
- Benchaa, S., Hazzit, M., Zermane, N., & Abdelkrim, H. (2019). Chemical composition and herbicidal activity of essential oils from two Labiatae species from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, *31*(4), 335–346. <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1567400>

- Bertin, N., & Staudt, M. (1996). Effect of water stress on monoterpene emissions from young potted holm oak (*Quercus ilex* L.) trees. *Oecologia*, 107(4), 456–462. <https://doi.org/10.1007/BF00333935>
- Bettaieb, I., Zakhama, N., Wannas, W. A., Kchouk, M. E., & Marzouk, B. (2009). Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Scientia Horticulturae*, 120(2), 271–275. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.10.016>
- Bettaieb Rebey, I., Jabri-Karoui, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F., & Marzouk, B. (2012). Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.09.013>
- Bi, Y., Jiang, H., Hausbeck, M. K., & Hao, J. J. (2012). Inhibitory Effects of Essential Oils for Controlling *Phytophthora capsici*. *Plant Disease*, 96(6), 797–803. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0933>
- Blanco Salas, J., Ruiz Téllez, T., Vázquez Pardo, F. M., Cases Capdevila, M. A., Pérez-Alonso, M. J., & Gervasini Rodríguez, C. (2012). Short communication. Influence of phenological stage on the antioxidant activity of *Thymus zygis* s. l. essential oil. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10(2), 461. <https://doi.org/10.5424/sjar/2012102-640-11>
- Borcard, D., Gillet, F., & Legendre, P. (2011). Numerical Ecology with R. In *Numerical Ecology with R*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7976-6>
- Boukaew, S., Prasertsan, P., & Sattayasamitsathit, S. (2017). Evaluation of antifungal activity of essential oils against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and their allelopathic activity from fumigation to protect maize seeds during storage. *Industrial Crops and Products*, 97, 558–566. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.005>
- Bowers, J. H., & Locke, J. C. (2004). Effect of Formulated Plant Extracts and Oils on Population Density of *Phytophthora nicotianae* in Soil and Control of *Phytophthora Blight* in the Greenhouse. *Plant Disease*, 88(1), 11–16. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.1.11>
- Boyras, N., & Özcan, M. (2005). Antifungal effect of some spice hydrosols. *Fitoterapia*, 76(7–8), 661–665. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.08.016>
- Boyras, N., & Özcan, M. (2006). Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 107(3), 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.002>
- Bolaños MM, López EG (1949) Jarales y jaras (Cistografía hispánica). Ediciones Ares, Madrid.
- Braga, N. P., Cremasco, M. A., & Valle, R. C. C. R. (2005). The effects of fixed-bed drying on the yield and composition of essential oil from long pepper (*Piper hispidinervium* C. DC) leaves.

Bibliografía

- Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22(2), 257–262. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322005000200013>
- Buchailot, A., Caffin, N., & Bhandari, B. (2009). Drying of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaves: Retention of volatiles and color. *Drying Technology*, 27(3), 445–450. <https://doi.org/10.1080/07373930802683740>
- Burducea, M., Zheljzakov, V. D., Dincheva, I., Lobiuc, A., Teliban, G.-C., Stoleru, V., & Zamfirache, M.-M. (2018). Fertilization modifies the essential oil and physiology of basil varieties. *Industrial Crops and Products*, 121(March), 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.021>
- Byron, E. M., & Hall, A. M. (2002). Inhibition of common cereal pathogenic fungi by clove oil and eucalyptus oil. *The BCPC Conference: Pests and Diseases, Volumes 1 and 2. Proceedings of an International Conference Held at the Brighton Hilton Metropole Hotel, Brighton, UK, 18-21 November*, 765–768.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Jones, D. L., Nebbioso, A., Mazzei, P., & Piccolo, A. (2015). Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>
- Carballo, T., Gil, M. V., Calvo, L. F., & Morán, A. (2009). The Influence of Aeration System, Temperature and Compost Origin on the Phytotoxicity of Compost Tea. *Compost Science and Utilization*, 17(2), 127–139. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2009.10702411>
- Carter T. Butts (2018). yacca: Yet Another Canonical Correlation Analysis Package. R package version 1.1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=yacca>
- Chai, Q., Gan, Y., Zhao, C., Xu, H.-L., Waskom, R. M., Niu, Y., & Siddique, K. H. M. (2016). Regulated deficit irrigation for crop production under drought stress. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 36(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0338-6>
- Chakroun, H., Mouillot, F., & Hamdi, A. (2015). Regional equivalent water thickness modeling from remote sensing across a tree cover/LAI gradient in mediterranean forests of Northern Tunisia. *Remote Sensing*, 7(2), 1937–1961. <https://doi.org/10.3390/rs70201937>
- Chaves, N., & Escudero, J. C. (1997). Allelopathic effect of *Cistus ladanifer* on seed germination. *Functional Ecology*, 11(4), 432–440. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1997.00107.x>
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2012). Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture*, 2(3), 228–243. <https://doi.org/10.3390/agriculture2030228>
- Clevenger, J. F. (1928). Apparatus for the Determination of Volatile Oil*. *The Journal of the American Pharmaceutical Association (1912)*, 17(4), 345–349. <https://doi.org/10.1002/jps.3080170407>

- Corell, M., Castillo García, M., & Cermeño, P. (2009). Effect of the deficit watering in the production and quality of the essential oil, in the cultivation of *salvia officinalis* L. *Acta Horticulturae*, 826(826), 281–288. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.826.39>
- Costa, R., De Fina, M. R., Valentino, M. R., Crupi, M. L., & Mondello, L. (2009). Application of a new GC-MS library, designed with a retention index filter tool, to the analysis of the essential oil of *Cistus ladanifer*. *Acta Horticulturae*, 826, 271–276. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.826.37>
- Council of Europe, 2010. 7th edn. European Pharmacopoeia Vol. 1. pp. 673–677 Strasbourg, France.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G., & others. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250–1319.
- D'Amato, S., Serio, A., López, C. C., & Paparella, A. (2018). Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control*, 86, 126–137. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2017.10.030>
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22(1), 39–44. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00095-9)
- Das, A. C., Noguchi, R., & Ahamed, T. (2021). An assessment of drought stress in tea estates using optical and thermal remote sensing. *Remote Sensing*, 13(14). <https://doi.org/10.3390/rs13142730>
- De Almeida, L. F. R., Frei, F., Mancini, E., De Martino, L., & De Feo, V. (2010). Phytotoxic activities of Mediterranean essential oils. *Molecules*, 15(6), 4309–4323. <https://doi.org/10.3390/molecules15064309>
- Delfine, S., Loreto, F., Pinelli, P., Tognetti, R., & Alvino, A. (2005). Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106(2–3), 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.10.012>
- Delgado, J. A., Serrano, J. M., López, F., & Acosta, F. J. (2008). Seed size and seed germination in the Mediterranean fire-prone shrub *Cistus ladanifer*. *Plant Ecology*, 197(2), 269–276. <https://doi.org/10.1007/s11258-007-9376-8>
- Demetzos, C., Angelopoulou, D., & Perdetzoglou, D. (2002). A comparative study of the essential oils of *Cistus salviifolius* in several populations of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(7), 651–665. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00145-4)
- Demetzos, C., & Dimas, K. S. (2001). Labdane-type diterpenes: Chemistry and biological activity.

Bibliografía

- In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 25, Issue PART F, pp. 235–292).
[https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(01\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(01)80009-0)
- Demoly JP, Montserrat P (1993) *Cistus*. In: Castroviejo S (ed) *Flora Ibérica*. CSIC (Centro Superior Investigaciones Científica), Madrid, pp 319–337.
- Despinasse, Y., Fiorucci, S., Antonczak, S., Moja, S., Bony, A., Nicolè, F., Baudino, S., Magnard, J. L., & Jullien, F. (2017). Bornyl-diphosphate synthase from *Lavandula angustifolia*: A major monoterpene synthase involved in essential oil quality. *Phytochemistry*, 137, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.01.015>
- Diánez, F., Santos, M., Parra, C., Navarro, M. J., Blanco, R., & Gea, F. J. (2018). Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. *Letters in Applied Microbiology*, 67(4), 400–410. <https://doi.org/10.1111/lam.13053>
- Dias, J. D. F. G., Miguel, O. G., & Miguel, M. D. (2009). Composition of essential oil and allelopathic activity of aromatic water of *Aster lanceolatus* Willd: (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(3), 469–474. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000300012>
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- Drinkwater, L. E., Letourneau, D. K., Workneh, F., van Bruggen, A. H. C., & Shennan, C. (1995). Fundamental Differences Between Conventional and Organic Tomato Agroecosystems in California. *Ecological Applications*, 5(4), 1098–1112. <https://doi.org/10.2307/2269357>
- Economou-Amilli, A., Vokou, D., Anagnostidis, K., & Margaris, N. S. (1982). Leaf Morphology of *Thymus capitatus* (Labiatae) by Scanning Electron Microscopy. In *Aromatic Plants* (Issue June 1981, pp. 13–24). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-7642-9_2
- Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., & Gesheva, E. (2008). *Stress-Protective Role of Secondary Metabolites : Diversity of Functions and Mechanisms*. November.
- El Karkouri, J., Bouhrim, M., Al Kamaly, O. M., Mechchate, H., Kchibale, A., Adadi, I., Amine, S., Alaoui Ismaili, S., & Zair, T. (2021). Chemical Composition, Antibacterial and Antifungal Activity of the Essential Oil from *Cistus ladanifer* L. *Plants*, 10(10), 2068. <https://doi.org/10.3390/plants10102068>
- Elshafie, H. S., Grul'ová, D., Baranová, B., Caputo, L., De Martino, L., Sedlák, V., Camele, I., & De Feo, V. (2019). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil extracted from *Solidago canadensis* L. Growing wild in Slovakia. *Molecules*, 24(7), 1–13.

- <https://doi.org/10.3390/molecules24071206>
- Etehadpour, M., & Tavassolian, I. (2019). Ecological Factors Regulate Essential Oil Yield, Percent and Compositions of Endemic Yarrow (*Achillea eriophora* DC.) in Southeast Iran. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 6(2), 201–215. <https://doi.org/10.22059/ijhst.2019.283276.299>
- FAO, 2003. State of the World's Forests. FAO, Rome, Italy, 153 pp.
- Feng, Y. X., Wang, Y., Chen, Z. Y., Guo, S. S., You, C. X., & Du, S. S. (2019). Efficacy of bornyl acetate and camphene from *Valeriana officinalis* essential oil against two storage insects. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(16), 16157–16165. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05035-y>
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213–226. <https://doi.org/10.1002/ffj.1875>
- Francos, M., Úbeda, X., Pereira, P., & Alcañiz, M. (2018). Long-term impact of wildfire on soils exposed to different fire severities. A case study in Cadiretes Massif (NE Iberian Peninsula). *Science of The Total Environment*, 615, 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.311>
- Franz Ch. (1993) Genetics. Volatile Oil Crops: Their Biology Biochemistry and Production, Hay RKM, Waterman PG (Eds) Longman, Harlow, UK, 93-66.
- Franz, C. and Novak, J. (2010) Sources of Essential Oils. In: Baser, K.H.C. and Buchbauer, G., Eds., Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, CRC Press/ Taylor & Francis Group, Boca Raton, 39-82.
- Frazão, D. F., Raimundo, J. R., Domingues, J. L., Quintela-Sabarís, C., Gonçalves, J. C., & Delgado, F. (2018). *Cistus ladanifer* (Cistaceae): a natural resource in Mediterranean-type ecosystems. *Planta*, 247(2), 289–300. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2825-2>
- Gao, B. (1996). NDWI—A normalized difference water index for remote sensing of vegetation liquid water from space. *Remote Sensing of Environment*, 58(3), 257–266. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(96\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(96)00067-3)
- García-Caparrós, P., Romero, M., Llanderal, A., Cermeño, P., Lao, M., & Segura, M. (2019). Effects of Drought Stress on Biomass, Essential Oil Content, Nutritional Parameters, and Costs of Production in Six Lamiaceae Species. *Water*, 11(3), 573. <https://doi.org/10.3390/w11030573>
- Gea, F. J., Navarro, M. J., Santos, M., Diáñez, F., & Herraiz-Peñalver, D. (2019). Screening and evaluation of essential oils from mediterranean aromatic plants against the mushroom cobweb disease, *cladobotryum mycophilum*. *Agronomy*, 9(10), 1–14.

Bibliografía

- <https://doi.org/10.3390/agronomy9100656>
- Giamperi, L., Fraternali, D., & Ricci, D. (2002). The In Vitro Action of Essential Oils on Different Organisms. *Journal of Essential Oil Research*, 14(4), 312–318. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699865>
- Gijzen, H. J. M., Wijnberg, J. B. P. A., & De Groot, A. (1995). Structure, Occurrence, Biosynthesis, Biological Activity, Synthesis, and Chemistry of Aromadendrane Sesquiterpenoids. In *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Progress in the chemistry of organic natural products. Progrès dans la chimie des substances organiques naturelles* (Vol. 64, Issue September 1993, pp. 149–193). https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9337-2_3
- Gil, A., Van Baren, C. M., Di Leo Lira, P. M., & Bandoni, A. L. (2007). Identification of the Genotype from the Content and Composition of the Essential Oil of *Lemon Verbena* (*Aloysia citriodora* Palau). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8664–8669. <https://doi.org/10.1021/jf0708387>
- Gomes, P. B., Mata, V. G., & Rodrigues, A. E. (2005). Characterization of the Portuguese-Grown *Cistus ladanifer* Essential Oil. *Journal of Essential Oil Research*, 17(2), 160–165. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698864>
- Gomez-Serrano, V., Valenzuela-Calahorra, C., & Pastor-Villegas, J. (1993). Characterization of rockrose wood, char and activated carbon. *Biomass and Bioenergy*, 4(5), 355–364. [https://doi.org/10.1016/0961-9534\(93\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0961-9534(93)90052-6)
- González-González, B. D., Sixto, H., Alberdi, I., Esteban, L., Guerrero, S., Pasalodos, M., Vázquez, A., & Cañellas, I. (2017). Estimation of shrub biomass availability along two geographical transects in the Iberian Peninsula for energy purposes. *Biomass and Bioenergy*, 105, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.07.011>
- Greche, H., Mrabet, N., Zrira, S., Ismaïli-Alaoui, M., Benjilali, B., & Boukir, A. (2009). The Volatiles of the Leaf Oil of *Cistus ladanifer* L. var. *albiflorus* and Labdanum Extracts of Moroccan Origin and their Antimicrobial Activities. *Journal of Essential Oil Research*, 21(2), 166–173. <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700140>
- Grigoriadou, K., Krigas, N., Lazari, D., & Maloupa, E. (2020). Sustainable use of mediterranean medicinal-aromatic plants. In *Feed Additives* (pp. 57–74). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00004-2>
- Gu, Y., Hunt, E., Wardlow, B., Basara, J. B., Brown, J. F., & Verdin, J. P. (2008). Evaluation of MODIS NDVI and NDWI for vegetation drought monitoring using Oklahoma Mesonet soil moisture data. *Geophysical Research Letters*, 35(22), L22401. <https://doi.org/10.1029/2008GL035772>
- Guimarães, R., Sousa, M. J., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Contribution of essential oils and

- phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 32(2), 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.04.011>
- Guitton, Y., Nicol, F., Moja, S., Valot, N., Legrand, S., Jullien, F., & Legendre, L. (2010). Differential accumulation of volatile terpene and terpene synthase mRNAs during lavender (*Lavandula angustifolia* and *L. x intermedia*) inflorescence development. *Physiologia Plantarum*, 138(2), 150–163. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01315.x>
- Glz, P.-G., Kobold, U., Michaelis, K., & Vostrowsky, O. (1984). The Composition of Terpene Hydrocarbons in the Essential Oils from Leaves of Four *Cistus* Species. *Zeitschrift Fr Naturforschung C*, 39(7–8), 699–704. <https://doi.org/10.1515/znc-1984-7-802>
- Hamdi, A., Majouli, K., Vander Heyden, Y., Flamini, G., & Marzouk, Z. (2017). Phytotoxic activities of essential oils and hydrosols of *Haplophyllum tuberculatum*. *Industrial Crops and Products*, 97, 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.053>
- Hassanpouraghdam, M. B., & Hassani, A. (2014). Oven and conventional drying methods affect volatile oil content and composition of *Mentha pulegium* L. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 17(2), 346–352. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.895152>
- Heil, M. (2008). Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 178(1), 41–61. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02330.x>
- Herraiz-Pealver, D., Cases, M. ., Varela, F., Navarrete, P., Snchez-Vioque, R., & Usano-Aleman, J. (2013). Chemical characterization of *Lavandula latifolia* Medik. essential oil from Spanish wild populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 46, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.09.018>
- Herranz, J. M., Ferrandis, P., Copete, M. A., Duro, E. M., & Zalacan, A. (2006). Effect of allelopathic compounds produced by *Cistus ladanifer* on germination of 20 Mediterranean taxa. *Plant Ecology*, 184(2), 259–272. <https://doi.org/10.1007/s11258-005-9071-6>
- Houicher, A., Hechachna, H., & zogul, F. (2016). In Vitro Determination of the Antifungal Activity of *Artemisia campestris* Essential Oil from Algeria. *International Journal of Food Properties*, 19(8), 1749–1756. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1107734>
- Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M., & Cavrini, V. (2002). GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(4), 691–700. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00119-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00119-X)
- Hunt, E. R., Ustin, S. L., & Riao, D. (2013). Remote Sensing of Leaf, Canopy, and Vegetation Water Contents for Satellite Environmental Data Records. In *Satellite-based Applications on Climate Change* (Vol. 9789400758, Issue May, pp. 335–357). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5872-8_20

Bibliografía

- Hyltdgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 3(JAN), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Inoue, M., & Craker, L. E. (2014). Medicinal and Aromatic Plants—Uses and Functions. In *Horticulture: Plants for People and Places, Volume 2* (Vol. 2, pp. 645–669). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8581-5_3
- Jari Oksanen, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlinn, Peter R. Minchin, R. B. O'Hara, Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs and Helene Wagner (2020). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-7.
- John Fox and Sanford Weisberg (2019). An {R} Companion to Applied Regression, Third Edition. Thousand Oaks CA: Sage.
- Jordán, M. J., Martínez, R. M., Goodner, K. L., Baldwin, E. A., & Sotomayor, J. A. (2006). Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products*, 24(3), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.06.011>
- Jordán, Maria J., Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S., & Sotomayor, J. A. (2013). Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract. *Industrial Crops and Products*, 48, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.031>
- Jouini, A., Verdeguer, M., Pinton, S., Araniti, F., Palazzolo, E., Badalucco, L., & Laudicina, V. A. (2020). Potential effects of essential oils extracted from mediterranean aromatic plants on target weeds and soil microorganisms. *Plants*, 9(10), 1–24. <https://doi.org/10.3390/plants9101289>
- Kamil Barton (2020). MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.43.17. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>.
- Khangholi, S., & Rezaeinode, A. (2008). Effect of Drying Temperature on Essential Oil Content and Composition of Sweet Wormwood (*Artemisia annua*) Growing Wild in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(6), 934–937. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.934.937>
- Khorasaninejad, S., Mousavi, A., Soltanloo, H., Hemmati, K., & Khalighi, A. (2011). The effect of drought stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Medicinal Plant Research*, 5(22), 5360–5365.
- Kleinwächter, M., Paulsen, J., Bloem, E., Schnug, E., & Selmar, D. (2015). Moderate drought and signal transducer induced biosynthesis of relevant secondary metabolites in thyme (*Thymus vulgaris*), greater celandine (*Chelidonium majus*) and parsley (*Petroselinum*

- crispum*). *Industrial Crops and Products*, 64(1), 158–166.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.062>
- Koitaishi, R., Suzuki, T., Kawazu, T., Sakai, A., Kuroiwa, H., & Kuroiwa, T. (1997). 1,8-Cineole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research*, 110(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF02506836>
- Kordali, S., Usanmaz, A., Cakir, A., Komaki, A., & Ercisli, S. (2016). Antifungal and Herbicidal Effects of Fruit Essential Oils of Four *Myrtus communis* Genotypes. *Chemistry & Biodiversity*, 13(1), 77–84. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500018>
- Lange, D. (2004). Medicinal and aromatic plants: Trade, production, and management of botanical resources. *Acta Horticulturae*, 629, 177–197.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.629.25>
- Langenheim, J. H. (1994). Higher plant terpenoids: A phyto-centric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, 20(6), 1223–1280.
<https://doi.org/10.1007/BF02059809>
- Lasanta, T., Khorchani, M., Pérez-Cabello, F., Errea, P., Sáenz-Blanco, R., & Nadal-Romero, E. (2018). Clearing shrubland and extensive livestock farming: Active prevention to control wildfires in the Mediterranean mountains. *Journal of Environmental Management*, 227(June), 256–266. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.104>
- Lee, Y.-S., Kim, J., Lee, S., Oh, E., Shin, S., & Park, I. (2009). Effects of plant essential oils and components from Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) on growth and morphogenesis of three phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(3), 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.02.002>
- León-Méndez, G., Pájaro-Castro, N., Pájaro-Castro, E., Torrenegra-Alarcón, M., & Herrera-Barros, A. (2019). Essential oils as a source of bioactive molecules. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(1), 80–93.
<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n1.80067>
- Liu, S., Shao, X., Wei, Y., Li, Y., Xu, F., & Wang, H. (2016). *Solidago canadensis* L. essential oil vapor effectively inhibits botrytis cinerea growth and preserves postharvest quality of strawberry as a food model system. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01179>
- Llorens, L., Llorens-Molina, J. A., Agnello, S., & Boira, H. (2014). Geographical and environment-related variations of essential oils in isolated populations of *Thymus richardii* Pers. in the Mediterranean basin. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56, 246–254.
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.05.007>
- Llusià, J., & Peñuelas, J. (1998). Changes in terpene content and emission in potted

Bibliografía

- Mediterranean woody plants under severe drought. *Canadian Journal of Botany*, 76(8), 1366–1373. <https://doi.org/10.1139/b98-141>
- Loizzo, M. R., Ben Jemia, M., Senatore, F., Bruno, M., Menichini, F., & Tundis, R. (2013). Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.040>
- Loreto, F., Ciccioli, P., Cecinato, A., Brancaleoni, E., Frattoni, M., & Tricoli, D. (1996). Influence of environmental factors and air composition on the emission of α -pinene from *Quercus ilex* leaves. *Plant Physiology*, 110(1), 267–275. <https://doi.org/10.1104/pp.110.1.267>
- Lubbe, A., & Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 785–801. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.01.019>
- Lukovic, J., Potocnik, I., Rekanovic, E., Milijasevic-Marcic, S., Todorovic, B., Kostic, M., & Radulovic, Z. (2019). Toxicity of plant essential oils to *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr, the causal agent of chestnut blight. *Pesticidi i Fitomedicina*, 34(2), 89–96. <https://doi.org/10.2298/pif1902089l>
- Maffei, M. E. (2010). Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*, 76(4), 612–631. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.03.003>
- Mahdavia, F., & Saharkhiz, M. J. (2015). Phytotoxic activity of essential oil and water extract of peppermint (*Mentha × piperita* L. CV. Mitcham). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.003>
- Marino, Ahmad, Ferreira, & Alvino. (2019). Evaluation of the Effect of Irrigation on Biometric Growth, Physiological Response, and Essential Oil of *Mentha spicata* (L.). *Water*, 11(11), 2264. <https://doi.org/10.3390/w11112264>
- Mariotti, J. P., Tomi, F., Casanova, J., Costa, J., & Bernardini, A. F. (1997). Composition of the Essential Oil of *Cistus ladaniferus* L. Cultivated in Corsica (France). *Flavour and Fragrance Journal*, 12(3), 147–151. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199705\)12:3<147::AID-FFJ631>3.3.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199705)12:3<147::AID-FFJ631>3.3.CO;2-H)
- Martín-Pinto, P., Vaquerizo, H., Peñalver, F., Olaizola, J., & Oria-de-Rueda, J. A. (2006). Early effects of a wildfire on the diversity and production of fungal communities in Mediterranean vegetation types dominated by *Cistus ladanifer* and *Pinus pinaster* in Spain. *Forest Ecology and Management*, 225(1–3), 296–305. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.01.006>
- Martino, L. De, Mancini, E., Almeida, L. F. R. de, & Feo, V. De. (2010). The Antigerminative Activity of Twenty-Seven Monoterpenes. *Molecules*, 15(9), 6630–6637.

- <https://doi.org/10.3390/molecules15096630>
- Mastro, G. De, Tarraf, W., Verdini, L., Brunetti, G., & Ruta, C. (2017). Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. *Food Chemistry*, 235, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.019>
- Máthé, Á. (2015). *Medicinal and Aromatic Plants of the World* (Á. Máthé (ed.); Vol. 1). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9810-5>
- Matfok, N., Lachowicz, S., Gorzelany, J., & Balawejder, M. (2020). Influence of drying method on some bioactive compounds and the composition of volatile components in dried pink rock rose (*Cistus creticus* L.). *Molecules*, 25(11), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules25112596>
- Mediavilla, I., Blázquez, M. A., Ruiz, A., & Esteban, L. S. (2021). Influence of the Storage of *Cistus ladanifer* L. Bales from Mechanised Harvesting on the Essential Oil Yield and Qualitative Composition. *Molecules*, 26(8), 2379. <https://doi.org/10.3390/molecules26082379>
- Misra, A., & Srivastava, N. K. (2000). Influence of Water Stress on Japanese Mint. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 7(1), 51–58. https://doi.org/10.1300/J044v07n01_07
- Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2017). Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. In *Soft Chemistry and Food Fermentation* (pp. 379–419). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811412-4.00013-8>
- Mollaei, S., Ebadi, M., Hazrati, S., Habibi, B., Gholami, F., & Sourestani, M. M. (2020). Essential oil variation and antioxidant capacity of *Mentha pulegium* populations and their relation to ecological factors. *Biochemical Systematics and Ecology*, 91(April), 104084. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104084>
- Moradi, R., Rezvani Moghaddam, P., Nasiri Mahallati, M., & Nezhadali, A. (2011). Effects of organic and biological fertilizers on fruit yield and essential oil of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* var. *dulce*). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(2), 546. <https://doi.org/10.5424/sjar/20110902-190-10>
- Morshedloo, M. R., Ebadi, A., Maggi, F., Fattahi, R., Yazdani, D., & Jafari, M. (2015). Chemical characterization of the essential oil compositions from Iranian populations of *Hypericum perforatum* L. *Industrial Crops and Products*, 76, 565–573. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.033>
- Moyler, D. A., & Clery, R. A. (2005). The Aromatic Resins: Their Chemistry and Uses. In *Flavours and Fragrances* (pp. 96–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845698249.2.96>
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>

Bibliografía

- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. In *Pharmaceuticals* (Vol. 10, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- Niinemets, Ü., Loreto, F., & Reichstein, M. (2004). Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trends in Plant Science*, 9(4), 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.02.006>
- Nishida, N., Tamotsu, S., Nagata, N., Saito, C., & Sakai, A. (2005). Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: Inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 31(5), 1187–1203. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-4256-y>
- Nuñez, E. (1989) Ecología del jaral de *Cistus ladanifer* L. PhD Thesis. Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain.
- Oller-López, J. L., Rodríguez, R., Cuerva, J. M., Oltra, J. E., Bazdi, B., Dahdouh, A., Lamarti, A., & Mansour, A. I. (2005). Composition of the Essential Oils of *Cistus ladaniferus* and *C. monspeliensis* from Morocco. *Journal of Essential Oil Research*, 17(5), 553–555. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698992>
- Owen, S. M., & Peñuelas, J. (2005). Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. *Trends in Plant Science*, 10(9), 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.07.010>
- Özer, Z., Kiliç, T., Selvi, S., & Pasa, C. (2018). Effect of Different Drying Methods and Development Stages on the Essential Oil Chemical Composition of Aerial Parts of *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (link) Letsw. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 21(5), 1403–1409. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1439774>
- Pagula, F. P., Baser, K. H. C., & Kürkçüoğlu, M. (2000). Essential Oil Composition of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. from Mozambique. *Journal of Essential Oil Research*, 12(3), 333–335. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9699530>
- Palá-Paúl, J., Usano-Alemany, J., Soria, A. C., Pérez-Alonso, M. J., & Brophy, J. J. (2008). Essential oil composition of *Eryngium campestre* L. growing in different soil types. A preliminary study. *Natural Product Communications*, 3(7), 1121–1126. <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300716>
- Palá-Paúl, J., Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M. J., & Sanz, J. (2005). Seasonal variation in chemical composition of *Cistus albidus* L. from Spain. *Journal of Essential Oil Research*, 17(1), 19–22. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698818>
- Palfi, M., Konjevoda, P., & Vrandečić, K. (2019). Antifungal activity of essential oils on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Bortyitis cinerea*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(7), 544. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2019.v31.i7.1972>
- Papanikolaou, A., Kanellis, A. K., Givanoudi, S., Papaefthimiou, D., Kostas, S., & Falara, V. (2014).

- Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Frontiers in Chemistry*, 2(June), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00035>
- Pérez-Sánchez, R., Infante, F., Gálvez, C., & Uberta, J. L. (2007). Fungitoxic Activity Against Phytopathogenic Fungi and the Chemical Composition of *Thymus zygis* Essential Oils. *Food Science and Technology International*, 13(5), 341–347. <https://doi.org/10.1177/1082013207085687>
- Perry, N. B., Anderson, R. E., Brennan, N. J., Douglas, M. H., Heaney, A. J., McGimpsey, J. A., & Smallfield, B. M. (1999). Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): Variations among individuals, plant parts, seasons, and sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 2048–2054. <https://doi.org/10.1021/jf981170m>
- Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 237–243. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00251-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00251-0)
- Pichersky, E., Noel, J. P., & Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311(5762), 808–811. <https://doi.org/10.1126/science.1118510>
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team (2020). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-147.
- Pino-Otín, M. R., Val, J., Ballesteros, D., Navarro, E., Sánchez, E., & Mainar, A. M. (2019). Impact of *Artemisia absinthium* hydrolate extracts with nematicidal activity on non-target soil organisms of different trophic levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180(May), 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.055>
- Pohlert, T (2014). The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR).
- Politi, M., Menghini, L., Conti, B., Bedini, S., Farina, P., Cioni, P. L., Braca, A., & De Leo, M. (2020). Reconsidering Hydrosols as Main Products of Aromatic Plants Manufactory: The Lavandin (*Lavandula × intermedia*) Case Study in Tuscany. *Molecules*, 25(9), 2225. <https://doi.org/10.3390/molecules25092225>
- Rahimmalek, M., & Goli, S. A. H. (2013). Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*. Celak leaves. *Industrial Crops and Products*, 42(1), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.012>
- Rahimmalek, M., Mirzakhani, M., & Pirbalouti, A. G. (2013). Essential oil variation among 21 wild myrtle (*Myrtus communis* L.) populations collected from different geographical regions in Iran. *Industrial Crops and Products*, 51, 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.010>

Bibliografía

- Raimundo, J. R., Frazão, D. F., Domingues, J. L., Quintela-Sabarís, C., Dentinho, T. P., Anjos, O., Alves, M., & Delgado, F. (2018). Neglected Mediterranean plant species are valuable resources: the example of *Cistus ladanifer*. *Planta*, 248(6), 1351–1364. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2997-4>
- Rao, B. R. R. (2001). Biomass and essential oil yields of rainfed palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. *motia* Burk.) supplied with different levels of organic manure and fertilizer nitrogen in semi-arid tropical climate. *Industrial Crops and Products*, 14(3), 171–178. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(01\)00081-4](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(01)00081-4)
- Rao, M. R., Palada, M. C., & Becker, B. N. (2004). *Medicinal and aromatic plants in agroforestry systems* (pp. 107–122). https://doi.org/10.1007/978-94-017-2424-1_8
- Rapposelli, E., Melito, S., Barmina, G. G., Foddai, M., Azara, E., & Scarpa, G. M. (2015). Relationship between Soil and Essential Oil Profiles in *Salvia desoleana* Populations: Preliminary Results. *Natural Product Communications*, 10(9), 1934578X1501000. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000932>
- Ray, A., Jena, S., Dash, B., Kar, B., Halder, T., Chatterjee, T., Ghosh, B., Panda, P. C., Nayak, S., & Mahapatra, N. (2018). Chemical diversity, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from Indian populations of *Hedychium coronarium* Koen. *Industrial Crops and Products*, 112(July 2017), 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.033>
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ríos, J.-L. (2016). Essential Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 3–10). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00001-8>
- Ríos, P., González, M., Obregón, S., Carbonero, M. D., Leal, J. R., Fernández, P., De-Haro, A., & Sánchez, M. E. (2017). *Brassica*-based seedmeal biofumigation to control *Phytophthora cinnamomi* in the Spanish “dehesa” oak trees. *Phytopathologia Mediterranea*, 56(3), 392–399. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-20771
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*, 10(12), e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Ritz, C., Jensen, S. M., Gerhard, D., & Streibig, J. C. (2019). Dose-Response Analysis Using R. In *Dose-Response Analysis Using R*. Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/b21966>
- Rivas-Martínez, S. 1979. Brezales y jarales de Europa occidental (Revisión fitosociológica de las clases Calluno-Ulicetea y Cisto-Lavanduletea). *Lazaroa*, 1, 5-127.
- Rivas-Martínez, S., Díaz, T. E., Fernández-González, F., Izco, J., Loidi, J., Lousã, M., & Penas, A. (2002). Vascular plant communities of Spain and Portugal: addenda to the syntaxonomical checklist of 2001. 2. Itinera Geobotanica (España).

- Robles, C., Bousquet-Mélou, A., Garzino, S., & Bonin, G. (2003). Comparison of essential oil composition of two varieties of *Cistus ladanifer*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(3), 339–343. [https://doi.org/10.1016/s0305-1978\(02\)00161-8](https://doi.org/10.1016/s0305-1978(02)00161-8)
- Robles, C., & Garzino, S. (1998). Essential oil composition of *Cistus albidus* leaves. *Phytochemistry*, 48(8), 1341–1345. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01124-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01124-2)
- Robles, C., & Garzino, S. (2000). Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves. *Phytochemistry*, 53(1), 71–75. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00460-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00460-4)
- Rodríguez-Molina, MC., Serrano-Pérez, P., Santiago, R., Cardillo, E., Godoy, B., De Santiago, A., (2018). Efecto de la biofumigación con pellets de *Brassica carinata* en la progresión de la enfermedad causada por *Phytophthora cinnamomi* en *Lupinus luteus*. In Libro de Resúmenes XIX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología; SEF: Toledo, Spain, p. 124.
- Rodríguez-Molina, M. C., Fernández-Rebollo, P., Serrano-Pérez, P., De Santiago, A., Hidalgo-Fernández, M. T., & Campos-Navarro, F. J. (2021). Biofumigation with *Brassica* seed-based products combined with calcium carbonate to control *Phytophthora cinnamomi* root rot in cork and holm oaks. *European Journal of Plant Pathology*, 159(3), 471–483. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02175-7>
- Romero, M. A., Sánchez, J. E., Jiménez, J. J., Belbahri, L., Trapero, A., Lefort, F., & Sánchez, M. E. (2007). New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in south-west Spain and Portugal. *Journal of Phytopathology*, 155(5), 289–295. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01230.x>
- Rossi, P. G., Berti, L., Panighi, J., Luciani, A., Maury, J., Muselli, A., Serra, D. D. R., Gonny, M., & Bolla, J. M. (2007). Antibacterial action of essential oils from corsica. *Journal of Essential Oil Research*, 19(2), 176–182. <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699254>
- Ryan M. Hope (2013). Rmisc: Ryan Miscellaneous. R package version 1.5.
- Russell Lenth (2020). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4.8.
- Sadeghi, H., Jamalpoor, S., & Shirzadi, M. H. (2014). Variability in essential oil of *Teucrium polium* L. of different latitudinal populations. *Industrial Crops and Products*, 54, 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.015>
- Salazar-Cerezo, S., Martínez-Montiel, N., García-Sánchez, J., Pérez-y-Terrón, R., & Martínez-Contreras, R. D. (2018). Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiological Research*, 208(February), 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.010>

Bibliografía

- Sánchez-Sánchez, A., Sánchez-Andreu, J., Juárez, M., Jordá, J., & Bermúdez, D. (2002). Humic substances and amino acids improve effectiveness of chelate feeddha in lemon trees. *Journal of Plant Nutrition*, 25(11), 2433–2442. <https://doi.org/10.1081/PLN-120014705>
- Santos, C. P. dos, Oliveira, T. C. de, Pinto, J. A. O., Fontes, S. S., Cruz, E. M. O., de Fátima Arrigoni-Blank, M., Andrade, T. M., Matos, I. L. de, Alves, P. B., Innecco, R., & Blank, A. F. (2015). Chemical diversity and influence of plant age on the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *germplasm. Industrial Crops and Products*, 76, 416–421. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.017>
- Santos, E., Balseiro-Romero, M., Abreu, M. M., & Macías, F. (2017). Bioextracts of *Cistus ladanifer* L. growing in São Domingos mine as source of valuable compounds. *Journal of Geochemical Exploration*, 174, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.07.004>
- Sárosi, S., Sipos, L., Kókai, Z., Pluhár, Z., Szilvássy, B., & Novák, I. (2013). Effect of different drying techniques on the aroma profile of *Thymus vulgaris* analyzed by GC–MS and sensory profile methods. *Industrial Crops and Products*, 46, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.028>
- Saxton, K. E., Rawls, W. J., Romberger, J. S., & Papendick, R. I. (1986). Estimating Generalized Soil-water Characteristics from Texture 1 K. E. SAXTON, W. J. RAWLS, J. S. ROMBERGER, AND R. I. PAPENDICK 2. *Soil Science Society of America Journal*, 50(4), 1031–1036. <https://www.soils.org/publications/sssaj/abstracts/50/4/SS0500041031>
- Schmiderer, C., Grassi, P., Novak, J., & Franz, C. (2008). Diversity of essential oil glands of Spanish sage (*Salvia lavandulifolia* Vahl, Lamiaceae). *Natural Product Communications*, 3(7), 1155–1160. <https://doi.org/10.1177/1934578x0800300723>
- Sefidkon, F., Abbasi, K., & Khaniki, G. B. (2006). Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. *Food Chemistry*, 99(1), 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.026>
- Sellami, I. H., Rebey, I. B., Sriti, J., Rahali, F. Z., Limam, F., & Marzouk, B. (2012). Drying Sage (*Salvia officinalis* L.) Plants and Its Effects on Content, Chemical Composition, and Radical Scavenging Activity of the Essential Oil. *Food and Bioprocess Technology*, 5(8), 2978–2989. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0661-0>
- Sellami, I. H., Wannes, W. A., Bettaieb, I., Berrima, S., Chahed, T., Marzouk, B., & Limam, F. (2011). Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. *Food Chemistry*, 126(2), 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.022>
- Selmar, D., Kleinwächter, M., Abouzeid, S., Yahyazadeh, M., & Nowak, M. (2017). The Impact of Drought Stress on the Quality of Spice and Medicinal Plants. In *Medicinal Plants and*

- Environmental Challenges* (pp. 159–175). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9_9
- Serra, S. (2015). Recent Advances in the Synthesis of Carotenoid-Derived Flavours and Fragrances. *Molecules*, 20(7), 12817–12840.
<https://doi.org/10.3390/molecules200712817>
- Serrano-Pérez, P., Palo, C., & Rodríguez-Molina, M. del C. (2017). Efficacy of *Brassica carinata* pellets to inhibit mycelial growth and chlamydospores germination of *Phytophthora nicotianae* at different temperature regimes. *Scientia Horticulturae*, 216, 126–133.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.01.002>
- Serrano, J., Shahidian, S., & Marques da Silva, J. (2019). Evaluation of Normalized Difference Water Index as a Tool for Monitoring Pasture Seasonal and Inter-Annual Variability in a Mediterranean Agro-Silvo-Pastoral System. *Water*, 11(1), 62.
<https://doi.org/10.3390/w11010062>
- Serrano, M. S., Fernández-Rebollo, P., De Vita, P., Carbonero, M. D., Trapero, A., & Sánchez, M. E. (2010). *Lupinus luteus*, a new host of *Phytophthora cinnamomi* in Spanish oak-rangeland ecosystems. *European Journal of Plant Pathology*, 128(2), 149–152.
<https://doi.org/10.1007/s10658-010-9652-7>
- Shahhoseini, R., Ghorbani, H., Karimi, S. R., Estaji, A., & Moghaddam, M. (2013). Qualitative and Quantitative Changes in the Essential Oil of Lemon Verbena (*Lippia citriodora*) as Affected by Drying Condition. *Drying Technology*, 31(9), 1020–1028.
<https://doi.org/10.1080/07373937.2013.771649>
- Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., & Kundu, B. (2017). Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(3), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011>
- Silva, F. G., Pinto, J. E. B. P., Cardoso, M. G., Sales, J. F., Mol, D. J. S., & Divino, S. P. (2007). Influence of Manure and Fertilizer on *Baccharis trimera* (Less.) D.C. Growth and Essential Oil Yield. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 13(1), 83–92.
https://doi.org/10.1300/J044v13n01_07
- Soares-Castro, P., Soares, F., & Santos, P. M. (2021). Current advances in the bacterial toolbox for the biotechnological production of monoterpene-based aroma compounds. *Molecules*, 26(1). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26010091>
- Souri, M. K., & Bakhtiarizade, M. (2019). Biostimulation effects of rosemary essential oil on growth and nutrient uptake of tomato seedlings. *Scientia Horticulturae*, 243(September 2018), 472–476. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.056>

Bibliografia

- Stagnari, F., Galieni, A., & Pisante, M. (2016). Drought stress effects on crop quality. In *Water Stress and Crop Plants* (Vol. 2, pp. 375–392). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119054450.ch23>
- Stępień, A. E., Gorzelany, J., Matłok, N., Lech, K., & Figiel, A. (2019). The effect of drying methods on the energy consumption, bioactive potential and colour of dried leaves of Pink Rock Rose (*Cistus creticus*). *Journal of Food Science and Technology*, 56(5), 2386–2394. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03656-2>
- Stević, T., Berić, T., Šavikin, K., Soković, M., Godevac, D., Dimkić, I., & Stanković, S. (2014). Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 55, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.011>
- Surburg, H., & Panten, J. (2006). Common Fragrance and Flavor Materials. In *Organic Process Research & Development* (Vol. 11, Issue 5). Wiley. <https://doi.org/10.1002/3527608214>
- Tabet Zatl, A., Dib, M. E. A., Djabou, N., Ilias, F., Costa, J., & Muselli, A. (2017). Antifungal activities of essential oils and hydrosol extracts of *Daucus carota* subsp. *sativus* for the control of fungal pathogens, in particular gray rot of strawberry during storage. *Journal of Essential Oil Research*, 29(5), 391–399. <https://doi.org/10.1080/10412905.2017.1322008>
- Tabrizi, L., Koocheki, A., Moghaddam, P. R., Mahallati, M. N., & Bannayan, M. (2011). Effect of irrigation and organic manure on Khorasan thyme (*Thymus transcaspicus* Klokov). *Archives of Agronomy and Soil Science*, 57(3), 317–326. <https://doi.org/10.1080/03650340903369376>
- Tabti, L., El Amine Dib, M., Djabou, N., Benyelles, N. G., Paolini, J., Costa, J., & Muselli, A. (2014). Control of fungal pathogens of *citrus sinensis* L. by essential oil and hydrosol of *Thymus capitatus* L. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87(May 2011), 279–285. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2014.087.039>
- Taiyun Wei and Viliam Simko (2017). R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84). Available from <https://github.com/taiyun/corrplot>
- Talavera, S., Gibbs, P. E., & Herrera, J. (1993). Reproductive biology of *Cistus ladanifer* (Cistaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 186(3–4), 123–134. <https://doi.org/10.1007/BF00940792>
- Tardieu, F., Simonneau, T., & Muller, B. (2018). The Physiological Basis of Drought Tolerance in Crop Plants: a Scenario-Dependent Probabilistic Approach. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 733–759. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040218>
- Tavares, C. S., Martins, A., Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Duarte, L. C., Gameiro, J. A., Roseiro, L. B., & Figueiredo, A. C. (2020). Bioproducts from forest biomass: Essential oils and

- hydrolates from wastes of *Cupressus lusitanica* Mill. and *Cistus ladanifer* L. *Industrial Crops and Products*, 144(December 2019), 112034. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112034>
- Teles, S., Pereira, J. A., Oliveira, L. M. de, Malheiro, R., Machado, S. S., Lucchese, A. M., & Silva, F. (2014). Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia origanoides* H.B.K. *Industrial Crops and Products*, 59, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.010>
- Tena, C., Santiago, A. D. R., Osuna, D., & Sosa, T. (2021). Phytotoxic activity of p-cresol, 2-phenylethanol and 3-phenyl-1-propanol, phenolic compounds present in *cistus ladanifer* l. *Plants*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/plants10061136>
- Tholl, D. (2015). Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. In *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (Vol. 123, Issue July 2015, pp. 63–106). https://doi.org/10.1007/10_2014_295
- Thomidis, T., & Filotheou, A. (2016). Evaluation of five essential oils as bio-fungicides on the control of *Pilidiella granati* rot in pomegranate. *Crop Protection*, 89, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.002>
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), R1231–R1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Tucker, C. J., & Sellers, P. J. (1986). Satellite remote sensing of primary production. *International Journal of Remote Sensing*, 7(11), 1395–1416. <https://doi.org/10.1080/01431168608948944>
- Tworowski, T. (2002). Herbicide effects of essential oils. *Weed Science*, 50(4), 425–431. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0425:heoeo\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0425:heoeo]2.0.co;2)
- Uremis, I., Arslan, M., & Sangun, M. K. (2009). Herbicidal activity of essential oils on the germination of some problem weeds. *Asian Journal of Chemistry*, 21(4), 3199–3210.
- Usano-Aleman, J., Herraiz-Peñalver, D., Cuadrado, J., Díaz, S., Santa-Cruz, M., & Palá-Paúl, J. (2012). Seasonal variation of the essential oils of *salvia lavandulifolia*: Antibacterial activity. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 15(2), 195–203. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644036>
- Valares, C. (2011). *Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente*.
- Vázquez, A., Climent, J. M., Casais, L., & Quintana, J. R. (2015). Current and future estimates for the fire frequency and the fire rotation period in the main woodland types of peninsular Spain: A case-study approach. *Forest Systems*, 24(2). <https://doi.org/10.5424/fs/2015242->

Bibliografía

06454

- Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0.
- Venskutonis, P. R. (1997). Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). *Food Chemistry*, 59(2), 219–227. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00242-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00242-7)
- Verdeguer, M., Blázquez, M. A., & Boira, H. (2012). Chemical composition and herbicidal activity of the essential oil from a *Cistus ladanifer* L. population from Spain. *Natural Product Research*, 26(17), 1602–1609. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.592835>
- Verkerk, P. J., Martinez de Arano, I., & Palahí, M. (2018). The bio-economy as an opportunity to tackle wildfires in Mediterranean forest ecosystems. *Forest Policy and Economics*, 86(September 2017), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.forpol.2017.10.016>
- Verma, R. S., Padalia, R. C., & Chauhan, A. (2015). Harvesting season and plant part dependent variations in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. grown in northern India. *Journal of Herbal Medicine*, 5(3), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2015.04.004>
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Abrini, J., Amensour, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Sendra, E. (2011). Identification of Flavonoid Content and Chemical Composition of the Essential Oils of Moroccan Herbs: Myrtle (*Myrtus communis* L.), Rockrose (*Cistus ladanifer* L.) and Montpellier cistus (*Cistus monspeliensis* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 23(2), 1–9. <https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700439>
- Vokou, D., Kokkini, S., & Bessiere, J.-M. (1993). Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21(2), 287–295. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90047-U](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90047-U)
- Wickham, Hadley. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wickham, Hadley. (2011). The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software*, 40(1), 1-29.
- Wickham Hadley, Romain François, Lionel Henry and Kirill Müller (2020). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. R package version 1.0.0.
- Weyerstahl, P., Marschall, H., Weirauch, M., Thefeld, K., & Surburg, H. (1998). Constituents of commercial *Labdanum* oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(5), 295–318. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199809\)13:5<295::AID-FFJ751>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199809)13:5<295::AID-FFJ751>3.0.CO;2-I)
- Yilmaz, M. T., Hunt, E. R., Goins, L. D., Ustin, S. L., Vanderbilt, V. C., & Jackson, T. J. (2008). Vegetation water content during SMEX04 from ground data and Landsat 5 Thematic Mapper imagery. *Remote Sensing of Environment*, 112(2), 350–362. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2007.03.029>

- Yuan, Y., Huang, M., Pang, Y. X., Yu, F. L., Chen, C., Liu, L. W., Chen, Z. X., Zhang, Y. B., Chen, X. L., & Hu, X. (2016). Variations in essential oil yield, composition, and antioxidant activity of different plant organs from *Blumea balsamifera* (L.) DC. at different growth times. *Molecules*, *21*(8). <https://doi.org/10.3390/molecules21081024>
- Zatla, A. T., Mami, I., Dib, M. E. A., & Sifi, M. E. A. (2020). Efficacy of Essential Oil and Hydrosol Extract of *Marrubium vulgare* on Fungi Responsible for Apples Rot. *Anti-Infective Agents*, *18*(3), 285–293. <https://doi.org/10.2174/2211352517666190618105332>
- Zidane, H., Elmiz, M., Aouinti, F., Tahani, A., Wathelet, J., Sindic, M., & Elbachiri, A. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts of *Cistus ladanifer* and *Cistus libanotis* growing in Eastern Morocco. *African Journal of Biotechnology*, *12*(34), 5314–5320. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.12868>
- Zidane, H., Fauconnier, M. L., Sindic, M., & El Bachiri, A. (2014). Comparative study of volatile secondary metabolite of *cistus libanotis* during different process. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, *6*(8), 281–287.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., & Smith, G. M. (2007). Analysing Ecological Data. In *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology* (Vol. 36). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-45972-1>
- Zuzarte, M., & Salgueiro, L. (2015). Essential Oils Chemistry. In D. P. de Sousa (Ed.), *Bioactive Essential Oils and Cancer* (pp. 19–61). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19144-7_2

ANEXO 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Este Anexo se exponen, por orden de elución en la columna cromatográfica HP-5, todos los compuestos detectados en los aceites esenciales de *C. ladanifer*. En cada tabla se indican los índices de Kóvats relativos a los n-alcanos (C6-C17), los porcentajes relativos de cada uno de los compuestos, el porcentaje total identificado respecto del total integrado y los porcentajes de los compuestos agrupados conforme a su estructura química en monoterpenos hidrocarbonados, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonados, sesquiterpenos oxigenados, diterpenos hidrocarbonados y “otros”.

Tabla 17. Composición química (%) del aceite esencial de las 12 parcelas de *C. ladanifer* distribuidas en 4 poblaciones y dos tipos de suelo (Tabla completa, Capítulo 3)

Compuestos	IK	Pizarra						Granito					
		Pozuelo de Zarzón			Valverde del Fresno			Torre de Don Miguel			Villasbuenas de Gata		
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3
triciclono	924	0,11	0,10	0,05	0,13	0,20	0,16	0,05	0,11	0,11	0,15	0,14	0,12
1-methylcycloheptanol	926	0,25	0,34	0,32	0,25	0,35	0,36	0,28	0,27	0,29	0,25	0,37	0,31
a-tuyeno	928	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01
α-pineno	936	4,82	5,51	3,20	2,49	3,32	2,74	5,58	4,89	5,69	4,47	6,63	5,88
canfeno	951	0,77	0,75	0,43	0,88	1,34	1,03	0,47	0,81	0,83	1,00	0,98	0,93
thuja-2,4(10)-diene	956	0,38	0,43	0,33	0,22	0,23	0,22	0,40	0,39	0,40	0,33	0,39	0,39
benzaldehido	962	0,10	0,13	0,10	0,05	0,04	0,05	0,08	0,10	0,07	0,06	0,06	0,07
6-methyl-6-hepten-2-one	969	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
sabineno	975	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
β-pineno	978	0,06	0,07	0,04	0,04	0,06	0,04	0,07	0,07	0,07	0,07	0,09	0,09
6-methyl-5-hepten-2-one	988	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
β-mirceno	992	0,18	0,23	0,17	0,14	0,13	0,14	0,18	0,18	0,18	0,17	0,18	0,19
δ-2-careno	998	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,06	0,02	0,03
trans-2-(2-pentenyl)-furano	1002	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
α-phellandreno	1005	0,10	0,11	0,08	0,06	0,07	0,06	0,10	0,09	0,10	0,09	0,12	0,11
α-terpineno	1018	0,09	0,09	0,06	0,05	0,07	0,05	0,09	0,09	0,10	0,08	0,11	0,10
β-felandreno	1023	0,05	0,06	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05
p-cimeno	1026	1,17	1,28	1,15	0,77	0,94	0,80	1,19	1,22	1,26	1,03	1,21	1,18
limoneno	1030	0,25	0,27	0,21	0,15	0,19	0,16	0,28	0,27	0,27	0,23	0,32	0,30
1,8-cineol	1033	0,20	0,22	0,18	0,13	0,13	0,14	0,20	0,19	0,22	0,19	0,20	0,20
2,2,6-trimetilciclohexano	1037	2,11	2,38	2,68	2,19	2,37	2,59	2,43	2,14	2,50	2,21	2,45	2,29
γ-terpineno	1061	0,41	0,48	0,48	0,41	0,44	0,44	0,48	0,44	0,49	0,44	0,49	0,46
acetofenona	1067	0,11	0,13	0,12	0,10	0,08	0,12	0,09	0,11	0,09	0,09	0,09	0,10
cis-linalol oxido	1073	0,35	0,50	0,39	0,27	0,23	0,28	0,36	0,37	0,37	0,35	0,33	0,40
canfelinona	1083	0,03	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05
p-cimeno	1090	0,63	0,78	0,67	0,50	0,42	0,48	0,61	0,67	0,71	0,62	0,58	0,68

Compuestos	IK	Pizarra						Granito					
		Pozuelo de Zarzón			Valverde del Fresno			Torre de Don Miguel			Villasbuenas de Gata		
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3
linalol	1100	0,15	0,17	0,15	0,17	0,15	0,19	0,15	0,16	0,19	0,12	0,14	0,14
hotrienol	1105	0,29	0,40	0,20	0,29	0,23	0,27	0,25	0,24	0,29	0,20	0,20	0,20
cis-rosa oxido	1112	0,18	0,17	0,14	0,15	0,13	0,15	0,13	0,11	0,17	0,12	0,15	0,14
β-fenchol	1114	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,03	0,04	0,00	0,03	0,01	0,01
α-tujona	1116	0,05	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
α-camfolenal	1126	0,76	0,81	0,70	0,55	0,58	0,67	0,98	0,98	0,94	0,76	0,86	0,88
trans-rosa oxido	1129	0,06	0,06	0,04	0,05	0,03	0,00	0,02	0,01	0,00	0,03	0,05	0,01
trans-pinocarveol	1139	4,34	5,15	2,97	2,72	2,92	2,35	4,51	5,43	5,11	4,43	4,57	4,81
3-nonen-2-one	1143	0,41	0,39	0,41	0,43	0,51	0,53	0,23	0,43	0,47	0,32	0,33	0,33
camfor	1144	0,33	0,35	0,27	0,46	0,39	0,45	0,28	0,39	0,40	0,40	0,34	0,33
cis-verbenol	1146	0,05	0,08	0,05	0,02	0,04	0,02	0,09	0,10	0,08	0,07	0,08	0,08
isoborneol	1157	0,29	0,31	0,22	0,34	0,37	0,41	0,36	0,31	0,35	0,30	0,33	0,29
isopinocamfone	1160	0,32	0,39	0,26	0,22	0,20	0,20	0,29	0,29	0,31	0,30	0,28	0,28
pinocarvone	1162	1,59	1,79	0,95	1,00	1,12	0,81	1,64	1,87	1,94	1,57	1,67	1,66
borneol	1166	1,11	1,09	0,93	1,22	1,25	1,28	0,86	1,40	1,16	1,21	1,01	1,05
a-phellandren-8-ol	1168	0,37	0,45	0,32	0,23	0,26	0,25	0,43	0,47	0,40	0,38	0,45	0,44
isocamphopinone	1174	0,10	0,08	0,12	0,14	0,15	0,14	0,09	0,09	0,10	0,11	0,08	0,12
terpinen-4-ol	1177	0,66	0,75	0,60	0,44	0,53	0,48	0,83	0,90	0,85	0,65	0,77	0,73
p-methylacetophenone	1183	0,13	0,13	0,12	0,12	0,11	0,12	0,11	0,15	0,12	0,13	0,12	0,12
p-cymen-8-ol	1185	0,31	0,39	0,30	0,19	0,19	0,21	0,36	0,46	0,34	0,31	0,29	0,35
α-terpineol	1190	0,31	0,35	0,29	0,22	0,23	0,24	0,35	0,40	0,36	0,31	0,32	0,34
mirtenal	1193	0,48	0,54	0,49	0,35	0,32	0,40	0,58	0,57	0,58	0,49	0,50	0,52
mirtenol	1195	0,93	1,07	0,81	0,63	0,62	0,61	1,02	1,17	1,05	0,97	0,91	1,00
verbenona	1207	0,44	0,55	0,58	0,30	0,31	0,41	0,60	0,59	0,44	0,48	0,52	0,60
trans-carveol	1219	0,47	0,58	0,47	0,34	0,36	0,38	0,63	0,72	0,56	0,50	0,57	0,60
isobornil formato	1226	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
cis-carveol	1229	0,08	0,10	0,06	0,07	0,07	0,08	0,10	0,12	0,10	0,10	0,11	0,12
cis-ocimenona	1233	0,33	0,35	0,26	0,30	0,30	0,33	0,33	0,34	0,36	0,25	0,28	0,25

Compuestos	IK	Pizarra						Granito					
		Pozuelo de Zarzón			Valverde del Fresno			Torre de Don Miguel			Villasbuenas de Gata		
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3
cuminaldehído	1238	0,15	0,16	0,13	0,11	0,10	0,10	0,15	0,17	0,14	0,14	0,15	0,15
trans-ocimenona	1241	0,08	0,09	0,05	0,10	0,09	0,09	0,11	0,08	0,12	0,08	0,11	0,10
d-carvona	1243	0,25	0,27	0,26	0,24	0,23	0,24	0,26	0,28	0,24	0,24	0,26	0,27
piperitona	1253	0,06	0,08	0,06	0,05	0,10	0,05	0,07	0,08	0,06	0,07	0,06	0,07
felandral	1272	0,14	0,16	0,14	0,13	0,12	0,12	0,17	0,18	0,16	0,15	0,14	0,15
bornil acetato	1285	3,06	3,13	2,57	3,20	3,44	3,73	2,51	3,03	2,94	3,18	3,25	3,61
timol	1290	0,07	0,08	0,08	0,07	0,07	0,07	0,12	0,13	0,13	0,09	0,09	0,11
isocarveol	1293	0,27	0,34	0,12	0,18	0,25	0,25	0,30	0,22	0,28	0,15	0,25	0,20
trans-pinocarvil acetato	1296	0,20	0,23	0,16	0,19	0,17	0,16	0,20	0,24	0,22	0,20	0,19	0,21
carvacrol	1303	0,35	0,38	0,35	0,29	0,26	0,31	0,41	0,42	0,41	0,38	0,39	0,41
mirtetil acetato	1324	0,40	0,46	0,49	0,33	0,25	0,27	0,62	0,43	0,47	0,43	0,56	0,51
carvil acetato	1339	0,18	0,22	0,18	0,14	0,13	0,12	0,19	0,23	0,20	0,17	0,18	0,20
α -cubeneno	1349	0,08	0,11	0,07	0,15	0,16	0,14	0,18	0,09	0,17	0,08	0,08	0,10
eugenol	1357	0,05	0,06	0,05	0,04	0,06	0,06	0,07	0,07	0,10	0,06	0,09	0,09
ciclosativeno	1362	0,68	0,67	0,69	0,74	0,75	0,68	0,69	0,58	0,61	0,71	0,69	0,70
α -copaeno	1371	0,51	0,46	0,38	0,51	0,60	0,51	0,51	0,43	0,48	0,49	0,57	0,43
α -ilangeno	1374	0,28	0,27	0,32	0,29	0,28	0,33	0,27	0,30	0,27	0,26	0,29	0,30
(+)-sativeno	1383	0,15	0,18	0,15	0,23	0,18	0,20	0,21	0,14	0,15	0,20	0,15	0,18
β -cubebeno	1389	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,03	0,04	0,00	0,05	0,04	0,04
a-gurjuneno	1412	0,10	0,11	0,07	0,09	0,08	0,06	0,09	0,10	0,09	0,11	0,08	0,11
α -ionone, (e)	1425	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,01	0,00	0,02	0,02	0,01	0,02
aromandendreno	1434	0,28	0,27	0,31	0,29	0,25	0,31	0,22	0,22	0,25	0,25	0,25	0,27
aloaromadendreno	1454	1,24	1,08	1,06	1,22	1,36	1,10	1,05	1,03	1,14	1,12	1,32	1,21
γ -muuroleno	1472	0,24	0,22	0,23	0,25	0,27	0,19	0,24	0,21	0,21	0,24	0,25	0,25
β -selineno	1478	0,25	0,25	0,27	0,16	0,19	0,20	0,26	0,20	0,19	0,31	0,24	0,27
β -ionone	1483	0,02	0,05	0,00	0,09	0,09	0,09	0,10	0,06	0,08	0,08	0,04	0,08
viridifloreño	1488	2,20	2,05	2,37	2,20	1,83	2,21	1,52	1,59	1,65	1,93	1,92	1,96
a-muuroleno	1494	0,27	0,29	0,26	0,28	0,33	0,30	0,30	0,25	0,25	0,31	0,30	0,31

Compuestos	IK	Pizarra						Granito					
		Pozuelo de Zarzón			Valverde del Fresno			Torre de Don Miguel			Villasbuenas de Gata		
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3
γ-cadineno	1506	0,29	0,27	0,30	0,29	0,30	0,31	0,30	0,27	0,24	0,29	0,32	0,31
calameneno	1517	0,64	0,85	0,49	0,73	0,76	0,69	0,81	0,63	0,74	0,76	0,64	0,76
δ-cadineno	1518	0,52	0,59	0,45	0,65	0,81	0,65	0,84	0,59	0,66	0,90	0,60	0,76
α-calacoreno	1536	0,57	0,55	0,55	0,58	0,65	0,59	0,58	0,54	0,54	0,59	0,55	0,54
palustrol	1559	1,06	0,95	1,13	1,13	1,08	1,19	0,96	0,93	0,93	1,01	1,01	1,02
espatulenol	1570	1,52	1,38	1,58	1,65	1,76	1,85	1,53	1,52	1,47	1,47	1,58	1,48
cariofileno oxido	1574	0,04	0,04	0,02	0,08	0,11	0,07	0,09	0,05	0,03	0,04	0,04	0,03
viridiflorol	1585	20,60	17,68	22,51	21,36	21,91	20,46	18,32	19,09	19,84	19,27	19,83	19,35
ledol	1594	9,35	8,91	10,47	11,28	10,23	10,42	10,08	9,13	8,65	9,83	8,27	8,45
1-epi-cubenol	1621	1,16	1,24	0,97	1,43	1,61	1,36	1,38	1,20	1,27	1,48	1,12	1,26
isospatuleno	1631	0,22	0,19	0,27	0,23	0,19	0,22	0,20	0,20	0,16	0,23	0,18	0,19
α-muurolol	1635	0,52	0,51	0,55	0,59	0,62	0,58	0,62	0,50	0,51	0,60	0,49	0,52
β-eudesmol	1641	0,99	1,12	0,87	0,99	1,05	0,93	1,03	1,03	0,89	1,15	0,91	0,98
α-cadinol	1649	0,43	0,38	0,45	0,42	0,46	0,41	0,46	0,37	0,34	0,47	0,40	0,38
cadaleno	1668	1,38	1,41	1,49	1,90	1,75	1,58	1,44	1,12	1,09	1,33	1,18	1,29
ambrox	1749	0,35	0,29	0,33	0,39	0,36	0,43	0,34	0,30	0,31	0,32	0,32	0,31
benzil benzoato	1765	0,22	0,19	0,20	0,21	0,22	0,27	0,25	0,25	0,21	0,18	0,20	0,21
6-oxoisoambrox	1838	0,07	0,11	0,06	0,09	0,09	0,06	0,04	0,04	0,04	0,02	0,03	0,03
sclareoloxido	1875	0,18	0,15	0,19	0,20	0,15	0,20	0,14	0,14	0,16	0,15	0,15	0,14
15-nor-labdan-8-ol	1961	1,64	1,31	1,88	1,90	1,41	1,94	1,27	1,23	1,45	1,28	1,18	1,14
16-kaureno	2020	0,71	0,81	1,02	1,15	1,00	1,14	0,79	0,81	0,98	0,99	0,92	0,65
Monoterpenos hidrocarbonados		9,06	10,21	6,97	5,90	7,49	6,40	9,60	9,34	10,32	8,83	11,31	10,52
monoterpenos oxigenados		15,97	18,41	13,07	12,00	12,40	12,07	17,17	19,41	18,22	16,02	16,61	17,08
Sesquiterpenos hidrocarbonados		9,75	9,71	9,51	10,68	10,67	9,96	9,63	8,38	8,67	10,01	9,50	9,87
Sesquiterpenos oxigenados		36,23	32,70	39,16	39,56	39,37	37,91	35,01	34,33	34,39	35,87	34,14	33,98
Diterpenos hidrocarbonados		0,71	0,81	1,02	1,15	1,00	1,14	0,79	0,81	0,98	0,99	0,92	0,65
Otros		9,19	9,46	9,64	9,53	9,47	10,68	8,57	8,90	9,20	8,80	9,28	9,34
Total Identificado		80,90	81,30	79,36	78,82	80,40	78,38	80,77	81,17	81,77	80,54	81,77	81,43

Tabla 18. Composición química (%) del aceite esencial de *C. ladanifer* en dos estados fenológicos y tres intervalos de edad (Tabla completa, Capítulo 4).

Compuestos	IK	Edad (años)	Floración			Fructificación		
			3-5	9-11	> 15	3-5	9-11	> 15
triciclono	924		0,14	0,20	0,27	0,13	0,11	0,11
1-methylcycloheptanol	926		0,30	0,39	0,40	0,33	0,31	0,28
a-tuyeno	928		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
α -pineno	936		1,54	2,05	2,43	4,95	4,57	4,34
canfeno	951		0,85	1,14	1,60	0,93	0,82	0,81
thuja-2,4(10)-dieno	956		0,36	0,42	0,46	0,37	0,32	0,34
benzaldehido	962		0,12	0,13	0,15	0,09	0,07	0,07
6-methyl-6-hepten-2-one	969		0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03
sabineno	975		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
β -pineno	978		0,03	0,03	0,04	0,07	0,06	0,06
6-methyl-5-hepten-2-one	988		0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04
β -mirceno	992		0,21	0,24	0,25	0,18	0,17	0,17
δ -2-careno	998		0,02	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02
trans-2-(2-pentenyl)-furano	1002		0,02	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00
α -phellandreno	1005		0,07	0,09	0,10	0,08	0,09	0,09
α -terpineno	1018		0,04	0,05	0,05	0,07	0,08	0,09
β -felandreno	1023		0,06	0,07	0,07	0,05	0,05	0,05
p-cimeno	1026		0,87	0,91	0,93	1,18	1,05	1,09
limoneno	1030		0,14	0,15	0,17	0,25	0,23	0,24
1,8-cineol	1033		0,10	0,10	0,10	0,20	0,18	0,17
2,2,6-trimetilciclohexano	1037		4,09	4,76	4,77	2,65	2,32	2,34
γ -terpineno	1061		0,69	0,75	0,73	0,51	0,45	0,45
acetofenona	1067		0,15	0,16	0,18	0,11	0,10	0,10
cis-linalol oxido	1073		0,49	0,51	0,61	0,32	0,36	0,35
canfelinona	1083		0,06	0,07	0,08	0,05	0,04	0,05
p-cimeneno	1090		0,72	0,56	0,69	0,60	0,61	0,63
linalol	1100		0,19	0,17	0,20	0,15	0,16	0,16
hotrienol	1105		0,39	0,40	0,48	0,26	0,27	0,23
cis-rosa oxido	1112		0,24	0,27	0,31	0,14	0,16	0,14
β -fenchol	1114			0,06		0,02	0,00	0,02
α -tujona	1116		0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05
α -camfolenal	1126		0,64	0,73	0,79	0,78	0,78	0,80
trans-rosa oxido	1129		0,12	0,14	0,15	0,04	0,04	0,02
l-trans-pinocarveol	1139		1,67	1,70	1,66	4,24	4,18	3,84
3-nonen-2-one	1143		0,44	0,40	0,33	0,41	0,36	0,43
camfor	1144		0,46	0,40	0,43	0,34	0,37	0,37
cis-verbenol	1146		0,06	0,09	0,09	0,08	0,06	0,06
isoborneol	1157		0,45	0,41	0,43	0,33	0,33	0,32
isopinocamfone	1160		0,47	0,53	0,49	0,31	0,28	0,27
pinocarvone	1162		0,61	0,59	0,57	1,47	1,50	1,40
borneol	1166		1,54	1,57	1,91	1,11	1,12	1,14
α -phellandren-8-ol	1168		0,40	0,53	0,60	0,34	0,37	0,38
isocamphopinone	1174		0,14	0,14	0,16	0,09	0,11	0,11

Compuestos	IK	Edad (años)	Floración			Fructificación		
			3-5	9-11	> 15	3-5	9-11	> 15
terpinen-4-ol	1177		0,47	0,53	0,57	0,70	0,68	0,67
p-methylacetophenone	1183		0,12	0,11	0,12	0,12	0,12	0,13
p-cymen-8-ol	1185		0,37	0,41	0,45	0,37	0,30	0,28
α -terpineol	1190		0,28	0,30	0,33	0,32	0,31	0,30
mirtenal	1193		0,51	0,51	0,52	0,51	0,48	0,48
mirtenol	1195		0,50	0,52	0,55	0,88	0,91	0,88
verbenona	1207		0,76	0,93	1,00	0,53	0,50	0,45
trans-carveol	1219		0,43	0,48	0,52	0,56	0,51	0,49
isobornil formato	1226		0,03	0,03	0,02	0,05	0,01	0,01
cis-carveol	1229		0,07	0,07	0,07	0,09	0,09	0,09
cis-ocimenona	1233		0,33	0,31	0,34	0,31	0,30	0,31
cuminaldehído	1238		0,13	0,13	0,12	0,14	0,14	0,13
trans-ocimenona	1241		0,03	0,04	0,03	0,02	0,03	0,04
d-carvona	1243		0,23	0,26	0,27	0,26	0,26	0,23
piperitona	1253		0,05	0,05	0,05	0,10	0,06	0,06
felandral	1272		0,17	0,16	0,17	0,15	0,15	0,15
bornil acetato	1285		3,04	3,27	3,52	3,02	3,08	3,20
timol	1290		0,08	0,07	0,08	0,10	0,09	0,09
isocarveol	1293		0,32	0,37	0,44	0,26	0,24	0,21
trans-pinocarvil acetato	1296		0,15	0,15	0,15	0,20	0,20	0,19
carvacrol	1303		0,34	0,33	0,34	0,37	0,37	0,35
mirtenil acetato	1324		0,18	0,19	0,22	0,46	0,47	0,38
carvil acetato	1339		0,13	0,13	0,14	0,19	0,17	0,17
α -cubeneno	1349		0,22	0,17	0,19	0,11	0,12	0,13
eugenol	1357		0,05	0,06	0,08	0,05	0,07	0,07
ciclosativeno	1362		0,37	0,36	0,36	0,67	0,67	0,69
α -copaeno	1371		0,16	0,16	0,16	0,42	0,51	0,49
α -ilangeno	1374		0,34	0,38	0,41	0,26	0,29	0,30
(+)-sativeno	1383		0,18	0,15	0,16	0,19	0,17	0,18
β -cubebeno	1389		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
a-gurjuneno	1412		0,07	0,07	0,08	0,08	0,09	0,09
α -ionone, (e)	1425		0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02
aromandendreno	1434		0,17	0,17	0,15	0,23	0,27	0,27
aloaromadendreno	1454		0,42	0,42	0,38	1,02	1,22	1,14
γ -muuroleno	1472		0,11	0,11	0,11	0,21	0,24	0,24
β -selineno	1478		0,13	0,15	0,15	0,21	0,23	0,24
β -ionone	1483		0,14	0,13	0,14	0,07	0,07	0,07
viridifloreño	1488		1,14	1,15	1,06	1,58	2,00	2,02
a-muuroleno	1494		0,13	0,11	0,13	0,25	0,29	0,29
γ -cadineno	1506		0,16	0,18	0,20	0,26	0,30	0,29
calameneno	1517		0,43	0,31	0,37	0,68	0,71	0,72
δ -cadineno	1518		0,34	0,24	0,31	0,57	0,65	0,74
α -calacoreno	1536		0,54	0,53	0,56	0,53	0,57	0,59
palustrol	1559		0,76	0,76	0,68	0,97	1,05	1,03
spatuleno	1570		0,98	0,98	0,87	1,62	1,62	1,49
cariofileno oxido	1574		0,15	0,12	0,12	0,10	0,05	0,04

Compuestos	IK	Edad (años)	Floración			Fructificación		
			3-5	9-11	> 15	3-5	9-11	> 15
viridiflorol	1585		19,81	20,11	17,25	19,93	20,20	19,99
ledol	1594		9,70	8,12	7,81	10,09	9,21	9,81
1-epi-cubenol	1621		0,92	0,90	0,76	1,26	1,32	1,28
isopatulanol	1631		0,23	0,23	0,20	0,19	0,21	0,21
α -muurolol	1635		0,30	0,24	0,25	0,56	0,56	0,54
β -eudesmol	1641		0,78	0,91	0,61	1,01	0,99	0,98
α -cadinol	1649		0,14	0,11	0,10	0,38	0,43	0,41
cadaleno	1668		1,34	1,00	1,05	1,50	1,40	1,38
ambrox	1749		0,48	0,48	0,45	0,33	0,33	0,36
benzil benzoato	1765		0,32	0,35	0,40	0,21	0,21	0,23
6-oxoisoambrox	1838		0,73	0,58	0,40	0,05	0,07	0,05
sclareoloxido	1875		0,21	0,21	0,23	0,15	0,15	0,18
15-nor-labdan-8-ol	1961		3,00	2,71	2,84	1,39	1,43	1,60
16-kaureno	2020		1,86	1,87	1,66	1,01	0,97	0,89
Monoterpenos hidrocarbonados			5,73	6,69	7,80	9,40	8,71	8,53
monoterpenos oxigenados			13,14	13,80	15,02	15,99	15,86	15,18
Sesquiterpenos hidrocarbonados			6,25	5,75	5,97	8,84	9,84	9,91
Sesquiterpenos oxigenados			34,20	32,92	29,06	36,43	35,96	36,15
Diterpenos hidrocarbonados			1,86	1,87	1,66	1,01	0,97	0,89
Otros			13,09	13,70	14,06	9,51	9,21	9,46
Total Identificado			74,27	74,73	73,57	81,17	80,32	80,12

Tabla 19. Composición química (%) del aceite esencial de *C. ladanifer* en tallos y hojas (Tabla completa, capítulo 4).

Compuestos	IK	Hojas	Tallos
triciclono	924	0,10	0,04
1-methylcycloheptanol	926	0,22	0,24
α -tuyeno	928	0,01	0,01
α -pineno	936	2,92	1,76
canfeno	951	0,72	0,34
thuja-2,4(10)-dieno	956	0,24	0,17
benzaldehido	962	0,06	0,04
6-methyl-6-hepten-2-one	969	0,03	0,02
sabineno	975	0,01	0,01
β -pineno	978	0,04	0,03
6-methyl-5-hepten-2-one	988	0,04	0,02
β -mirceno	992	0,15	0,10
δ -2-careno	998	0,02	0,02
trans-2-(2-pentenyl)-furano	1002		
α -phellandreno	1005	0,07	0,07
α -terpineno	1018	0,07	0,05
β -felandreno	1023	0,05	0,03
p-cimeno	1026	0,89	0,65
limoneno	1030	0,18	0,15
1,8-cineol	1033	0,16	0,07
2,2,6-trimetilciclohexano	1037	2,00	1,58
γ -terpineno	1061	0,40	0,29
acetofenona	1067	0,08	0,06
cis-linalol oxido	1073	0,32	0,25
canfelinona	1083	0,04	0,03
p-cimeno	1090	0,61	0,34
linalol	1100	0,15	0,07
hotrienol	1105	0,28	0,11
cis-rosa oxido	1112	0,14	0,10
β -fenchol	1114	0,08	
α -tujona	1116	0,05	0,03
α -camfolenal	1126	0,69	0,49
trans-rosa oxido	1129	0,07	0,05
l-trans-pinocarveol	1139	4,35	1,00
3-nonen-2-one	1143	0,31	0,20
camfor	1144	0,38	0,14
cis-verbenol	1146	0,04	0,04
isoborneol	1157	0,34	0,11
isopinocamfone	1160	0,30	0,13
pinocarvone	1162	1,54	0,39
borneol	1166	1,11	0,62
α -phellandren-8-ol	1168	0,30	0,27
isocamphopinone	1174	0,10	0,11
terpinen-4-ol	1177	0,59	0,37
p-methylacetophenone	1183	0,10	0,07

Compuestos	IK	Hojas	Tallos
p-cymen-8-ol	1185	0,26	0,18
α -terpineol	1190	0,29	0,17
mirtenal	1193	0,46	0,27
mirtenol	1195	0,85	0,41
verbenona	1207	0,42	0,44
trans-carveol	1219	0,44	0,30
isobornil formato	1226	0,01	
cis-carveol	1229	0,09	0,03
cis-ocimenona	1233	0,31	0,19
cuminaldehído	1238	0,14	0,08
trans-ocimenona	1241	0,02	0,01
d-carvona	1243	0,29	0,19
piperitona	1253	0,06	0,03
felandral	1272	0,15	0,07
bornil acetato	1285	3,46	2,25
timol	1290	0,11	0,04
isocarveol	1293	0,27	0,17
trans-pinocarvil acetato	1296	0,22	0,09
carvacrol	1303	0,39	0,23
mirtenil acetato	1324	0,42	0,57
carvil acetato	1339	0,16	0,17
α -cubeneno	1349	0,15	0,15
eugenol	1357	0,05	0,04
ciclosativeno	1362	0,68	0,65
α -copaeno	1371	0,41	0,56
α -ilangeno	1374	0,28	0,23
(+)-sativeno	1383	0,21	0,19
β -cubebeno	1389	0,05	0,04
a-gurjuneno	1412	0,10	0,07
α -ionone, (e)	1425	0,04	0,04
aromandendreno	1434	0,29	0,27
aloaromadendreno	1454	1,17	1,19
γ -muuroleno	1472	0,23	0,28
β -selineno	1478	0,24	0,33
β -ionone	1483	0,10	0,09
viridifloreño	1488	2,09	2,18
a-muuroleno	1494	0,29	0,34
γ -cadineno	1506	0,30	0,36
calameneno	1517	0,74	0,68
δ -cadineno	1518	0,78	0,70
α -calacoreno	1536	0,54	0,71
palustrol	1559	1,09	1,24
spatulanol	1570	1,63	1,97
cariofileno óxido	1574	0,05	0,06
viridiflorol	1585	20,27	25,36
ledol	1594	9,70	11,05
1-epi-cubenol	1621	1,44	1,29

Compuestos	IK	Hojas	Tallos
isopatuleno	1631	0,21	0,29
α -muurolo	1635	0,58	0,75
β -eudesmol	1641	1,04	1,43
α -cadinol	1649	0,43	0,63
cadaleno	1668	1,49	2,07
ambrox	1749	0,37	0,56
benzil benzoato	1765	0,22	0,22
6-oxoisoambrox	1838	0,10	0,11
sclareoloxido	1875	0,18	0,23
15-nor-labdan-8-ol	1961	1,57	1,86
16-kaureno	2020	1,06	1,78
Monoterpenos hidrocarbonados		6,47	4,03
monoterpenos oxigenados		15,53	7,14
Sesquiterpenos hidrocarbonados		10,11	11,04
Sesquiterpenos oxigenados		36,79	44,62
Diterpenos hidrocarbonados		1,06	1,78
Otros		9,24	7,74
Total Identificado		79,20	76,35

Tabla 20. Composición química (%) del aceite esencial de *C. ladanifer* para los cuatro tratamientos y las tres fechas de recolección (**Tabla completa, Capítulo 5**).

Compuestos	IK	Agosto				Septiembre				Octubre			
		C	F	R	F + R	C	F	R	F + R	C	F	R	F + R
triciclono	924	0,09	0,09	0,18	0,11	0,11	0,08	0,19	0,16	0,18	0,25	0,27	0,28
1-methylcycloheptanol	926	0,20	0,17	0,17	0,18	0,14	0,15	0,16	0,17	0,13	0,12	0,13	0,13
a-tuyeno	928	0,02	0,02	0,06	0,06	0,04	0,03	0,06	0,06	0,10	0,10	0,11	0,10
α -pineno	936	3,38	2,36	7,21	7,05	5,37	3,76	7,58	7,42	12,91	11,82	13,15	12,95
canfeno	951	0,63	0,63	1,26	0,83	0,72	0,61	1,31	1,20	1,36	1,76	1,98	2,01
thuja-2,4(10)-dieno	956	0,28	0,24	0,24	0,26	0,25	0,22	0,24	0,24	0,24	0,24	0,25	0,26
benzaldehido	962	0,11	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,10	0,09	0,08	0,07	0,09
6-methyl-6-hepten-2-one	969	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02
sabineno	975	0,02	0,02	0,04	0,04	0,03	0,03	0,05	0,06	0,08	0,08	0,08	0,08
β -pineno	978	0,05	0,04	0,12	0,10	0,08	0,50	0,12	0,12	0,17	0,18	0,19	0,19
6-methyl-5-hepten-2-one	988	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
β -mirreno	992	0,17	0,16	0,15	0,16	0,17	0,16	0,16	0,16	0,17	0,18	0,18	0,19
δ -2-careno	998	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02
trans-2-(2-pentenyl)-furano	1002	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,01	0,01	0,01
α -phellandreno	1005	0,23	0,08	0,09	0,09	0,10	0,08	0,10	0,10	0,13	0,14	0,14	0,14
α -terpineno	1018	0,07	0,07	0,11	0,12	0,11	0,09	0,14	0,14	0,21	0,23	0,23	0,24
β -felandreno	1023	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03
p-cimeno	1026	1,36	1,20	1,58	1,63	1,49	1,36	1,54	1,61	1,62	1,44	1,57	1,59
limoneno	1030	0,28	0,24	0,49	0,49	0,42	0,36	0,49	0,50	0,78	0,72	0,76	0,75
1,8-cineol	1033	0,18	0,15	0,18	0,18	0,17	0,16	0,18	0,19	0,18	0,17	0,19	0,20
2,2,6-trimetilciclohexano	1037	2,39	2,31	1,82	1,91	1,83	1,82	1,38	1,44	1,16	1,12	1,15	1,22
γ -terpineno	1061	0,50	0,49	0,48	0,50	0,48	0,45	0,46	0,46	0,57	0,58	0,58	0,60
acetofenona	1067	0,13	0,12	0,10	0,10	0,10	0,10	0,09	0,09	0,09	0,09	0,08	0,08
cis-linalol oxido	1073	0,34	0,33	0,31	0,31	0,32	0,31	0,29	0,30	0,27	0,28	0,25	0,29
canfelinona	1083	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04

Compuestos	IK	Agosto				Septiembre				Octubre			
		C	F	R	F + R	C	F	R	F + R	C	F	R	F + R
p-cimeno	1090	0,70	0,68	0,57	0,54	0,68	0,60	0,62	0,54	0,53	0,52	0,49	0,49
linalol	1100	0,11	0,10	0,11	0,12	0,10	0,10	0,11	0,12	0,13	0,13	0,12	0,13
hotrienol	1105	0,17	0,14	0,16	0,16	0,18	0,13	0,12	0,16	0,14	0,11	0,14	0,12
cis-rosa oxido	1112	0,11	0,14	0,10	0,09	0,12	0,10	0,08	0,09	0,11	0,14	0,11	0,12
β -fenchol	1114	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05
α -tujona	1116	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05
α -camfolenal	1126	0,72	0,68	0,93	0,93	0,75	0,68	0,90	0,93	1,08	1,05	1,09	1,15
trans-rosa oxido	1129	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,13	0,08	0,08	0,07
l-trans-pinocarveol	1139	3,91	3,59	4,21	3,99	3,49	3,53	4,24	4,28	3,76	3,50	3,90	3,91
3-nonen-2-one	1143	0,36	0,36	0,40	0,38	0,26	0,29	0,32	0,28	0,21	0,26	0,29	0,33
camfor	1144	0,24	0,31	0,29	0,31	0,22	0,26	0,31	0,30	0,31	0,26	0,25	0,26
cis-verbenol	1146	0,11	0,07	0,09	0,08	0,06	0,05	0,07	0,08	0,08	0,11	0,08	0,09
isoborneol	1157	0,20	0,19	0,22	0,22	0,19	0,19	0,24	0,22	0,25	0,24	0,25	0,22
isopinocampone	1160	0,20	0,19	0,18	0,18	0,18	0,19	0,19	0,18	0,20	0,24	0,22	0,25
pinocarvone	1162	1,40	1,30	1,63	1,57	1,37	1,36	1,64	1,69	1,72	1,65	1,77	1,78
borneol	1166	1,12	1,26	1,33	1,05	0,98	1,06	1,04	1,13	0,87	1,12	1,11	1,17
α -phellandren-8-ol	1168	0,28	0,31	0,30	0,31	0,29	0,24	0,32	0,28	0,40	0,44	0,42	0,46
isocamphopinone	1174	0,12	0,20	0,10	0,09	0,11	0,12	0,20	0,09	0,26	0,17	0,19	0,18
terpinen-4-ol	1177	0,64	0,57	0,99	1,01	0,72	0,66	0,87	0,94	1,24	1,16	1,20	1,21
p-methylacetophenone	1183	0,13	0,12	0,13	0,12	0,12	0,11	0,12	0,12	0,11	0,10	0,11	0,11
p-cymen-8-ol	1185	0,38	0,35	0,36	0,38	0,33	0,31	0,33	0,37	0,29	0,28	0,28	0,30
α -terpineol	1190	0,28	0,26	0,37	0,36	0,28	0,26	0,30	0,31	0,37	0,36	0,37	0,40
mirtenal	1193	0,48	0,46	0,55	0,54	0,47	0,46	0,57	0,60	0,56	0,52	0,55	0,59
mirtenol	1195	0,87	0,77	0,88	0,86	0,76	0,76	0,81	0,86	0,75	0,68	0,75	0,78
verbenona	1207	0,60	0,53	0,49	0,51	0,50	0,46	0,50	0,51	0,46	0,42	0,42	0,48
trans-carveol	1219	0,44	0,40	0,46	0,47	0,38	0,36	0,39	0,44	0,43	0,41	0,41	0,44
isobornil formato	1226	0,04	0,04	0,05	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04	0,02	0,03	0,03	0,03

Compuestos	IK	Agosto				Septiembre				Octubre			
		C	F	R	F + R	C	F	R	F + R	C	F	R	F + R
cis-carveol	1229	0,07	0,06	0,09	0,08	0,07	0,06	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
cis-ocimenona	1233	0,25	0,24	0,25	0,24	0,27	0,25	0,24	0,27	0,38	0,35	0,33	0,30
cuminaldehído	1238	0,18	0,17	0,17	0,17	0,16	0,17	0,18	0,19	0,17	0,16	0,17	0,18
trans-ocimenona	1241	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,08	0,08	0,08	0,07
d-carvona	1243	0,31	0,31	0,25	0,27	0,29	0,30	0,24	0,25	0,23	0,24	0,23	0,25
piperitona	1253	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,07
felandral	1272	0,16	0,16	0,15	0,15	0,14	0,14	0,14	0,15	0,14	0,14	0,14	0,15
bornil acetato	1285	3,19	3,44	3,30	3,00	2,90	3,17	3,26	3,04	2,98	3,18	3,30	3,31
timol	1290	0,13	0,12	0,12	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11	0,09	0,09	0,09	0,10
isocarveol	1293	0,14	0,13	0,15	0,14	0,19	0,16	0,19	0,20	0,26	0,27	0,26	0,27
trans-pinocarvil acetato	1296	0,21	0,22	0,21	0,21	0,18	0,22	0,24	0,22	0,22	0,21	0,23	0,22
carvacrol	1303	0,31	0,31	0,31	0,32	0,31	0,30	0,31	0,30	0,33	0,33	0,31	0,35
mirtenil acetato	1324	0,61	0,58	0,55	0,56	0,54	0,47	0,61	0,49	0,51	0,42	0,40	0,43
carvil acetato	1339	0,20	0,18	0,18	0,19	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,16	0,17	0,17
α -cubeno	1349	0,23	0,24	0,35	0,30	0,28	0,34	0,31	0,35	0,22	0,29	0,25	0,25
eugenol	1357	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,07	0,08	0,08	0,08
ciclosativeno	1362	0,62	0,60	0,66	0,68	0,70	0,70	0,74	0,70	0,64	0,66	0,65	0,60
α -copaeno	1371	0,45	0,41	0,57	0,57	0,52	0,48	0,56	0,56	0,51	0,53	0,48	0,47
α -ilangeno	1374	0,29	0,31	0,23	0,24	0,25	0,27	0,21	0,22	0,16	0,16	0,16	0,17
(+)-sativeno	1383	0,21	0,21	0,20	0,19	0,23	0,23	0,23	0,21	0,20	0,19	0,19	0,20
β -cubebeno	1389	0,05	0,04	0,03	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05
α -gurjuneno	1412	0,13	0,11	0,12	0,11	0,14	0,15	0,12	0,13	0,13	0,12	0,11	0,11
α -ionone, (e)	1425	0,03	0,03	0,02	nd	0,03	0,04	0,02	0,02	nd	nd	nd	0,02
aromandendreno	1434	0,25	0,27	0,21	0,20	0,27	0,30	0,23	0,22	0,19	0,19	0,19	0,18
aloaromadendreno	1454	1,09	1,03	1,28	1,26	1,27	1,21	1,30	1,33	1,21	1,23	1,14	1,16
γ -muuroleno	1472	0,21	0,20	0,24	0,24	0,23	0,22	0,24	0,23	0,21	0,22	0,20	0,20
β -selineno	1478	0,23	0,17	0,32	0,26	0,29	0,31	0,37	0,30	0,33	0,26	0,27	0,30

Compuestos	IK	Agosto				Septiembre				Octubre			
		C	F	R	F + R	C	F	R	F + R	C	F	R	F + R
β-ionone	1483	0,10	0,10	0,13	0,12	0,12	0,12	0,14	0,12	0,13	0,15	0,14	0,14
viridifloreno	1488	1,59	1,66	1,41	1,43	1,82	1,89	1,60	1,50	1,28	1,46	1,25	1,29
a-muuroleño	1494	0,23	0,22	0,30	0,29	0,27	0,25	0,31	0,28	0,25	0,27	0,26	0,25
γ-cadineno	1506	0,28	0,27	0,31	0,31	0,28	0,27	0,28	0,27	0,22	0,21	0,20	0,20
calameneno	1517	0,57	0,55	0,66	0,60	0,60	0,56	0,71	0,57	0,51	0,53	0,54	0,47
δ-cadineno	1518	0,56	0,60	1,01	0,84	0,82	0,68	1,01	0,87	0,80	1,08	0,87	0,81
α-calacoreno	1536	0,64	0,66	0,61	0,69	0,67	0,65	0,67	0,67	0,60	0,67	0,58	0,59
palustrol	1559	0,93	0,94	0,84	0,86	0,96	0,96	0,86	0,87	0,76	0,76	0,74	0,72
spatuleno	1570	1,47	1,37	1,61	1,57	1,45	1,40	1,46	1,51	1,27	1,14	1,08	1,12
cariofileno oxido	1574	0,15	0,13	0,21	0,16	0,13	0,19	0,15	0,16	0,14	0,16	0,15	0,11
viridiflorol	1585	20,38	21,09	17,98	18,76	20,03	20,16	17,86	18,69	15,97	17,03	15,74	15,73
ledol	1594	8,92	9,25	8,59	8,78	9,08	9,18	8,74	8,27	7,26	7,41	7,25	6,59
1-epi-cubenol	1621	0,93	0,93	1,05	0,94	0,92	0,90	1,04	0,92	0,82	0,91	0,85	0,79
isospatuleno	1631	0,22	0,23	0,17	0,19	0,21	0,21	0,17	0,17	0,14	0,14	0,13	0,13
α-muurolol	1635	0,55	0,55	0,62	0,62	0,55	0,52	0,60	0,54	0,44	0,47	0,44	0,39
β-eudesmol	1641	1,29	1,19	1,28	1,24	1,23	1,39	1,44	1,21	1,14	0,86	1,04	0,95
α-cadinol	1649	0,38	0,36	0,45	0,42	0,37	0,35	0,30	0,33	0,28	0,26	0,25	0,19
cadaleno	1668	1,31	1,17	1,03	0,98	1,16	1,23	1,18	1,06	0,94	0,99	0,88	0,76
ambrox	1749	0,40	0,44	0,38	0,42	0,40	0,44	0,35	0,41	0,49	0,49	0,46	0,47
benzil benzoato	1765	0,22	0,22	0,17	0,18	0,18	0,19	0,16	0,17	0,17	0,17	0,16	0,16
6-oxoisoambrox	1838	0,08	0,08	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04
sclareoloxido	1875	0,26	0,28	0,22	0,24	0,28	0,29	0,24	0,26	0,24	0,26	0,22	0,23
15-nor-labdan-8-ol	1961	2,12	2,40	1,46	1,63	1,91	2,32	1,34	1,50	1,26	1,34	1,28	1,36
16-kaureno	2020	1,04	1,03	0,76	0,85	0,92	0,83	0,67	0,81	0,81	0,81	0,81	0,75
Monoterpenos hidrocarbonados		7,85	6,38	12,65	12,03	10,12	8,39	13,10	12,83	19,08	18,28	20,02	19,91
monoterpenos oxigenados		14,77	14,05	16,00	15,42	13,77	13,59	15,49	15,93	15,99	15,38	16,07	16,60
Sesquiterpenos hidrocarbonados		8,99	8,79	9,64	9,31	9,97	9,86	10,21	9,63	8,55	9,25	8,39	8,16

Compuestos	IK	Agosto				Septiembre				Octubre			
		C	F	R	F + R	C	F	R	F + R	C	F	R	F + R
Sesquiterpenos oxigenados		35,63	36,48	33,11	33,95	35,35	35,70	32,96	33,06	28,69	29,64	28,13	27,18
Diterpenos hidrocarbonados		1,04	1,03	0,76	0,85	0,92	0,83	0,67	0,81	0,81	0,81	0,81	0,75
Otros		10,36	10,75	8,97	9,01	8,91	9,59	8,35	8,23	7,48	7,63	7,74	8,02
Total Identificado (%)		78,63	77,48	81,13	80,57	79,03	77,96	80,78	80,49	80,61	80,98	81,16	80,62

Control (C), Fertilización (F), Riego (R), Fertilización + Riego (F + R).

Tabla 21. Composición química (%) del aceite esencial de *C. ladanifer* para los tres tratamientos y las dos poblaciones (Tabla completa, capítulo 6).

Compuestos	Guijo de Granadilla			Plasencia			
	IK	Fresco	Secado natural	Secado 40 °C	Fresco	Secado natural	Secado 40 °C
triciclono	924	0,16	0,18	0,13	0,06	0,12	0,03
1-methylcycloheptanol	926	0,07	0,10	0,09	0,05	0,05	0,08
a-tuyeno	928	0,07	0,11	0,07	0,08	0,13	0,04
α -pineno	936	11,33	14,57	6,99	14,46	17,67	5,50
canfeno	951	1,35	1,47	1,00	0,66	0,83	0,30
thuja-2,4(10)-dieno	956	0,17	0,22	0,19	0,20	0,26	0,20
benzaldehido	962	0,05	0,10	0,06	0,14	0,20	0,20
6-methyl-6-hepten-2-one	969	0,02	0,02	0,02	nd	nd	0,02
sabineno	975	0,29	0,12	0,05	0,45	0,21	0,05
β -pineno	978	0,16	0,20	0,14	0,15	0,17	0,07
6-methyl-5-hepten-2-one	988	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02
β -mirceno	992	0,14	0,18	0,15	0,15	0,19	0,15
δ -2-careno	998	nd	0,01	nd	nd	nd	0,02
trans-2-(2-pentenyl)-furan	1002	nd	nd	nd	nd	0,02	nd
α -phellandreno	1005	0,11	0,15	0,13	0,12	0,17	0,11
α -terpineno	1018	0,18	0,25	0,18	0,20	0,34	0,17
β -felandreno	1023	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03
p-cimeno	1026	1,59	1,74	1,16	1,95	1,77	1,20
limoneno	1030	0,91	0,97	0,48	1,09	0,97	0,39
1,8-cineol	1033	0,15	0,18	0,13	0,17	0,20	0,15
2,2,6-trimetilciclohexano	1037	0,98	1,03	0,99	0,76	0,92	0,73
γ -terpineno	1061	0,52	0,66	0,48	0,55	0,75	0,43
acetofenona	1067	0,05	0,08	0,06	0,06	0,10	0,08
cis-linalol oxido	1073	0,23	0,35	0,31	0,23	0,31	0,33
canfelinona	1083	0,02	0,03	0,02	nd	nd	0,03
p-cimeno	1090	0,42	0,69	0,63	0,62	0,70	0,65
linalol	1100	0,11	0,14	0,20	0,12	0,17	0,19
hotrienol	1105	0,12	0,18	0,10	0,19	0,26	0,17
cis-rosa oxido	1112	0,06	0,09	0,12	0,13	0,17	0,17
β -fenchol	1114	0,04	0,05	0,04	nd	nd	0,05
α -tujona	1116	0,04	0,05	0,04	0,04	0,05	0,04
α -camfolenal	1126	0,87	1,13	1,05	0,91	1,16	1,01
trans-rosa oxido	1129	0,08	0,22	0,09	0,06	0,07	0,09
l-trans-pinocarveol	1139	2,97	3,50	3,00	3,14	3,67	3,38
3-nonen-2-one	1143	0,25	0,20	0,24	0,22	0,20	0,20
camfor	1144	0,22	0,30	0,24	0,14	0,20	0,21
cis-verbenol	1146	0,04	0,07	0,05	0,06	0,09	0,07
isoborneol	1157	0,21	0,29	0,21	0,20	0,33	0,33
isopinocamfone	1160	0,15	0,16	0,18	nd	0,18	0,24
pinocarvone	1162	1,69	1,83	1,47	1,91	2,08	1,52
borneol	1166	0,88	0,86	0,85	0,55	0,63	0,61
α -phellandren-8-ol	1168	0,30	0,42	0,39	0,33	0,58	0,48
isocamphopinone	1174	0,06	0,07	0,07	0,04	0,05	0,05

Compuestos	Guijo de Granadilla				Plasencia		
	IK	Fresco	Secado natural	Secado 40 °C	Fresco	Secado natural	Secado 40 °C
terpinen-4-ol	1177	1,20	1,39	1,04	1,46	1,63	1,28
p-methylacetophenone	1183	0,12	0,12	0,11	0,14	0,15	0,14
p-cymen-8-ol	1185	0,22	0,29	0,26	0,26	0,28	0,33
α -terpineol	1190	0,38	0,44	0,38	0,39	0,46	0,40
mirtenal	1193	0,54	0,61	0,51	0,58	0,63	0,61
mirtenol	1195	0,64	0,74	0,73	0,66	0,75	0,87
verbenona	1207	0,23	0,44	0,43	0,24	0,34	0,41
trans-carveol	1219	0,33	0,42	0,40	0,36	0,43	0,46
isobornil formato	1226	0,02	0,02	0,02	nd	nd	0,02
cis-carveol	1229	0,07	0,09	0,08	0,08	0,09	0,10
cis-ocimenona	1233	0,36	0,39	0,40	0,44	0,43	0,51
cuminaldehído	1238	0,13	0,16	0,15	0,14	0,15	0,15
trans-ocimenona	1241	0,06	0,07	0,08	0,08	0,09	0,10
d-carvona	1243	0,21	0,25	0,23	0,20	0,22	0,28
piperitona	1253	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,07
felandral	1272	0,14	0,15	0,15	0,15	0,16	0,18
bornil acetato	1285	2,62	3,08	2,80	2,36	2,42	2,35
timol	1290	0,08	0,09	0,10	0,08	0,08	0,11
isocarveol	1293	0,21	0,26	0,30	0,23	0,26	0,26
trans-pinocarvil acetato	1296	0,21	0,21	0,20	0,25	0,25	0,22
carvacrol	1303	0,27	0,36	0,36	0,23	0,23	0,39
mirtenil acetato	1324	0,34	0,51	0,43	0,42	0,41	0,45
carvil acetato	1339	0,14	0,18	0,17	0,20	0,22	0,17
α -cubeneno	1349	0,18	0,21	0,24	0,12	0,14	0,16
eugenol	1357	0,05	0,09	0,10	0,09	0,12	0,09
ciclosativeno	1362	0,63	0,58	0,64	0,61	0,62	0,63
α -copaeno	1371	0,49	0,48	0,51	0,45	0,47	0,49
α -ilangeno	1374	0,15	0,15	0,19	0,11	0,11	0,16
(+)-sativeno	1383	0,14	0,18	0,22	0,09	0,09	0,16
β -cubebeno	1389	nd	0,04	0,05	nd	0,05	0,06
a-gurjuneno	1412	0,12	0,14	0,14	0,12	0,10	0,11
aromandendreno	1434	0,16	0,16	0,23	0,13	0,09	0,16
aloaromadendreno	1454	1,14	1,15	1,25	1,05	1,03	1,12
γ -muuroleno	1472	0,19	0,19	0,23	0,17	0,17	0,22
β -selineno	1478	0,21	0,30	0,26	0,19	0,13	0,23
β -ionone	1483	0,10	0,12	0,11	0,07	0,13	0,09
viridifloreño	1488	1,26	1,29	1,80	1,05	1,06	1,39
a-muuroleno	1494	0,24	0,23	0,28	0,16	0,22	0,34
γ -cadineno	1506	0,19	0,21	0,26	0,14	0,16	0,21
calameneno	1517	0,52	0,43	0,47	0,35	0,36	0,42
δ -cadineno	1518	0,84	0,75	0,80	0,54	0,60	0,68
α -calacoreno	1536	0,65	0,62	0,75	0,57	0,57	0,73
palustrol	1559	0,72	0,69	0,89	0,63	0,63	0,86
spatulanol	1570	1,38	1,33	1,31	1,32	1,05	1,62
cariofileno oxido	1574	0,17	0,12	0,32	0,21	0,18	0,17
viridiflorol	1585	17,19	14,69	19,35	17,00	15,55	19,15

Compuestos	Guijo de Granadilla				Plasencia		
	IK	Fresco	Secado natural	Secado 40 °C	Fresco	Secado natural	Secado 40 °C
ledol	1594	8,70	6,53	7,94	8,27	6,93	9,61
1-epi-cubenol	1621	0,87	0,70	0,90	0,77	0,77	1,02
isopatulol	1631	0,17	0,15	0,17	0,16	0,13	0,17
α -muurolol	1635	0,53	0,40	0,47	0,41	0,34	0,50
β -eudesmol	1641	1,12	0,94	0,69	1,13	0,74	1,23
α -cadinol	1649	0,36	0,26	0,35	0,28	0,21	0,32
cadaleno	1668	0,83	0,74	1,07	1,20	1,00	1,56
ambrox	1749	0,54	0,52	0,57	0,45	0,38	0,48
benzil benzoato	1765	0,19	0,17	0,20	0,22	0,18	0,26
6-oxoisoambrox	1838	0,07	0,06	0,06	0,04	0,18	0,03
sclareoloxido	1875	0,31	0,25	0,27	0,32	0,31	0,33
15-nor-labdan-8-ol	1961	1,85	1,23	1,66	2,06	1,64	1,86
16-kaureno	2020	1,30	0,84	0,99	0,74	0,52	0,57
Monoterpenos hidrocarbonados		17,40	21,56	11,77	20,73	24,25	9,31
monoterpenos oxigenados		13,17	16,18	14,24	13,78	16,45	15,56
Sesquiterpenos hidrocarbonados		8,00	7,95	9,50	6,97	7,00	8,92
Sesquiterpenos oxigenados		31,74	26,33	32,95	30,63	26,91	35,11
Diterpenos hidrocarbonados		1,30	0,84	0,99	0,74	0,52	0,57
Otros		7,28	7,42	7,40	7,24	7,22	7,16
Total Representado		59,37	58,48	55,53	61,42	61,67	55,38

ANEXO 2. DATOS EDAFOLÓGICOS y CLIMÁTICOS

En este Anexo se exponen los resultados de los análisis edafológicos y climáticos de cada una de las poblaciones ensayadas en la Tesis Doctoral.

Tabla 22. Variables edáficas estimas en las 12 parcelas de *C. ladanifer* distribuidas en 4 poblaciones y dos tipos de suelo.

Variables Edáficas											
Suelo	zona	Población	pH	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Materia orgánica (%)	Nitrógeno Total (%)	P Olsen (mg/Kg)	C.I.C (meq/100 gr)	Arena	Arcilla	Limo
Pizarra	A	PdZ	5,8	9,88	0,96	0,09	< 2,5	19,5	77,16	17,86	4,98
Pizarra	A	PdZ	5,2	11,7	1,03	0,06	< 2,5	22,6	59,65	12,92	27,43
Pizarra	A	PdZ	5,2	12,39	0,54	0,06	< 2,5	6,9	67,21	6,67	26,12
Pizarra	B	VdF	5,1	10,27	0,92	0,06	<2,5	5,7	80,05	5,32	14,63
Pizarra	B	VdF	5,1	10,27	0,73	0,08	<2,5	8,1	77,33	15,26	7,41
Pizarra	B	VdF	5,2	10,69	0,59	0,07	<2,5	14,7	81,84	7,52	10,64
Granito	C	TdDM	5,3	12,09	1,04	0,04	<2,5	11,2	80,34	2,84	16,83
Granito	C	TdDM	5,4	9,28	0,98	0,08	<2,5	18,6	80,15	17,43	2,43
Granito	C	TdDM	5,3	11,09	1,03	0,06	<2,5	14,4	77,33	7,85	14,81
Granito	D	VdG	5,2	10,52	1,01	0,08	<2,5	16,3	82,66	14,93	2,42
Granito	D	VdG	5,2	10,7	1,2	0,05	<2,5	13,8	79,7	5,41	14,89
Granito	D	VdG	5,2	11,09	1,29	0,06	<2,5	9,1	77,33	17,73	4,94

Pozuelo de Zarzón (PdZ); Valverde del fresno (VdF); Torre de Don Miguel (TdDM); Villasbuenas de Gata (VdG).

Tabla 23. Variables climáticas estimadas en las 12 parcelas de *C. ladanifer* distribuidas en 4 poblaciones y dos tipos de suelo.

Pozuelo de zarzón						Valverde del fresno				
Mes	Tmax (°C)	Tmin (°C)	Tmed (°C)	Vmax (Km/h)	TPrec (mm)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	Tmed (°C)	Vmax (Km/h)	TPrec (mm)
Enero	13,1	3,4	8,2	16,1	55,1	13,0	4,4	8,7	18,0	99,4
Febrero	13,5	4,1	8,8	19,5	75,3	13,0	4,3	8,7	21,8	102,3
Marzo	17,1	5,5	11,3	19,9	66,5	16,4	5,8	11,1	22,2	93,6
Abril	20,9	8,9	14,9	19,0	69,7	19,7	8,8	14,2	19,5	93,4
Mayo	25,2	11,5	18,3	18,6	42,3	23,8	11,7	17,7	21,6	52,2
Junio	30,9	15,8	23,3	18,7	8,4	29,2	15,8	22,5	21,7	13,4
Julio	34,6	18,0	26,3	18,0	5,5	33,1	18,5	25,8	22,0	5,0
Agosto	34,8	18,1	26,5	18,7	2,5	33,8	18,9	26,3	23,8	4,7
Septiembre	30,1	15,3	22,7	16,7	33,2	29,3	15,8	22,6	20,2	56,3
Octubre	23,9	12,0	17,9	14,8	101,9	23,1	12,3	17,7	17,3	98,5
Noviembre	16,6	6,9	11,7	16,0	83,4	16,1	7,4	11,8	18,7	102,1
Diciembre	13,6	3,5	8,6	13,5	50,1	13,8	4,2	9,0	16,4	61,6

Torre de Don Miguel						Villasbuenas de Gata				
Mes	Tmax (°C)	Tmin (°C)	Tmed (°C)	Vmax (Km/h)	TPrec (mm)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	Tmed (°C)	Vmax (Km/h)	TPrec (mm)
Enero	12,9	2,9	7,9	16,9	51,8	12,4	4,4	8,4	18,8	120,9
Febrero	12,8	3,4	8,1	20,1	100,8	12,5	4,2	8,3	21,1	123,8
Marzo	17,1	4,7	10,9	20,3	47,2	15,8	5,8	10,8	21,6	123,7
Abril	20,3	7,8	14,0	18,8	84,9	19,1	8,6	13,8	19,1	107,8
Mayo	24,2	10,2	17,2	20,2	51,4	23,3	11,4	17,4	20,3	61,4
Junio	29,9	14,1	22,0	20,4	6,7	29,1	15,8	22,5	21,4	18,0
Julio	34,5	16,9	25,7	21,6	2,8	33,1	18,4	25,8	21,6	5,5
Agosto	34,1	16,9	25,5	22,6	4,5	33,6	19,2	26,4	22,4	4,7
Septiembre	29,8	14,2	22,0	18,1	50,7	29,0	16,4	22,7	19,7	30,5
Octubre	22,4	10,9	16,6	14,8	110,5	22,6	12,3	17,5	15,7	119,0
Noviembre	15,9	6,1	11,0	16,0	103,0	15,7	7,2	11,5	17,8	124,2
Diciembre	14,0	2,8	8,4	13,8	83,0	13,2	4,7	8,9	15,8	73,0

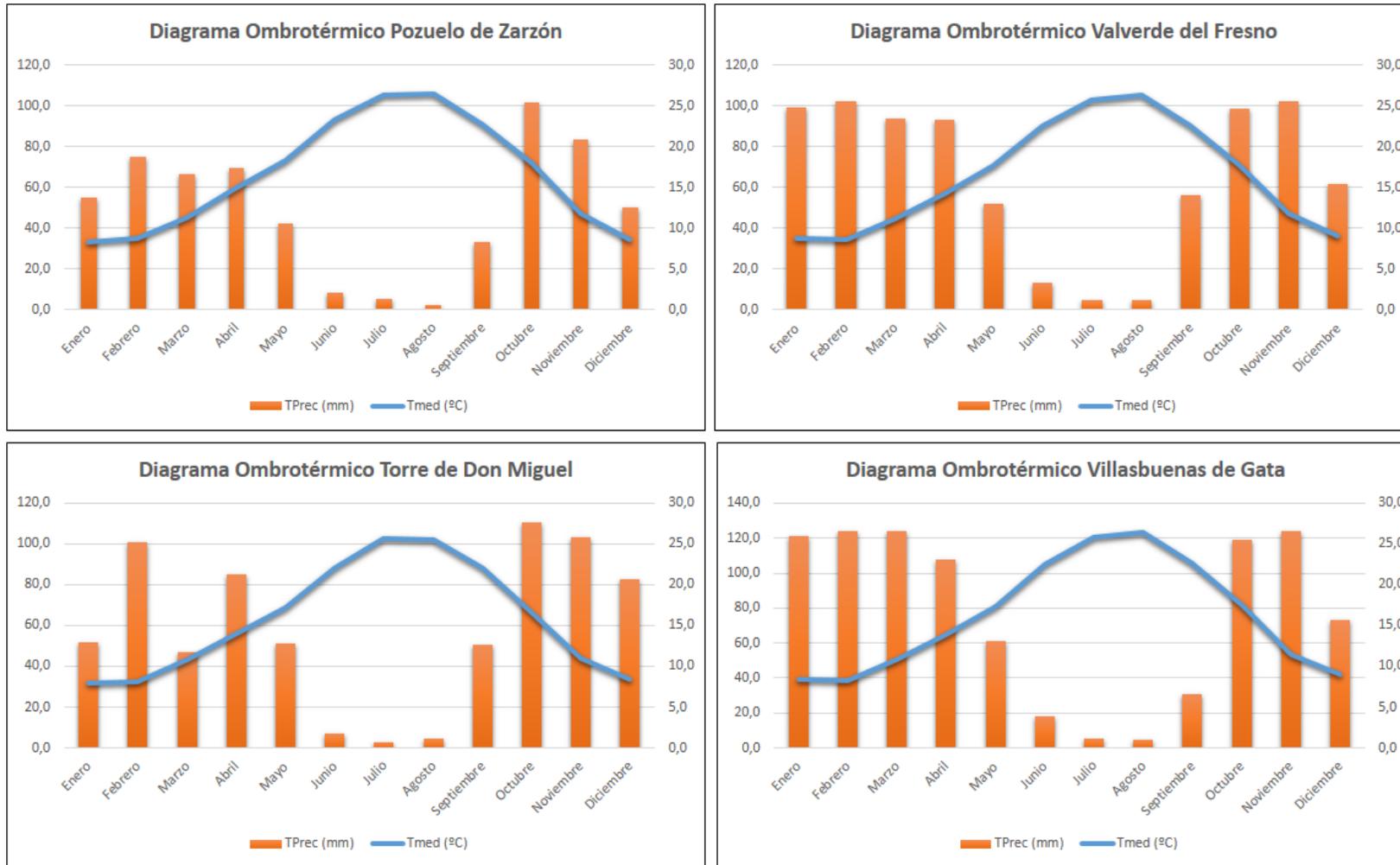


Figura 34. Diagrama ombroclimático para la Variación mensual de la precipitación total acumulada (mm) y la temperatura media (°C).

Tabla 24. Variables climáticas estimadas en la población de Guijo de Granadilla.

Guijo de Granadilla					
Mes	Tmax (°C)	Tmin (°C)	Tmed (°C)	Vmax (Km/h)	TPrec (mm)
Enero	12,6	3,6	8,1	17,8	59,0
Febrero	14,5	4,6	9,5	19,4	69,5
Marzo	17,4	5,9	11,6	20,6	67,1
Abril	20,3	8,9	14,6	19,7	80,9
Mayo	25,6	12,5	19,0	19,6	35,1
Junio	30,4	16,1	23,2	19,9	9,7
Julio	34,8	19,3	27,0	19,6	5,7
Agosto	34,4	19,1	26,8	20,0	8,7
Septiembre	29,9	16,1	23,0	18,5	33,7
Octubre	23,3	12,1	17,7	17,2	88,8
Noviembre	16,2	7,5	11,8	17,6	66,4
Diciembre	13,3	4,1	8,7	16,3	64,0