



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL, ECOLOGÍA Y
CIENCIAS DE LA TIERRA.

ÁREA DE ECOLOGÍA

***VARIACIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO
EN PLANTAS DEBIDA AL GENOTIPO Y AL
AMBIENTE***

Memoria que presenta la licenciada Dña. **Cristina Valares Masa**
para optar al Grado de Doctora en Ciencias
por la Universidad de Extremadura

Badajoz, Mayo 2011.

***Edita: Universidad de Extremadura
Servicio de Publicaciones***

Caldereros 2. Planta 3ª
Cáceres 10071

Correo e.: publicac@unex.es

<http://www.unex.es/publicaciones>

Dra. Natividad Chaves Lobón, profesora titular del Área de Ecología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura y la Dra. Teresa Sosa Díaz, profesora colaboradora del Área de Ecología

CERTIFICAN:

Que la memoria descrita en este trabajo con el título “**Variación del Metabolismo Secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente**”, ha sido realizada bajo su dirección por **Cristina Valares Masa**, en el Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra (Área de Ecología) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura y que, salvo mejor criterio del tribunal que ha de juzgarlo, reúne todas las condiciones para poder optar al **Grado de Doctora en Ciencias**.

Para que así conste, firma la presente a 20 de Mayo de 2011.

Fdo. Natividad Chaves Lobón

Fdo. Teresa Sosa Díaz.

"Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos".

Aristóteles.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que me han acompañado en esta aventura que inicié hace unos años. Gracias a ellas, en parte, soy lo que soy. Ahora ha llegado el momento de cerrar un capítulo, de pasar página, y no puedo hacerlo sin antes agradecerles todo lo que me han dado...

A mis directoras, Dra. Natividad Chaves Lobón y Dra. Teresa Sosa Díaz. A Nati por haberme permitido incorporarme en su grupo de investigación con total libertad y autonomía y por confiar en mí y apoyarme siempre. A Tere por su dedicación, paciencia y sobre todo por su tiempo dedicado en la realización de los experimentos.

Especial agradecimiento al Dr. Juan Carlos Alías, compañero de viaje y laboratorio incondicional, por estar ahí siempre que lo necesité, apoyarme en todo momento y darme ánimos para continuar.

A todos los compañeros y profesores del Área de Ecología Dr. José Cabezas, al Dr. José Martín, a la Dra. Encarnación García, a Paquita... por prestarse gentilmente a resolver cuantos problemas o dudas me surgieron en este tiempo.

También quiero agradecer al Área de Fisiología Vegetal, al Dr. Francisco Espinosa, a la Dra. Inmaculada Garrido y a Ana, por enseñarme y ayudarme con los cultivos in Vitro. También agradecer al Dr. Manolo Mota por su paciencia y su siempre disposición en la resolución de mis dudas estadísticas.

A la Consejería de Economía, Comercio e Innovación de la Junta de Extremadura por concederme una beca de investigación para Formación de Personal Investigador: 3PRO5A084.

Agradecer especialmente a una persona muy importante en mi vida. Gracias Iván por dedicar parte de tu tiempo a ayudarme en el trabajo de laboratorio y de campo, por apoyarme en todo momento y por compartir conmigo todos estos años de mi vida... y todos los que vendrán.

A todos mis compañeros y amigos que he tenido durante estos años en la universidad, por seguir regalándome su amistad. En especial a Nines, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas y por apoyarme siempre que lo necesité y a Fran, que siempre está ahí cuando se le necesita.

A mis amigos de Miajadas y Badajoz, por dejarme contar con ellos siempre que lo he necesitado y por los buenos momentos que hemos compartido y que me han ayudado a “recargar pilas” para seguir con el trabajo diario.

A mi familia: padres, abuelos, tíos, primos, cuñados, sobrinos... que sin saber muy bien lo que he estado haciendo me han ayudado en los momentos difíciles. Agradecer especialmente a mis padres y hermanos. A los primeros, por haberme proporcionado siempre los mejores apoyos emocionales y materiales, por haberme educado en esos valores en los que me siento tan orgullosa y estar siempre a mi lado. A mis hermanos por su cariño y apoyo.

GRACIAS A TODOS

CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	13
I.1. Aspectos generales del metabolismo secundario en plantas.....	15
I.2. Funciones ecológicas de los compuestos derivados del metabolismo secundario.....	19
I.3. Descripción de <i>Cistus ladanifer</i> L.....	21
I- 3. 1. Descripción morfológica de <i>Cistus ladanifer</i>	21
I- 3. 2. Descripción ecológica de <i>Cistus ladanifer</i>	22
I- 3. 3. Exudado de <i>Cistus ladanifer</i>	24
I. 3. 4. Funciones de los metabolitos secundarios en <i>Cistus ladanifer</i>	25
I.4. Variabilidad intrapoblacional en el metabolismo secundario.....	29
II. OBJETIVOS.....	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
III.1. Procedimiento para cuantificar la variabilidad del metabolismo secundario en <i>Cistus ladanifer</i> como respuesta al ambiente.....	41
III.1.1. Descripción de la zona.....	41
III.1.2. Recogida de muestras.....	43
III.1.3. Determinación de la edad.....	44
III.1.4. Relación de la altura y diámetro según la edad en <i>Cistus ladanifer</i>	45
III.1.5. Extracción del exudado.....	47

III.1.6. Análisis de la muestra	47
III.1.7. Cuantificación de los metabolitos secundarios de <i>Cistus ladanifer</i>	51
III.2. Variación de los compuestos del metabolismo secundario entre los individuos de una población de <i>Cistus ladanifer</i>	55
III.2.1. Descripción de la zona de muestreo y recogida de muestras.....	55
III.2.2. Extracción del exudado y análisis de las muestras.....	56
III.2.3. Cuantificación de los compuestos del metabolismo secundario.....	56
III.3. Variación de los compuestos del metabolismo secundario en diferentes poblaciones de <i>Cistus ladanifer</i>	57
III.3.1. Descripción de las zonas de muestreo.....	57
III.3.2. Extracción del exudado y análisis de las muestras.....	59
III.3.3. Cuantificación de los compuestos del metabolismo secundario.....	59
III.4. Variación de los compuestos del metabolismo secundario en clones de <i>Cistus ladanifer</i>	61
III.4.1. Material vegetal.....	61
III.4.2. Cultivo y obtención de clones.....	62
III.4.3. Diseño experimental.....	64
III.4.4. Respuesta del genotipo al ambiente.....	66
III.4.4.1. Normas de reacción.....	67
III.4.4.2. Estudio de heredabilidad.....	68
III.5. Análisis estadístico.....	71
III.5.1. Análisis estadístico en la cuantificación de la variabilidad en los metabolitos secundarios.....	71
III.5.1.1. Entre estaciones, órganos, edades y años.....	71
III.5.1.2. Intrapoblacional: en una población de <i>C. ladanifer</i>	71
III.5.1.3. Interpoblacional: en varias poblaciones de <i>Cistus ladanifer</i>	72

III.5.1.4. Entre clones de <i>Cistus ladanifer</i>	72
III.5.2. Análisis Clúster.....	72
III.5.3. Análisis de las Componentes de la varianza.....	73
III.5.3.1. Variación inter e intrapoblacional.....	74
III.5.3.2. Estimación de la heredabilidad.....	74
IV. RESULTADOS	75
IV.1. Variación cuantitativa de compuestos del metabolismo secundario en hojas jóvenes, maduras y tallos de <i>Cistus ladanifer</i>	77
IV.2. Variación cuantitativa estacional de compuestos del metabolismo secundario en hojas jóvenes, maduras y tallos de <i>Cistus ladanifer</i>	81
IV.3. Variación cuantitativa interanual de compuestos del metabolismo secundario en hojas jóvenes, maduras y tallos de <i>Cistus ladanifer</i>	91
IV.4. Variación cuantitativa por edad de los compuestos del metabolismo secundario en hojas jóvenes, maduras y tallos de <i>Cistus ladanifer</i>	99
IV.5. Variabilidad en la secreción de flavonoides y diterpenos en el exudado de <i>Cistus ladanifer</i>	103
IV.5.1. Variabilidad entre hojas jóvenes, maduras y tallos	103
IV.5.2. Variabilidad estacional.....	105
IV.5.3. Variabilidad por edades.....	109
IV.5.4. Variabilidad anual.....	111
IV.6. Variación intrapoblacional de los compuestos del metabolismo secundario en <i>Cistus ladanifer</i>	113
IV.6.1. Distribución espacial de los individuos de la población estudiada...	120

IV.7. Variabilidad interpoblacional de los compuestos del metabolismo secundario en <i>Cistus ladanifer</i>	123
IV.7.1. Diferencias y similitudes entre las poblaciones muestreadas.....	123
IV.7.2. Relación de la síntesis de los compuestos del metabolismo secundario con las variables ambientales.....	135
IV.7.3. Estimación de la variabilidad intra en interpoblacional.....	136
IV.8. Respuesta del genotipo de <i>Cistus ladanifer</i> a diferentes ambientes.....	141
IV.8.1. Estudio de las normas de reacción en <i>Cistus ladanifer</i>	141
IV.8.2. Estimación de la heredabilidad en <i>Cistus ladanifer</i>	149
V. DISCUSIÓN.....	153
VI. CONCLUSIONES.....	177
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	183
ANEXO I	205
ANEXO II	211

INTRODUCCIÓN

I.1. ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN PLANTAS

Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes esenciales para la vida celular y en la planta en general. Estos procesos constituyen, en su conjunto, el metabolismo primario. Además de estos procesos metabólicos primarios, se pueden desarrollar rutas que conducen a la formación de compuestos denominados metabolitos secundarios.

Se denominan metabolitos secundarios de las plantas a los compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales en ellas, ya que no intervienen en el metabolismo primario, pero les confiere unas claras ventajas selectivas interviniendo en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente.

El término de “*metabolismo secundario*” fue introducido en 1891 por Kossel (citado en Baas, 1989): “Mientras que los metabolitos primarios están presentes en cada célula de la planta que es capaz de reproducirse, los metabolitos secundarios están presentes sólo accidentalmente y no son imprescindibles para la vida”. Muchos pueden ser secretados dentro de las células, en vacuolas, o excretados extracelularmente como resinas o material de la pared celular.

Durante muchos años el valor adaptativo de la mayoría de los metabolitos secundarios fue desconocido. En principio, fueron considerados productos finales de procesos metabólicos, sin función específica, o directamente como productos de desecho de las plantas. En general, fueron percibidos como insignificantes por los biólogos, por lo que históricamente han recibido poca atención por parte de los botánicos y muchas de las funciones aún son desconocidas. El estudio de estas sustancias fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX y de principios del siglo XX, que estaban interesados en estas sustancias por su importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, y otros materiales utilizados en la industria (Taiz y col., 2006).

Las condiciones ambientales, tales como la falta de nutrientes y déficit de agua, pueden restringir el crecimiento de las plantas y reducir la velocidad fotosintética. En tales condiciones, carbohidratos no estructurales tienden a ser acumulados y pueden explicar el aumento de síntesis de sustancias de defensas basadas en carbono pertenecientes al metabolismo secundario. La confirmación de este balance en carbono/nutrientes ha sido encontrada en especies que se desarrollan en medios con baja disponibilidad de nutrientes o de agua, en las que se produce un aumento en la concentración de taninos condensados, lignina, fenoles totales y/o glicósidos de fenoles (Bryant y col., 1995; Gershenzon, 1984).

Los compuestos que forman parte del metabolismo secundario (Figura 1) se clasifican en diferentes tipos: fenoles, terpenoides, compuestos nitrogenados o alcaloides, según Harborne (1985). Dos grupos de compuestos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas son los fenoles y los terpenos. Sólo una tercera parte de especies conocidas contienen metabolitos basado en el nitrógeno, como alcaloides o glucosinolatos (Harborne, 1997).

Los fenoles son compuestos químicos con al menos un anillo aromático que contienen uno o más grupos hidroxilos. Muchos de estos compuestos aparecen como compuestos derivados de reacciones de condensación y adición, dando así lugar a una gran variedad de compuestos químicos en las plantas (Harborne, 1980; Strack, 1997). La importancia de los fenoles radica en que producen soporte mecánico a la planta, contribuyen en la coloración de las flores y frutos, protegen contra patógenos y herbívoros y tienen una gran efectividad protegiendo los tejidos frente a la radiación UV (Strack, 1997).

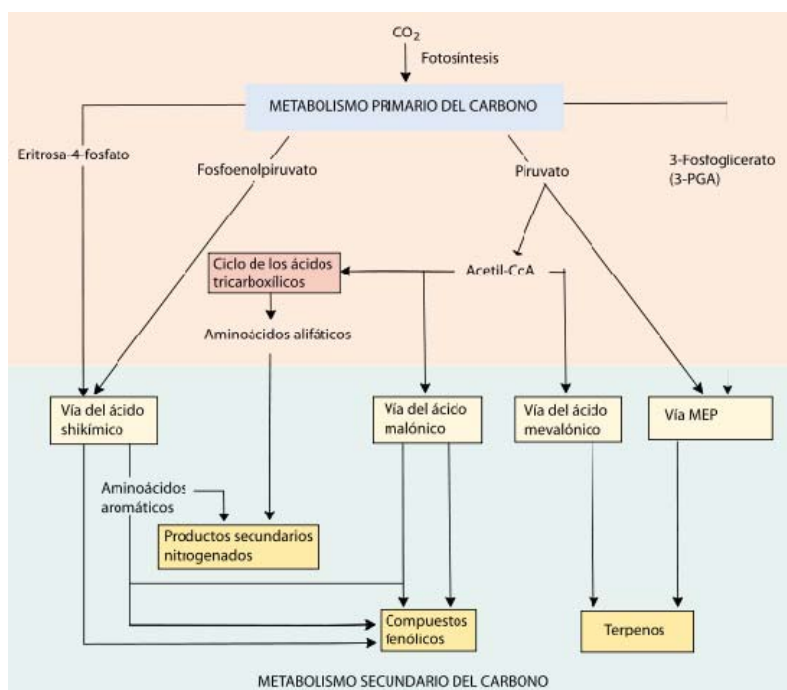


Figura 1. Vías generales del metabolismo secundario de las plantas, que producen los tres tipos generales de compuestos secundarios: productos nitrogenados, productos fenólicos y terpenos (Taiz y col., 2006).

Los terpenos son la familia más amplia de compuestos en plantas (Connolly y Hill, 2001; Harborne, 1997). Estos compuestos están constituidos por dos o más unidades de isopreno (5 átomos de carbono) unidas. La nomenclatura de los terpenos refleja el número de unidades de isopreno presentes (Bramley, 1997). Los terpenos participan en diferentes funciones en plantas, como por ejemplo la hormonal, en pigmentos fotosintéticos, balance electrónico y como componentes en membranas (Mc Garvey y Croteau, 1995). Además, algunos terpenos actúan como defensa en la planta, atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas (Harborne, 1991).

I.2. FUNCIONES ECOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS DERIVADOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO

Los metabolitos secundarios no son producidos al azar, ya que han sido modelados y optimizados durante la evolución (Jarvis, 2000). Su estudio ha implicado diversas ramas de la ciencia como la Ecología, Química Orgánica, Bioquímica, Zoología, Botánica, Sistemática, Micología, Fisiología, Biología Evolutiva, Agronomía, Antropología e incluso Arqueología (Seigler, 1998). Estos compuestos intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, y pueden desempeñar una amplia variedad de funciones ecológicas en la planta.

La mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra depredadores y patógenos. Estas moléculas inhiben el desarrollo de insectos (Stamp y col., 1997; Zhang y col., 1999), nemátodos (Blum, 1996), hongos (Oliva y col., 1999) y bacterias (Grayer y Harborne, 1994), mejorando el crecimiento de la planta y la consistencia. En frutas y verduras, elevadas concentraciones de flavonoides originan una baja incidencia de patógenos (Lattanzio y col., 1994). También incluyen compuestos venenosos, donde la concentración puede reducir la digestibilidad de la planta y la palatabilidad de los herbívoros (Lindroth y Batzli, 1984; Baas, 1989; Sosa y col., 2004). Los que reducen la digestibilidad son en su mayoría de naturaleza fenólica, predominando los taninos (Gross, 1981).

Otra función importante de los compuestos del metabolismo secundario es la de actuar como agentes alelopáticos, es decir, intervenir en la defensa química de las plantas. De esta manera, los metabolitos secundarios que son secretados por una planta, pueden interactuar con otra planta y/o con los componentes bióticos y abióticos del sustrato produciendo un efecto negativo o positivo sobre ella. Esta interacción planta-planta, mediada por los compuestos derivados del metabolismo secundario se denomina alelopatía (Rice, 1984).

Las condiciones ambientales influyen en la síntesis de los compuestos con actividad alelopática potencial, pero esta potencialidad vuelve a sufrir las consecuencias de la interacción con el ambiente, pudiendo ser ésta modificada por las distintas condiciones ambientales (Kobayashi, 2004). Todos estos compuestos incrementan su concentración cuando la planta está bajo diferentes condiciones meteorológicas. En general, la síntesis de fenoles varía y está inducida por factores ecológicos como la radiación UV, estrés hídrico (Chaves y Escudero, 1999) u ozono (Sandermann y col., 1998). En este sentido, además de influir en la síntesis de los aleloquímicos (Chaves y Escudero, 1999), pueden también potenciar su actividad.

Otra función ecológica importante es la atracción de polinizadores (Chou y Kou, 1986; Harborne, 1988; Baas, 1989), o dispersores de las semillas (Swain, 1973; Levin, 1976; Cronquist, 1977). Estos compuestos ayudan a las plantas a vivir en suelos ricos en metales pesados como por ejemplo el aluminio (Barceló y Poschenrieder, 2002) e intervienen en la actividad microbiológica del suelo (Vokou y Margaris, 1984).

Otra función que se les atribuye es la de proteger a la planta de las radiaciones UV (Zobel y Lynch, 1997). El efecto de la radiación UV en la planta es importante, elevadas cantidades de radiación UV disminuyen la biomasa de la planta y aumenta la cantidad de flavonoides (Cuadra y col., 1997) pudiendo así incrementar ésta la concentración de metabolitos, tanto en las células como en la superficie de la planta (Zobel y col., 1999).

También pueden estar involucrados estos compuestos en la resistencia a virus, por ejemplo metoxiflavonas y metoxiflavonoles confieren a la planta del tabaco esta capacidad frente al virus del mosaico (French y col., 1986). Y además pueden actuar como señal molecular para la nodulación en la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* (Peters y Verma, 1990; Harborne, 1997).

Todos estos estudios demuestran que los compuestos derivados de metabolitos secundarios pueden ser de una gran importancia para proteger a la planta

tanto de factores bióticos como abióticos que restringen su crecimiento y aumentan la disponibilidad de una especie para competir con otras en un hábitat dado.

I. 3. DESCRIPCIÓN DE *Cistus ladanifer* L

I. 3. 1. Descripción morfológica de *Cistus ladanifer*

C. ladanifer pertenece a la familia de las Cistáceas, una de las familias más características de la flora mediterránea, siendo el género *Cistus*, uno de sus principales representantes. Este género alcanza su mayor diversidad y abundancia en la Península Ibérica, en donde habitan 12 de las 16 especies que existen en la región mediterránea.



Figura 2. Vista de diferentes partes de una planta de *C. ladanifer*. a: forma maculatus, b: forma albiflorus.

C. ladanifer (Figura 2) es un arbusto de 1 a 4,5 m de altura, erecto y muy aromático (Bolaños y Guinea, 1949). Presenta hojas coriáceas, glabras en las partes superiores y tomentosas en la inferior, sub-sésiles con tres nervaduras en el tercio proximal. Las flores son grandes y vistosas (5 a 8 cm de diámetro). Según el tipo de flor se distinguen dos formas (Figura 2), la *albiflorus* (Franco, 1971) cuyos pétalos son totalmente blancos, y la *maculatus* (Franco, 1971), la cual presenta una mancha oscura en cada pétalo.

I. 3. 2. Descripción ecológica de *Cistus ladanifer*

La especie *C. ladanifer* es originaria de la Península Ibérica y la zona septentrional de Marruecos según afirman Braun-Blanquet y col. (1941). En la Península se encuentra distribuida desde el nivel del mar hasta 1000-1200 m de altitud, poniendo en evidencia su capacidad de adaptación (Bolaños y col., 1949; Núñez, 1989). En España (Figura 3) la mayor abundancia se encuentra en Andalucía Occidental, Extremadura y en las zonas occidentales de Madrid, Castilla La Mancha y Castilla León, tornándose más rara en el norte de Galicia, Asturias, País Vasco, Aragón, Murcia, País Valenciano y Cataluña. Es igualmente abundante en Portugal sobretodo en las provincias de Alentejo, Algarve y Trás-os-Montes (Pereira, 1939).



Figura 3. Distribución de *C. ladanifer* en la zona mediterránea.

Su amplia distribución se relaciona con el factor de ser una especie invasora, típicamente xerófila (Goes, 1968; Rivas–Godoy y Rivas-Martínez, 1967). El análisis morfológico sitúa a la jara como una planta típica del grupo I dentro de los síndromes de vegetación descrito por Herrera (1984). Es pues, una especie pionera, colonizadora de suelos generalmente muy degradados asociados a etapas tempranas de la sucesión y que se adapta perfectamente a condiciones de baja fertilidad de suelos y otros tipos de estrés periódicos (Núñez, 1989). Se implantan sobre cuarcita, pizarra y arenisca, en suelos ácidos con valores de pH comprendido entre 3,5 y 6, que corresponden a suelos pobres en nutrientes y con una mineralización bastante baja.

Esta especie puede desarrollarse en ambientes climáticos muy diversos y extremos, siendo capaz de soportar desde estrés de frío, hasta sequedad y altas temperaturas durante periodos más o menos largos del año. Condiciones como éstas, en valores extremos, son factores de estrés que tienden a limitar el crecimiento de la planta. Frente a esto, la jara ha desarrollado diferentes mecanismos adaptativos (Núñez, 1989).

Desarrolla una importante estrategia de supervivencia que poseen ciertas especies que crecen bajo condiciones ambientales imprevisibles, y que consiste en la variación en el tiempo de dormancia y germinación de las semillas de una población (Guterman, 1994 a, b, c; Bewley y Black, 1994; Francisco-Ortega y col., 1994). El pretratamiento con altas temperaturas de estas semillas incrementa significativamente su porcentaje de germinación (García-Márquez y Escudero, 1991). Esto explica que se produzca una masiva recolonización por plántulas de *C. ladanifer* en áreas quemadas, debido a las altas temperaturas que se alcanzan y que rompen el estado de dormancia de las semillas (Pérez-García, 1997).

Las jaras son capaces de colonizar áreas fuertemente alteradas por el hombre, tales como pastos y terrenos de cultivos y zonas boscosas deforestadas. Hay que tener en cuenta que las jaras producen enormes cantidades de semillas. Tras la germinación, las jaras que sobreviven una vez instaladas compiten entre ellas eliminándose gran cantidad de individuos, de esta manera se originan huecos que

provocan la aparición de invasores o nuevas jaras que ayudan a perpetuar el sistema (Núñez, 1989).

I. 3. 3. Exudado de *Cistus ladanifer*

C. ladanifer es llamada “Jara pringosa” debido a la peculiaridad que presentan sus tallos y hojas de secretar una sustancia pegajosa denominada ládano. Esta gomorresina ha sido objeto de estudio por diferentes autores (García-Martín y García-Vallejo, 1969), principalmente debido a su interés industrial en perfumería y como agente quimiotaxonómico (Proksch y Gülz, 1984; Vogt y Gülz, 1991).

Uno de los primeros análisis de la gomorresina de *C. ladanifer* fue realizado por García-Martín y García-Vallejo (1969), que identificaron diferentes terpenos. Posteriormente, Pascual y col. en 1974, aislaron e identificaron los siguientes flavonoides: 7-O-metilapigenina, 3,7,4'-tri-O-metilkanferol, 7,4'-di-O-metilapigenina y 3,7di-O-metilkanferol; y en 1977, Pascual y col. identificaron los terpenos monohidroxilados: 15-nor-8-labdanol, viridiflorol, ledol, labd-8(17)-en-15-ol o ladenol y 15-hidroxi-labd-7-en-6-ona u oxocativol.

Proksch y Gülz (1984), caracterizaron 4 flavonoides agliconas nuevos, que formaban parte del exudado: 3-O-metilkanferol, apigenina, 4'-O-metil-apigenina y 3,4'-di-O-metil-kanferol.

A través de diversas técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN), espectrofotometría de masas (EM) y técnicas cromatográficas, Chaves (1994) y Chaves y col. (1998), corroboraron la presencia de ocho flavonoides agliconas caracterizados como flavonas y flavonoles con diferentes niveles de metilación: Apigenina, 4'-O-metilapigenina, 7-O-metilapigenina, 7,4'-di-O-metilapigenina, 3-O-metilkanferol, 3,4'-di-O-metilkanferol, 3,7di-O-metilkanferol, 3,7,4'-tri-O-metilkanferol.

También se ha determinado que este exudado es rico en diterpenos como ácido oxocátivico, ácido 7-oxo-8-labden-15-oico y ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico (Alías y col., 2005).

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

Esta variación cualitativa está inducida, igualmente por factores climáticos, así el estrés hídrico determina la bajada de apigeninas durante el verano y las altas temperaturas provocan un desplazamiento hacia los flavonoides metilados en la posición 7 y especialmente a 3,7-di-O-metilkanferol (Chaves y col., 1997).

El contenido terpénico del exudado de *C. ladanifer* igualmente marca un comportamiento estacional. La síntesis de diterpenos se estimula a bajas temperaturas, el estrés hídrico modifica la síntesis de los diterpenos a altas temperaturas, disminuyendo la cantidad de estos compuestos en las hojas, y encontrándose la mayor cantidad en invierno (Alías, 2006).

I. 3. 4. Funciones de los metabolitos secundarios en *Cistus ladanifer*

En *C. ladanifer* una de las funciones que pueden desempeñar los flavonoides del exudado de las hojas es la de actuar como filtro de luz ultravioleta, para evitar los daños celulares que causa esta radiación (Chaves, 1994; Chaves y Escudero, 1999). También pueden actuar como agentes tóxicos para la protección contra herbívoros,

evitar ataques de patógenos y como agentes antioxidantes (Wittstock y Gershenzon, 2002; Sosa y col., 2004).

Como protección ante herbívoros, destacar que algunos flavonoides (Apigenina, 3-O-metilKampferol y 3,4'-di-O-metilKampferol) inhiben la actividad Ca^{2+} -ATPasa y consecuentemente el transporte activo de Ca^{2+} a través de membranas de retículo sarcoplásmico acoplado a ella. Así, la masticación por herbívoros de hojas de *C. ladanifer*, conllevaría la incapacidad de relajación del músculo esquelético facial del animal que lo hubiera ingerido. Pero además esta falta de relajación o tensión muscular sería inmediata, pudiendo provocar un rechazo por parte del herbívoro a seguir comiendo. Por tanto, el defecto fisiológico que estos flavonoides pueden causar sobre animales, podría conferir a la planta que los produce, *Cistus ladanifer*, una ventaja selectiva frente a las demás, pudiendo actuar estos compuestos como un mecanismo de defensa contra herbívoros (Sosa T., 2003)

Por otra parte, pueden actuar como agentes alelopáticos, inhibiendo la germinación y desarrollo de plántulas herbáceas que compiten con *C. ladanifer* por el mismo espacio, en general suelos pobres en nutrientes, lo que ofrece claras ventajas al facilitar la colonización para esta especie (Chaves, 1994; Chaves y Escudero, 1997). Esta actividad alelopática se ha demostrado sobre especies como *Cynodon dactylon* y *Rumex crispus*, cuya germinación es claramente inhibida, y en especies como *Medicago polymorpha* y *Lolium rigidum*, que retrasa la germinación e inhibe el tamaño de raíces y cotiledones (Chaves y Escudero, 1997).

También se ha comprobado la presencia de metabolitos secundarios en los suelos asociados a esta especie confirmándose su liberación por parte de la planta y acumulación en el suelo (Chaves y col., 2003). La elevada permanencia de estos compuestos en el suelo durante tanto tiempo puede afectar tanto a las propiedades del suelo, como a microorganismos, semillas y plántulas presentes en él (Sosa y col., 2010). Así, los compuestos fenólicos en el suelo pueden jugar un papel determinante en la interacción planta-suelo, especialmente con la dinámica de la materia orgánica y reciclado de nutrientes.

Se ha demostrado que el exudado de *C. ladanifer* inhibe su propia germinación y desarrollo de las semillas, pudiendo esta especie controlar su propia regeneración en el medio natural (Alías y col., 2006).

I.4. VARIABILIDAD INTRAPOBLACIONAL EN EL METABOLISMO SECUNDARIO

Puede llamarse adaptación a toda característica definitiva de un organismo que le permite persistir en las condiciones de su hábitat (Whittaker y col., 1973), es decir, al ajuste fenotípico de un organismo a su ambiente. Tales rasgos aseguran cierto grado de éxito, ya sea permitiéndole a la planta hacer uso total de las cantidades de nutrientes, agua, o luz disponibles, o bien confiriéndole un alto grado de protección contra factores adversos, como son las temperaturas extremas, la sequía, los parásitos y los herbívoros (Root, 1967).

Actualmente se cree que la mayoría de las adaptaciones ocurren por la acción selectiva del medio ambiente, que selecciona las variaciones genéticas. Pero no todas las variaciones están genéticamente determinadas, es necesario distinguir dos tipos principales de variaciones: variaciones inducidas por el ambiente (caracteres adquiridos o no heredados) y variaciones genéticamente determinadas (irreversibles, surgen únicamente por cambios en la estructura de los genes) (Daubenmire, 1988).

Si una serie de plantas genéticamente idénticas crecen en regiones diferentes, hasta cierto punto, las características de un individuo se desarrollan de acuerdo con el hábitat particular en el cual crecen las plantas (Falconer y Mackay, 1996). El efecto genotípico provocado por la interacción con el ambiente se llama plasticidad fenotípica (Falconer, 1989). Teniendo en cuenta que la plasticidad fenotípica es un rango universal y se corresponde con la capacidad de un determinado genotipo de dar lugar a distintos fenotipos en distintas condiciones ambientales, el grado de plasticidad y, por lo tanto, la variación fenotípica, puede oscilar desde las diferencias más sorprendentes hasta los cambios más ligeros, según la constitución hereditaria de la planta. Además, se pueden distinguir variaciones morfológicas y fisiológicas. Las variaciones de naturaleza morfológica inducidas por el ambiente ocurren únicamente

como resultado de una exposición continua durante una gran parte del ciclo vital; pero los ajustes fisiológicos pueden aparecer en pocos días (Valladares, 2006).

Las plantas pueden adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes por la plasticidad o la selección sobre la variabilidad genética existente. Además, puede producirse una selección en la plasticidad fenotípica. Si se produce una selección hacia un fenotipo concreto, se pueden dar variaciones ecológicas como respuesta a la evolución (Schlichting y Pigliucci, 1998). Esto es debido a que la plasticidad no siempre es adaptativa, solamente lo es si representa un mecanismo mediante el cual el valor adaptativo relativo es mantenido o aumentado como consecuencia de la influencia ambiental (Dudley y Schmidt, 1996; Pigliucci y Schlichting, 1996). El concepto de plasticidad fenotípica se visualiza a partir de la confección de la norma de reacción. Así, la norma de reacción de un genotipo dado es su rango de respuestas fenotípicas a lo largo de un gradiente ambiental (Schlichting y Pigliucci 1998).

Especies más plásticas presentan ventajas adaptativas en ambientes inestables, heterogéneos o de transición. Los cambios producidos pueden facilitar la exploración de nuevos nichos, dando como resultado el aumento de la tolerancia ambiental (Antonovics, 2006; Levin, 2009), como se ha comentado anteriormente. Dadas las funciones que desempeñan los compuestos derivados del metabolismo secundario, si una especie o población muestra variabilidad individual en la cantidad de esos compuestos implicaría una mejor respuesta frente a cambios ambientales, es decir, una mejor respuesta frente a la heterogeneidad ambiental, viéndose ésta favorecida. Por ello, el estudio de la variabilidad de los metabolitos secundarios puede ayudar a conocer la capacidad de respuesta que posee una especie en diferentes condiciones ambientales y a su vez de su carácter más o menos generalista o plástico.

La importancia del estudio de la plasticidad fenotípica de una especie radica en su significado adaptativo y se puede determinar al menos desde tres aproximaciones distintas que además involucran diferentes escalas: 1) a nivel del individuo, 2) a nivel de la población y 3) a nivel de la especie (Gianoli, 2004).

En el primer caso, enmarcado dentro de una perspectiva ecofisiológica, se indaga por el significado funcional de las respuestas plásticas observadas en los fenotipos. En el segundo caso, orientado a la ecología evolutiva, se aborda la relación entre la norma de reacción y la adecuación biológica de genotipos representativos de una población. En el tercer caso, se estudia el papel de la plasticidad fenotípica en los patrones de distribución de una especie.

Pocos trabajos experimentales han intentado evaluar la plasticidad fenotípica del metabolismo secundario en una población. Esto es debido a que una evaluación rigurosa de la selección de normas de reacción en un contexto de ambientes variables involucra un protocolo exigente y complejo. Así, es necesario obtener clones de los organismos de estudio, determinar en cada genotipo las normas de reacción de los caracteres para la variable ambiental de interés, evaluarla en un rango relevante a lo observado en poblaciones naturales, determinar la adecuación biológica de cada genotipo en cada ambiente, estimar la distribución de frecuencia de los ambientes experimentados por los organismos en las poblaciones naturales, calcular el valor de la adecuación biológica total para cada carácter de interés, determinar la relación entre la adecuación biológica total y la norma de reacción de cada genotipo y determinar la base genética de los parámetros de la norma (Gianoli, 2004).

Son pocos los trabajos que realmente se han aproximado de manera experimental al concepto de plasticidad fenotípica adaptativa. Por tanto, una de las direcciones futuras en este tema no es otra que el fortalecimiento de la aproximación experimental con el fin de obtener un número mayor de antecedentes sólidos. Cuando la selección natural actúa sobre el fenotipo, la plasticidad fenotípica actúa como un importante mecanismo generador de variabilidad en determinados caracteres, de acuerdo con las demandas ambientales (Mal y Lovett-Doust, 2005). Por lo tanto, conocer los componentes ambientales de la variación es fundamental para la comprensión de cómo una población se estructura en el tiempo y en el espacio.

Al contrario de los metabolitos primarios, los compuestos del metabolismo secundario presentan una variación intraespecífica considerable en su composición

(Harborne y Turner, 1984; Bohm, 1987). En las plantas, la síntesis y la acumulación de los compuestos secundarios reflejan diferentes etapas evolutivas. Algunos de estos compuestos se producen sólo esporádicamente, mientras que otros se distribuyen ampliamente en todo el reino vegetal (Harborne, 1980; Rhodes, 1994). Un solo metabolito secundario puede ser específico de órdenes, familias, especies, y a veces incluso de taxones intraespecíficos (Harborne, 1980; Wollenweber y Dietz, 1981). Dada la función que desempeñan estos compuestos en las plantas, que exista variación intraespecífica puede tener un papel importante para la especie, ya que cuando el hábitat original sufre cambios, sus procesos fisiológicos deben actuar a un nuevo ritmo dictado por las nuevas intensidades de los factores. Por ejemplo, la competencia, la polinización y el herbivorismo son unos de los muchos procesos ecológicos que influyen en el estado de la planta, y todos ellos pueden variar con el fenotipo de la planta y depender de la composición química de la misma (Cariveau y col., 2004; Cahill y col., 2005; Moore y Foley, 2005).

En presencia de la presión selectiva que ejercen otros organismos y el medio ambiente en general sobre las plantas, la ausencia de variabilidad en la defensa química implicaría una posible reducción de la población. Si la presión fuera suficiente y se mantuviera en el tiempo, esa población podría desaparecer. La supervivencia depende del grado al cual los caracteres heredados le permiten ajustarse al cambio ambiental (Stebbins, 1950). De esta manera, una elevada variación química puede mejorar este proceso (Van der Meijden, 1996).

OBJETIVOS

En estudios previos realizados en el Área de Ecología de la Universidad de Extremadura sobre *Cistus ladanifer* se ha demostrado que las hojas y tallos fotosintéticos segregan un exudado muy abundante, sobre todo, durante la estación estival (Chaves, 1994). Este exudado está constituido principalmente por flavonoides y diterpenos (Chaves, 1994; Chaves y col., 1997; Alías, 2006) los cuales desempeñan un papel ecofisiológico muy importante: protegen a la planta de la radiación ultravioleta, tienen actividad antiherbívoro y son agentes alelopáticos (Chaves, 1994; Chaves y col., 2001a; Sosa y col., 2005; Alías y col., 2006). La síntesis en la planta de estos compuestos varía cuantitativamente y cualitativamente en respuesta a varios factores abióticos incluyendo el fotoperiodo, la luz ultravioleta, la temperatura y el estrés hídrico (Chaves, 1994; Chaves y Escudero, 1999; Chaves y col., 2001b).

La capacidad de adaptación de las especies a un lugar depende de la variabilidad genética que presenten y de su plasticidad morfológica y fisiológica a las condiciones ecológicas a las que sean sometidas. Esto conlleva a que si somos capaces de cuantificar de forma sencilla la variabilidad genética y fenotípica de una especie, tendríamos información de su capacidad para responder a los cambios ambientales.

Hay que tener en cuenta que cuando cuantificamos la cantidad de metabolitos secundarios en una planta, estamos cuantificando un carácter fenotípico. De todos es conocido que el fenotipo tiene un control genético y un control ambiental, es decir, los niveles de compuestos del metabolismo secundario están en parte controlados genéticamente y en parte determinados por las condiciones ambientales (Jones y Hartley, 1999). Que existan variaciones fenotípicas puede ser debido a que existan variaciones genéticas y ambientales, pero hay autores que defienden que la variación fenotípica no tiene por que deberse por igual al ambiente y al genotipo. Por lo tanto, partiendo de que hay variabilidad fenotípica en un carácter, y en nuestro caso en la cantidad presente de compuestos derivados del metabolismo secundario, habría que cuantificar cuánto se debe al ambiente y cuánto es genético.

En los últimos años se han realizado estudios sobre la compleja mezcla de compuestos derivados del metabolismo que contienen los diferentes órganos de la mayoría de las especies de plantas. De esta manera, se presenta un patrón característico de fuerte diversidad estructural, organizado sobre una base de funcionamiento de secuencias biogénicas y una fuerte sensibilidad a los efectos selectivos del medio. Esta mezcla puede variar cuantitativamente de un órgano a otro, con la edad de la planta, estación y condiciones de crecimiento (Siegelman, 1964; Harbone, 1967). Por ello, es necesario conocer y asegurar que estamos cuantificando correctamente la variabilidad fenotípica y deberíamos responder previamente a cuestiones como: ¿Existen variaciones de los metabolitos secundarios dentro de un mismo individuo, dependiendo del órgano y estado de desarrollo del mismo? ¿Estas variaciones son dependientes de las condiciones estacionales? ¿La variabilidad es la misma para todos los órganos, edades y estaciones?... Responder a todas estas cuestiones sería el primer paso para conocer qué órgano, edad y estación deberíamos elegir para determinar las diferencias individuales en *Cistus ladanifer*, utilizando como herramienta de cuantificación los compuestos derivados de su metabolismo secundario.

Por lo tanto, para alcanzar el objetivo principal de este trabajo: cuantificar la variabilidad intrapoblacional en los metabolitos secundarios del exudado de *Cistus ladanifer*, es necesario desarrollar los siguientes objetivos particulares:

1. Hallar un procedimiento de cuantificación de la variabilidad intrapoblacional en la especie de estudio. Este objetivo se divide en otros más específicos:
 - 1.1. Cuantificar los compuestos del metabolismo secundario (flavonoides y diterpenos) en diferentes órganos y estados de desarrollo (hojas jóvenes, maduras y tallos fotosintéticos).
 - 1.2. Cuantificar en diferentes estaciones y años los compuestos del metabolismo secundario.

- 1.3. Cuantificar los compuestos del metabolismo secundario según la edad de diferentes individuos.
- 1.4. Determinar la variabilidad de los metabolitos secundarios en órganos, estaciones, edades e interanualmente.
2. Utilizar el mejor procedimiento estimado para estudiar cómo afectan las características genéticas y los factores ambientales a la variación en la composición de compuestos pertenecientes al metabolismo secundario. Este estudio se llevará a cabo a dos niveles:
 - 2.1. A nivel poblacional, el estudio se centrará en cómo es la respuesta de cada uno de los individuos de una misma población. Para ello hay que:
 - 2.1.1 Analizar si hay diferencias en las respuestas de cada uno de los individuos de un jaral sometidos a las mismas condiciones ambientales (variabilidad intrapoblacional).
 - 2.1.2 Determinar la estructura espacial de la variación encontrada en una población natural.
 - 2.2. A nivel interpoblacional, observar las diferencias en la secreción de estos compuestos entre jarales sometidos a diferentes condiciones ambientales (variabilidad interpoblacional).
 - 2.3. Por último, mediante clones de diferentes genotipos, se pretende diferenciar, de la proporción de la varianza fenotípica total en la síntesis de metabolitos secundarios, cuánto se debe a la varianza genética y cuánto a la ambiental.

MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR LA VARIABILIDAD DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN *Cistus ladanifer* COMO RESPUESTA AL AMBIENTE

III.1.1. Descripción de la zona

El perfil químico de una especie puede cambiar durante la ontogenia de la planta y por la fenología (Bohm, 1987; Bryant y Julkunen-Tiitto, 1995). Teniendo en cuenta lo anterior, en este estudio se diseñaron dos tipos de experimentos. Por un lado se cuantificaron los metabolitos secundarios en *C. ladanifer* en hojas y tallos en jaras de la misma edad y por otro lado con jaras de edades diferentes.

Para ver las diferencias de los metabolitos secundarios entre jaras de la misma edad, se seleccionaron 15 individuos con la misma edad cronológica (aproximadamente 15 años) de un jaral situado en Alburquerque, al noroeste de la provincia de Badajoz (España) (Figura 4).

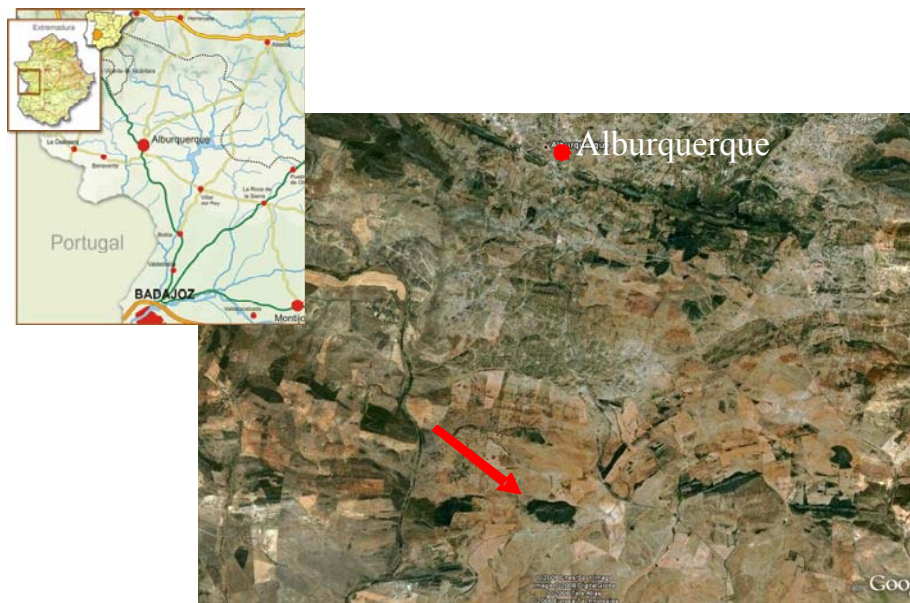


Figura 4. Localización de la zona de estudio

La zona está situada a una altura de 289 m y posee un clima típicamente mediterráneo. La precipitación promedio anual es de 500-800 mm (Cabezas y col., 1986).

En la Tabla 1 se observan las precipitaciones totales, días de lluvia y temperaturas (máxima, mínima y media) de la zona de estudio en el tiempo de desarrollo de la experiencia. Estos datos fueron obtenidos en el Instituto Nacional de Meteorología del Ministerio de Medio Ambiente.

Los tipos de suelos dominantes son Luvisoles y Cambisoles (Fernández y Labrador, 2003) y desde el punto de vista geológico, se desarrollan sobre cuarcita y arenisca (Sigeo, 2003). Esta zona tiene una vegetación constituida por *Quercus rotundifolia* y un estrato arbustivo formado principalmente por jaras (*Cistus ladanifer*) acompañado de otras especies como *Lavandula stoechas* y *Cistus salvifolius*.

Tabla 1. Valores de precipitación total (P. Total, mm), días de lluvia y temperaturas (°C) estacionales de la zona de estudio en el tiempo de desarrollo de la experiencia. Los valores de temperatura son los correspondientes a la temperatura máxima, mínima y media (°C) de cada estación.

	P. Total (mm)	Nº Días de lluvia	T ^a máx. (°C)	T ^a mín. (°C)	T ^a med. (°C)
Verano (2006)	41.9	10	34.5	17.3	25.9
Otoño (2006)	526.5	29	26.0	13.0	19.5
Invierno (2007)	136.2	18	13.3	4.2	8.8
Primavera (2007)	132.0	21	20.7	7.5	14.1
Verano (2007)	94.9	6	31.9	15.0	23.5
Otoño (2007)	172.3	10	24.4	11.1	17.8
Invierno (2008)	125.4	15	14.5	5.0	9.7
Primavera (2008)	221.9	24	19.2	8.4	13.8

III.1.2. Recogida de muestras

Las muestras se recogieron durante dos años consecutivos, concretamente desde el verano del 2006 hasta la primavera del 2008. En este estudio se ha considerado la nomenclatura "año 2006" para englobar a las estaciones: verano 2006, otoño 2006, invierno 2007 y primavera 2007 y "año 2007" para englobar al verano 2007, otoño 2007, invierno 2008 y primavera 2008. Al final de cada estación se recogieron tres muestras de hojas jóvenes (brotes), hojas maduras y tallos fotosintéticos de 15 individuos de *C. ladanifer* para cuantificar la síntesis de compuestos del metabolismo secundario de esta especie (flavonoides y diterpenos) identificados en estudios anteriores. De esta manera se obtuvieron 9 muestras de cada individuo, en cada estación y en cada uno de los dos años que comprende el estudio.

Se consideraron brotes aquellas hojas pequeñas que están naciendo, aproximadamente de 2 ó 3 meses de edad; hojas maduras, aquellas hojas de 6 a 10 meses de edad; y tallos, la zona más apical del tallo que ha crecido en el año de estudio y con un diámetro entre 1,15 y 2,25 mm (Figura 5).



Figura 5. Detalle de los órganos muestreados: hojas jóvenes (izquierda), hojas maduras y tallos (derecha).

Las muestras de cada individuo se empaquetaban en papel de aluminio "in situ", y fueron enumeradas, almacenadas en bolsas y conservadas en neveras para su posterior extracción en laboratorio.

A partir del verano del 2007, los individuos 1 y 10 no se muestrearon debido a que fueron afectados por un hongo y carecían de hojas y tallos fotosintéticos.

Para cuantificar la variabilidad en la composición del metabolismo secundario en *C. ladanifer* dependiente de la edad se seleccionaron 52 jaras teniendo en cuenta diferentes alturas y diámetro de tallo. En cada jara se midió la altura con una cinta métrica y el diámetro del tronco con un calibrador. Este diámetro se midió en todas las jaras a ras del suelo. Se recogieron 3 muestras de hojas y tallos fotosintéticos de cada una de las jaras, que fueron almacenadas para su posterior extracción del exudado. Seguidamente se cortaron con una sierra desde la zona más cercana al suelo y se obtuvieron secciones de los troncos que fueron transportados al laboratorio para el conteo de los anillos de crecimiento.

III.1.3 Determinación de la edad

Para la determinación de la edad de los individuos de *C. ladanifer*, se utilizó el método de conteo de anillos anuales de crecimiento.

El conteo de anillos de crecimiento se realizó en secciones de troncos (Figura 6) que son montadas sobre soportes de madera y posteriormente son lijados. Con una lupa y humedeciendo la zona ya lijada se contaron los anillos de crecimiento de cada individuo muestreado. Se contabilizó el número de anillos, al menos por 5 personas diferentes, haciendo la media y desechando los valores más extremos (por abajo y por arriba).



Figura 6. Detalle del segmento del tronco cortado en algunos individuos de *C. ladanifer*.

III.1.4 Relación de la altura y diámetro según la edad en *Cistus ladanifer*

Para determinar la relación entre la altura y diámetro con la edad en *C. ladanifer*, se realizó un ajuste estadístico entre los valores de la edad, (calculada por el número de anillos contabilizado en los troncos medidos) y las dos variables morfológicas medidas en cada individuo (altura y diámetro de tronco). Las funciones se representan en las Figuras 7 y 8. Para el diámetro del tronco se obtiene una función lineal ($y = 1.5496x + 1.5342$; $R^2 = 0.9221$) y para la altura la función es

logarítmica ($y = 67.21\text{Ln}(x) - 16.929$; $R^2 = 0.8123$). Ambas funciones presentan un coeficiente de determinación alto, aunque el diámetro del tronco es el que mejor se ajusta.

Por lo tanto, para poder estimar la edad de un individuo de *C. ladanifer* es más conveniente utilizar el diámetro del tronco como parámetro morfológico.

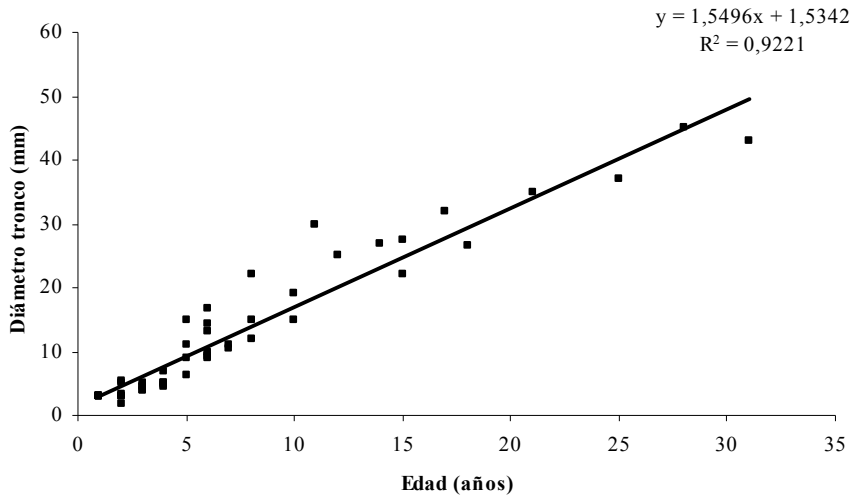


Figura 7. Relación diámetro de tronco (mm) y edad (años) en *C. ladanifer*.

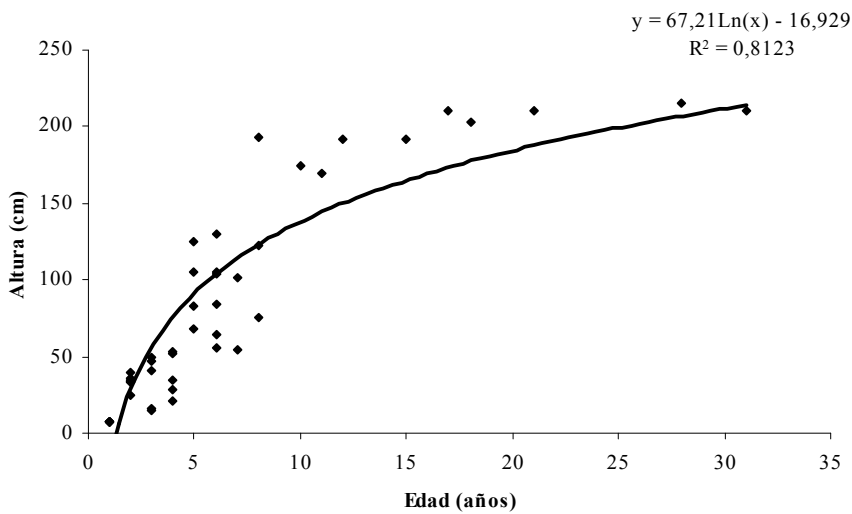


Figura 8. Relación altura (cm) y edad (años) en *C. ladanifer*.

III.1.5. Extracción del exudado

Se pesó 1g aproximadamente de hojas jóvenes, maduras y de tallos (tres réplicas de cada parte por jara). El exudado se extrajo con cloroformo (1/10 p:v) para asegurar la completa extracción de flavonoides y diterpenos (Chaves, 1994). A continuación, el cloroformo se evapora en una campana de gases con una temperatura no superior a los 30°C y el precipitado se resuspende en 4 ml de metanol.

Las muestras fueron congeladas a -20°C durante 12 horas para que precipiten las ceras, las cuales se retiran mediante centrifugación, almacenándose el sobrenadante a 4 °C para su posterior análisis (Vogt y Gülz, 1991).

III. 1.6. Análisis de la muestra

Las muestras fueron analizadas y cuantificadas por Cromatografía Líquida de Alta Presión, HPLC (Figura 9) (Waters; Bombas: 515 HPLC, Pump. Inyector: 717plus Autosampler, Detector: 996 Photodiode Array Detector).



Figura 9. Cromatógrafo líquido de alta presión usado para la separación y análisis de las diferentes muestras.

De cada muestra eran inyectados 80µl para hojas jóvenes, maduras y tallos en una columna analítica de fase reversa Spherisorb 5µ C-18 4,6 x 250 mm. La fase móvil utilizada fue agua/metanol/tetrahidrofurano en las proporciones 56/16/28 a una velocidad de flujo de 0.75 ml/min. Los cromatogramas se registran a una longitud máxima de 350 nm para flavonoides y 250 nm para diterpenos. En estas condiciones se obtiene un cromatograma con una resolución óptima para la identificación de los cinco flavonoides (Chaves, 1994; Chaves y col., 1993, 1997) y los tres diterpenos (Alías y col., 2006) presentes en el exudado de *C. ladanifer*, como puede apreciarse en el cromatograma de la Figura 10 que corresponde con una muestra de hojas.

La identificación de los compuestos estuvo basada en los tiempos de retención y en las características espectrales como se describe en Chaves, 1994; Chaves y col., 1993, 1997. El tiempo de retención y absorbancia máxima de los diferentes compuestos cuantificados en el exudado de esta especie es diferente, esta diferencia se puede apreciar en la Tabla 2.

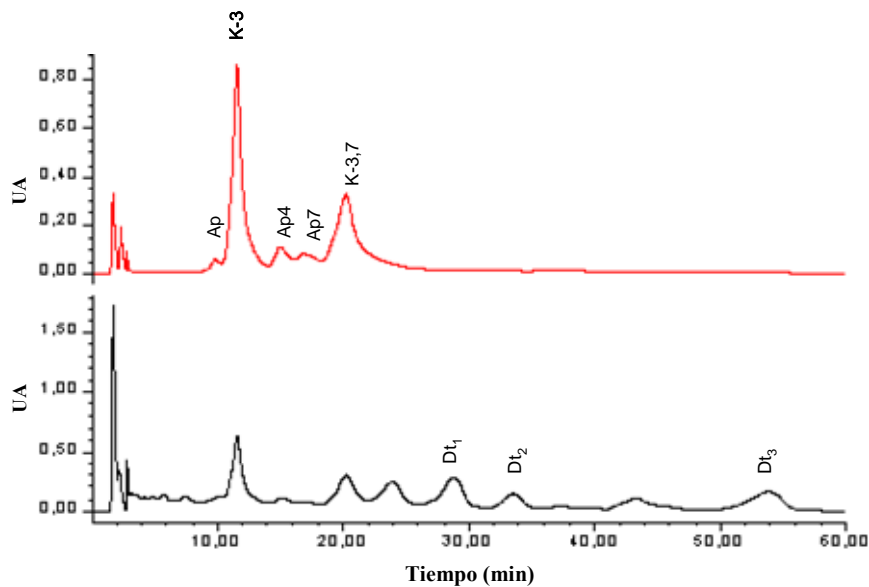


Figura 10. Cromatograma registrado a 350 nm (rojo) para la cuantificación de los flavonoides en *C. ladanifer* (Ap, apigenina; Ap-4, 4'-O-metilapigenina; Ap-7, 7-O-metilapigenina; K-3, 3-O-metilkaempferol ; K-3,7, 3,7-di-O-metilkaempferol) y 250 nm (negro) para los diterpenos (Dt-1, ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2, ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3, ácido oxocátivico) en hojas. Nota: la escala de absorbancia (UA) es diferente en los dos cromatogramas.

Tabla 2. Tiempo de retención (min) y longitud de onda máxima (nm) a la cual absorben los compuestos estudiados.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Flavonoides		
Apigenina	10	340
4'-O-metilapigenina	12	334
7-O-metilapigenina	19	345
3-O-metilkamferol	11	350
3,7-di-O-metilkamferol	20	350
Diterpenos		
6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico	29	256
Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico	32	250
Ácido oxocátívico	52	240

III.1.7. Cuantificación de los metabolitos secundarios de *Cistus ladanifer*

Los compuestos cuantificados en las muestras de hojas jóvenes, maduras y tallos son los flavonoides y diterpenos cuyas fórmulas químicas se muestran en la Figura 11.

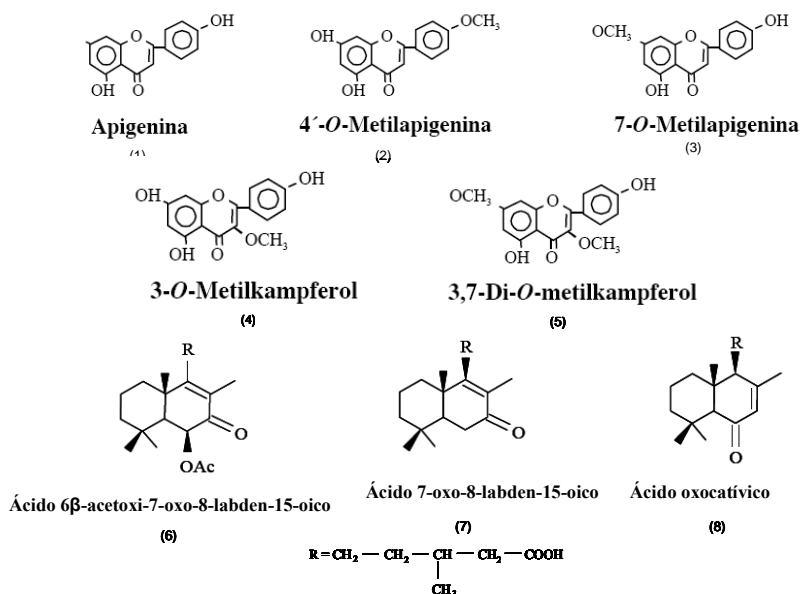


Figura 11. Flavonoides y diterpenos estudiados (1-5: flavonoides, 6-8: diterpenos).

La cantidad de cada compuesto presente en las muestras fue cuantificada usando la recta patrón obtenida con los diferentes compuestos. Ya que los flavonoides y diterpenos no se pueden obtener comercialmente, para construir la recta patrón fue necesario purificarlos del exudado. Para ello se procedió inyectando, repetidamente, muestra concentrada en una columna semipreparativa Nucleosil 5 μ C-18 (250 x 10 mm), con una solución de agua-metanol-tetrahidrofurano (40:30:30) a una velocidad de flujo de 1.75 ml/min. La longitud de onda a la cual se detectaron los compuestos fue a 335-350 nm para fenoles y 250 nm para terpenos. A medida

que se iba detectando el pico de cada compuesto se recogía en un tubo. Para eliminar cualquier contaminación de otros compuestos, cada fracción fue de nuevo separada por HPLC. La fase móvil correspondió a metanol-agua (80:20, v/v), con un flujo de 2 ml/min. Una vez purificado se obtuvo la recta patrón (Figura 12) con concentración diferente de cada compuesto (Sosa, 2005; Alías, 2006).

Las rectas patrón utilizadas para la cuantificación de los compuestos son las siguientes:

- Apigenina, (Ap); $y = 0.0931x - 0.0074$; $r^2 = 0.9782$
- 4'-O-metilapigenina (Ap-4); $y = 0.025 x - 0.0899$; $r^2 = 0.9891$
- 7-O-metilapigenina (Ap-7); $y = 0.0172 x - 0.071$; $r^2 = 0.9655$
- 3-O-metilkamferol (K-3); $y = 0.0805x$; $r^2 = 0.9698$
- 3,7-di-O-metilkamferol (K-3,7); $y = 0.0063 x - 0.0169$; $r^2 = 0.9782$
- Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico (Dt-1); $y = 0,0296x$; $r^2=0.988$
- Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico (Dt-2); $y = 0.3518x$; $r^2=0.998$
- Ácido oxocátívico (Dt-3); $y = 0,4361x$; $r^2=0.992$

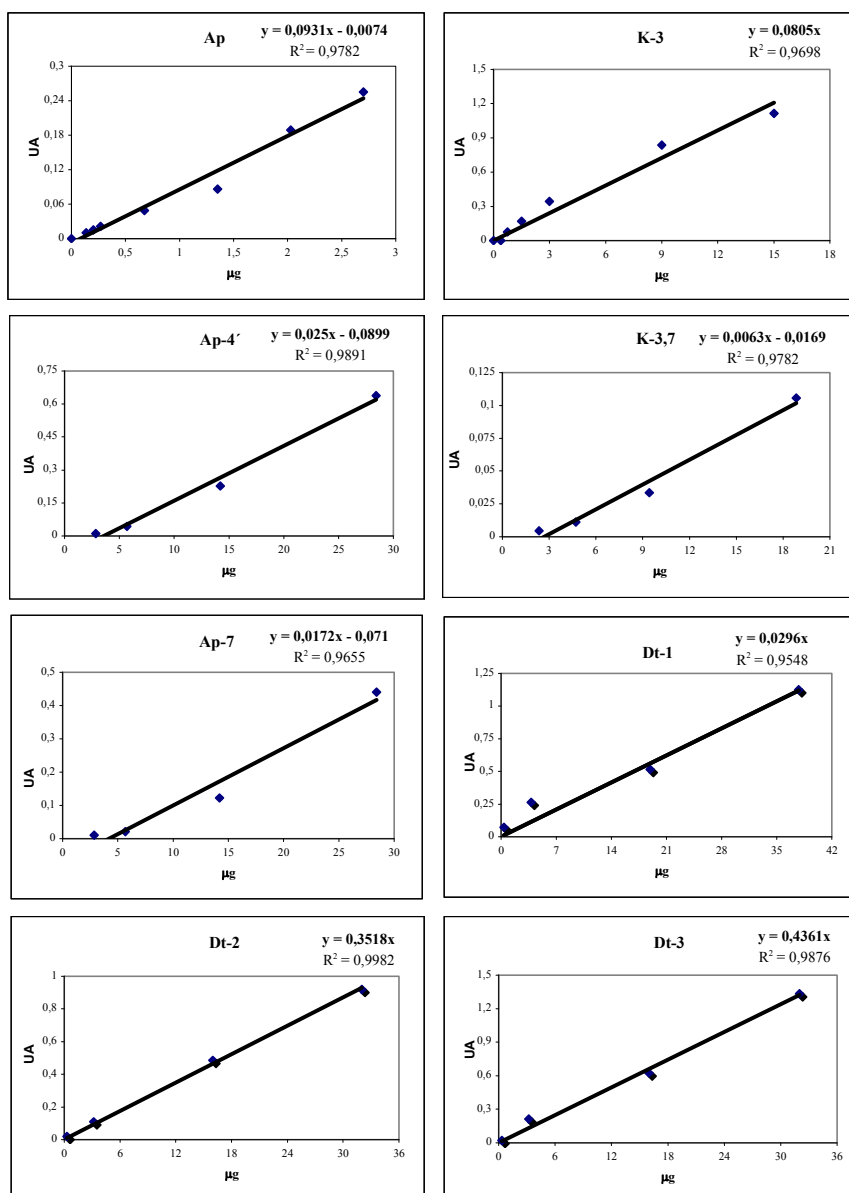


Figura 12. Rectas patrón de los diferentes flavonoides (Ap, apigenina; Ap-4, 4'-O-metilapigenina; Ap-7, 7-O-metilapigenina; K-3, 3-O-metilkamferol ; K-3,7, 3,7-di-O-metilkamferol) y diterpenos (Dt-1, ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2, ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3, ácido oxocátivico) obtenidas a partir del exudado de *C. ladanifer*.

III.2. VARIACIÓN DE LOS COMPUESTOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO ENTRE LOS INDIVIDUOS DE UNA POBLACIÓN DE *Cistus ladanifer*

III.2.1. Descripción de la zona de muestreo y recogida de muestras

Para determinar la variación de compuestos del metabolismo secundario en *C. ladanifer* a nivel individual y según el procedimiento para su cuantificación (apartado III.1 de Materiales y Métodos), se realizó un muestreo el 10 de octubre de 2009 de 100 individuos de *C. ladanifer* en un jaral del municipio de Alburquerque (puerto de conejeros), Badajoz (Figura 13).



Figura 13. Localización de la zona de estudio.

La recogida de muestras de cada uno de los 100 individuos seleccionados se realizó en un área rectangular total de 200 x 50 metros, es decir, 10.000 m² (1 ha). Cada 10 metros lineales se eligió un individuo de entre 7 y 12 años (aproximadamente de 1 metro de altura) hasta los 200 metros, desde aquí y teniendo en cuenta una distancia de 10 metros a la izquierda se volvían a recoger muestras cada 10 metros en línea recta hasta otros 200 m y así sucesivamente hasta llegar a las 100 muestras.

Una vez recogidas las muestras (3 por individuo), éstas eran empaquetadas en papel de aluminio y enumeradas *in situ*. Inmediatamente después se trasladan en una nevera al laboratorio donde se seleccionaron tres muestras de hojas jóvenes de cada individuo y se llevó a cabo la extracción.

III.2.2. Extracción del exudado y análisis de las muestras

Para poder determinar y cuantificar los compuestos presentes en las muestras de hojas de cada uno de los individuos muestreados en esta población, se procede a la extracción del exudado y análisis siguiendo el protocolo descrito en los apartados III.1.5 y III.1.6.

III.2.3. Cuantificación de los compuestos del metabolismo secundario

La cuantificación de los compuestos del metabolismo secundario de los individuos seleccionados se realizó siguiendo el protocolo analítico que se muestra en el apartado III.1.7.

III.3. VARIACIÓN DE LOS COMPUESTOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN DIFERENTES POBLACIONES DE *Cistus ladanifer*

III.3.1. Descripción de las zonas de muestreo

Para cuantificar la variación interpoblacional en los compuestos del metabolismo secundario, en octubre de 2009 y abril de 2010 se recogieron muestras de hojas de 13 poblaciones distribuidas, específicamente en dirección N-S (Figura 14). Estas poblaciones representan la variedad de hábitats en los cuales se distribuye esta especie y en general difieren en cuanto a precipitación, altitud, temperaturas, longitud y latitud (Tabla 3). Las poblaciones elegidas para realizar este estudio son: Ponferrada, Destriana, Pantano de Ricobayo, El Cubo de la Tierra del Vino, Hervás, Robledillo, Alburquerque, Hornachos, Azuaga, Monesterio, Las Navas de la Concepción, Cazalla de la Sierra y Huelva.



Figura 14. Localización de las diferentes poblaciones de *C. ladanifer* que se han utilizado para el estudio.

Tabla 3. Datos generales de localización y valores climatológicos (periodo 1971-2000) que caracterizan las distintas poblaciones de *C. ladanifer* elegidas para el estudio.

Población	Provincia	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (m)	T ^a media (°C)	T ^a máx (°C)	T ^a mín (°C)	Precipitación (mm)
Alburquerque	Badajoz	39° 13´	7° 00´	289	16.6	23.3	9.9	463
Azuaga	Badajoz	38° 15´	5° 40´	498	16.6	23.3	9.9	463
Cazalla de la sierra	Sevilla	37° 55´	5° 45´	533	18.6	24.9	12.2	534
Destriana	León	42° 19´	6° 06´	902	10.9	16.4	5.3	556
El cubo de la tierra del vino	Zamora	41° 15´	5° 42´	840	12.7	18.3	7.1	363
Hervás	Cáceres	40° 16´	5° 52´	452	16.1	21.4	10.8	523
Hornachos	Badajoz	38° 33´	6° 04´	485	16.6	23.3	9.9	463
Huelva	Huelva	37° 15´	6° 56´	15	18.1	23.5	12.7	490
Las Navas de la concepción	Sevilla	37° 56´	5° 28´	665	18.6	24.9	12.2	534
Monesterio	Badajoz	38° 05´	6° 16´	710	16.6	23.3	9.9	463
Pantano de ricobayo	Zamora	41° 40´	5° 52´	705	12.7	18.3	7.1	363
Ponferrada	León	42° 33´	6° 36´	555	12.6	18.1	7.2	668
Robledillo de trujillo	Cáceres	39° 16´	5° 59´	532	16.1	21.4	10.8	523

T^a media: temperatura media anual; T^a max: temperatura máxima anual; T^a min: temperatura mínima anual

En cada población de *C. ladanifer* elegida, se recogieron 5 muestras de hojas tanto para el muestreo de octubre de 2009 como para el muestreo de abril de 2010 de 10 individuos elegidos al azar de 7 a 12 años de edad aproximadamente.

Al igual que en otras ocasiones, una vez recogidas las muestras, éstas eran empaquetadas en papel de aluminio *in situ* y a continuación fueron enumeradas, almacenadas en bolsas y transportadas en una nevera para su posterior extracción en laboratorio.

III.3.2. Extracción del exudado y análisis de las muestras

Para poder determinar y cuantificar los compuestos presentes en las muestras de hojas jóvenes de los diferentes individuos muestreados en las poblaciones seleccionadas para realizar este estudio, se procedió a la extracción del exudado y análisis siguiendo el protocolo descrito en los apartados III.1.5 y III.1.6.

III.3.3. Cuantificación de los compuestos del metabolismo secundario

La cuantificación de los compuestos del metabolismo secundario en las diferentes poblaciones se realizó siguiendo el protocolo analítico que se muestra en el apartado III.1.7.

III.4 VARIACIÓN DE LOS COMPUESTOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN CLONES DE *Cistus ladanifer*

La pregunta más básica que podemos plantearnos sobre un rasgo cuantitativo es si los genes influyen o no en la variación observada en el carácter. Para un genotipo dado, en cada ambiente aparecerá un fenotipo determinado. En consecuencia, una distribución de condiciones ambientales se reflejará biológicamente en una distribución de fenotipos. Así, la transformación de la distribución ambiental en la distribución fenotípica viene determinada por la norma de reacción (patrón que sigue la expresión fenotípica de un genotipo en diferentes medios ambientales).

Con el fin de determinar en qué medida la variación genética en la secreción de compuestos derivados del metabolismo secundario en el exudado de *C. ladanifer* influye en la variación fenotípica, se obtuvieron diferentes clones de varios individuos. A estos clones de diferentes genotipos se les sometieron a diferentes condiciones ambientales para poder analizar la influencia de la componente genética en la componente fenotípica, en nuestro caso, en la secreción de los compuestos del metabolismo secundario.

III.4.1. Material vegetal.

Para la realización de este estudio, se utilizaron semillas de 5 individuos de *C. ladanifer* elegidos aleatoriamente en un jaral de Alburquerque, Badajoz. La recogida de las semillas se realizó entre los meses de julio-agosto de 2008. Una vez recogidas las semillas, éstas fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta el comienzo de las experiencias.

III.4.2. Cultivo y obtención de clones

Las semillas de *C. ladanifer* fueron desinfectadas superficialmente durante 20 minutos con una solución al 8% de hipoclorito sódico a partir de lejía comercial (40 g/l de cloro activo) y unas gotas de Tween 20. A continuación se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Seguidamente con objeto de eliminar la dormancia e inducir la germinación, fueron sometidas a elevadas temperaturas. Para este proceso, las semillas se sumergieron en agua destilada estéril y se mantuvieron en ebullición 4 minutos.

Toda la manipulación de las semillas y material vegetal se realiza en una cámara de flujo laminar, previamente desinfectada con alcohol y radiación ultravioleta durante 20 minutos, para mantener las condiciones de asepsia necesarias para el desarrollo de cultivos *in vitro*.

Las semillas, una vez secadas, se pusieron a germinar en placas Petri ($\phi=10$ cm) en el medio A (medio de cultivo basal), formado por las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementadas con 0.4 mg/l de Piridoxina, 0.4 mg/l de Tiamina, 0.4 mg/l de ácido Nicotínico (Morel y Wetmore, 1951), 100 mg/l de mio-inositol, 20 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar. A este medio se le añade 1 mg/l de Bencilaminopurina (BA), ajustándose el pH a 5.7, antes de esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min. La germinación y posterior cultivo se realizó en una cámara de cultivo IBERCEX climatizada a 25°C \pm 1°C, con un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad y 6000 lux de intensidad luminosa, suministrada por tubos fluorescentes blancos fríos (Philips Master TLD 30W/840).

Una vez germinadas (10-15 días) y crecidas las plántulas durante 20-30 días, se procedió a la obtención de explantos de 2 cm de longitud que contenían 2 nudos, utilizados para la micropropagación y obtención de clones. Las secciones se colocaron en un medio de multiplicación (medio B) formado por el medio A suplementado con 2 mg/l BA y 0.5 mg/l de ácido naftalenacético (ANA).

Los brotes neoformados en el medio anterior constituyen clones que eran crecidos durante 30 días, siendo posteriormente individualizados y puestos a enraizar en tubos de ensayo en un medio de enraizamiento formado por las sales MS diluidas a la mitad, suplementadas con 0.4 mg/l de Piridoxina, 0.4 mg/l de Tiamina, 0.4 mg/l

de ácido Nicotínico, 100 mg/l de myo-inositol, 10 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar, y 2 mg/l de ANA. El medio (medio C) era renovado semanalmente.

En la Figura 15 se muestra la evolución de las diferentes plántulas a partir de las cuales se obtuvieron los clones necesarios para el estudio.

Los experimentos de estrés hídrico se realizaron en el medio B al que se añade como agente osmótico manitol en cantidades diferentes para obtener los estreses hídricos utilizados: $\psi_w = -0.80$ MPa (45.50 g/l de manitol) y $\psi_w = -1.5$ MPa (63,74 g/l de manitol).

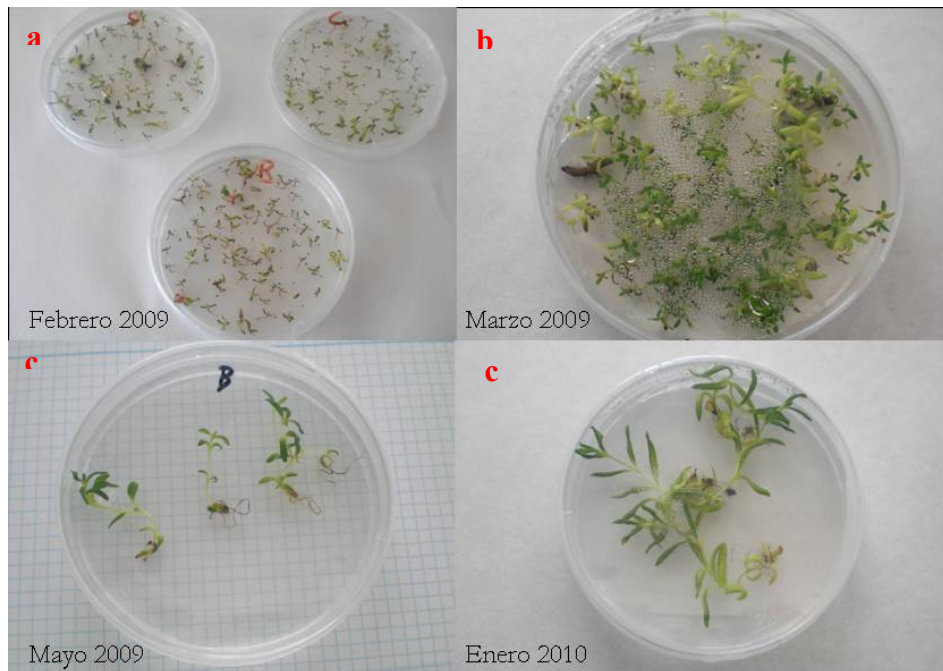


Figura 15. Evolución de las diferentes plántulas a partir de las cuales se obtenían los clones. a: medio A (basal); b: medio B, de crecimiento; c: medio C, de enraizamiento.

III.4.3. Diseño experimental

Inicialmente se partió de 5 individuos (5 genotipos diferentes) pero debido a problemas de crecimiento de cada genotipo y a la elevada tasa de mortalidad, finalmente se consiguieron 150 clones en total, 50 clones de 3 genotipos diferentes (A, B y C) que se utilizaron para los distintos bioensayos.

Una vez obtenidos los clones de cada individuo con un tamaño adecuado (Figuras 16), éstos fueron distribuidos en dos cámaras: una con radiación ultravioleta y otra con radiación normal. En cada una de las cámaras unos clones se mantuvieron con medio de estrés hídrico y otros con medio control. La disposición del tubo de ensayo que incluía cada clon era equidistante respecto a los demás tubos y fueron distribuidos de forma regular en cada estufa. Las posiciones de los tubos eran cambiadas cada 5 días con el fin de que la posición en la cámara no afectara en la síntesis de compuestos de cada clon.

Así, diez clones de cada genotipo fueron sometidos a diferentes estreses ambientales durante dos meses (desde el 21-Julio hasta el 22-Septiembre de 2010) con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas de oscuridad, y una temperatura constante de 25 °C. Las condiciones a las que se sometieron los diferentes clones de cada genotipo se detallan a continuación.

Radiación ultravioleta.

Los clones destinados a este ensayo fueron irradiados durante 16 horas al día con radiación ultravioleta, recibiendo un promedio de 4.9 KJ m⁻² de radiación UV-B biológicamente efectiva (UV-B_{BE}) aplicada mediante bombillas fluorescentes (Phillips, Ultraviolet-b, TL 20 W/09L).

Estrés hídrico.

Este tipo de estrés se simuló modificando la cantidad de Manitol en el medio (ver apartado III.4.2) en el cual crecían los clones. En un principio se realizaron varias experiencias simulando diferentes potenciales. Finalmente se optó por elegir dos tipos diferentes de estrés hídrico que se estimaron en 0.80 MPa y 1.5 MPa, considerándolo como elevado y muy elevado respectivamente.



Figura 16. Clones utilizados en la realización del estudio.

Combinación radiación ultravioleta y estrés hídrico

Esta combinación de tipos de estrés se realizó en la cámara con radiación ultravioleta donde se colocaron clones creciendo en medio de estrés hídrico, unos en estrés hídrico elevado y otros en estrés hídrico muy elevado.

Control.

Para las experiencias con radiación ultravioleta y potencial hídrico, el ambiente control en los clones estaba formado por medio de crecimiento (medio B) y se mantuvo en una cámara con luz artificial (ver apartado III.4.3) creciendo en un medio control. Para las experiencias en las cuales se combinaba radiación ultravioleta y potencial hídrico, el medio control estaba formado por medio de crecimiento (medio B) y se mantuvo en la cámara de luz ultravioleta.

Después de dos meses, los clones se extrajeron del medio contenido en los tubos de ensayo y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su posterior secado. A continuación fueron pesados y desmenuzados, y se llevó a cabo la extracción con cloroformo para su posterior análisis (ver apartado III.1.5).

III.4.4. Respuesta del genotipo al ambiente

La variación de los metabolitos secundarios en las plantas es el resultado de diversos factores. Puede haber un componente genético en esta variación, pero el genotipo puede ser modificado por una variedad de elementos bióticos y abióticos (Berenbaum y col., 1986). Por ello es importante estudiar cómo varía la síntesis de los compuestos del metabolismo secundario según diferentes gradientes ambientales (a través de las normas de reacción) y determinar qué proporción de la variabilidad fenotípica se debe a la variación genotípica (a través de la estimación de la heredabilidad) con el fin de poder predecir si esta especie es más o menos plástica y/o generalista.

III.4.4.1. Normas de reacción

La plasticidad fenotípica es la capacidad de un organismo de producir fenotipos diferentes en respuesta a cambios en el ambiente (Falconer, 1989). El concepto de plasticidad fenotípica se visualiza a partir de la confección de la norma de reacción. Así, la norma de reacción de un genotipo dado es su rango de respuestas fenotípicas a lo largo de un gradiente ambiental (Woltereck, 1909, citado en Schlichting y Pigliucci, 1998). Tradicionalmente se representa la norma de reacción situando los niveles de la variable ambiental en el eje X y los valores de expresión de un carácter fenotípico en el eje Y.

Una forma de entender la evolución de la norma de reacción es verla como una correlación genética. Considerando dos ambientes, el fenotipo es la forma en que el genotipo se expresa en los dos ambientes, entonces la norma de reacción se transforma en gráfico de correlación genotipo-fenotipo en los dos ambientes. Un organismo capaz de desarrollar el fenotipo óptimo en distintos ambientes es un generalista. Por el contrario, uno que no posee plasticidad fenotípica puede estar restringido a un solo ambiente y entonces podría considerarse un especialista (Griffiths y col, 2008).

Cuando el efecto de las diferencias ambientales en el fenotipo difiere de un genotipo a otro en la población, la varianza fenotípica incluye un componente debido a la interacción genotipo-ambiente. Si todos los genotipos tienen normas de reacción paralelas, de manera que la diferencia entre el fenotipo y los dos ambientes es igual para todos los genotipos, no existe interacción genotipo-ambiente.

III.4.4.2. Estudio de la Heredabilidad

La variación fenotípica observada (V_f) puede ser dividida en variación genotípica (V_g) y variación ambiental (V_a) (Falconer, 1989):

$$V_f = V_g + V_a$$

La heredabilidad de un rasgo en sentido amplio (H^2) es la proporción de la varianza total fenotípica (V_f) que puede explicarse mediante la variación genética total (V_g). H^2 no es una característica fija de un rasgo, sino que depende de la población en la que se midió y del conjunto de condiciones ambientales en el que esa población se ha desarrollado (Falconer, 1989). Teniendo en cuenta las componentes de la varianza, la fórmula que hemos utilizado para su cálculo es la siguiente:

$$H^2 = S^2_{\text{genotipo}} / S^2_{\text{fenotipo}} = S^2_{\text{genotipo}} / (S^2_{\text{genotipo}} + S^2_{\text{genotipo x estrés}} + S^2_{\text{error}} + S^2_{\text{ambiente}})$$

Siendo S^2_{genotipo} : varianza debida al genotipo; $S^2_{\text{genotipo x estrés}}$: varianza debida a la interacción genotipo-estrés; S^2_{error} : varianza debida al error aleatorio/de muestreo; S^2_{ambiente} : varianza debida al factor ambiental.

En nuestro caso todos los genotipos estaban en el mismo ambiente por lo que la S^2_{ambiente} es cero, por ello, la fórmula final que hemos utilizado para el cálculo de la heredabilidad es:

$$H^2 = S^2_{\text{genotipo}} / (S^2_{\text{genotipo}} + S^2_{\text{genotipo x estrés}} + S^2_{\text{error}})$$

La heredabilidad es un parámetro sin dimensiones ya que es un cociente de varianzas del mismo carácter. Puesto que es una parte respecto al todo o lo que es lo mismo, el numerador está contenido en el denominador, desde un punto de vista teórico la heredabilidad varía de 0 a 1, aunque como cualquier estima sujeta a error, las estimas de heredabilidad pueden caer fuera de estos límites (Falconer, 1989).

A menudo se malinterpreta el concepto de heredabilidad como el grado de determinación genética o en qué medida el fenotipo está determinado por el

genotipo. Estas interpretaciones son incorrectas ya que puede haber muchos *loci* que afecten a un carácter, pero estar todos fijados, y por lo tanto no contribuirán a la varianza genética (Griffiths y col, 2008).

Es importante recordar que la heredabilidad se refiere a la variación del carácter en la población. Un error común es pensar que existe un valor de heredabilidad único para un determinado carácter en una especie, ya que éste varía a menudo entre poblaciones y entre ambientes. También es erróneo admitir que una heredabilidad 0 significa que el carácter no se encuentra afectado por los genes, de hecho todos los caracteres fenotípicos tienen un cierto componente genético, ya que los individuos se constituyen atendiendo a un programa genético. Esta confusión se esfuma si nos centramos en la variación. Una heredabilidad 0 quiere decir que no hay varianza genética aditiva en esa población en ese ambiente en particular, así, la varianza fenotípica se debe enteramente a la varianza ambiental y a los componentes no aditivos de la varianza genética. Finalmente, destacar que otra idea equivocada es admitir que una heredabilidad de 1 significa que el ambiente no afecta al carácter. Una heredabilidad de 1 sólo significa que la variación ambiental que afecta a esa población particular no afecta a la varianza fenotípica. Aún así, si el ambiente cambiara, este cambio podría afectar a la media y la varianza del carácter en la población (Griffiths y col, 2008).

Por todo ello, se deduce que la heredabilidad no es lo contrario a la plasticidad fenotípica. Un carácter puede presentar una heredabilidad perfecta en una población y estar sujeto también a grandes cambios al variar el ambiente (Griffiths y col, 2008).

Los diferentes estreses ambientales no están influidos por los mismos genes. Estos estreses activan de forma diferente los genes, de manera que cada estrés activa la expresión de unos genes para que finalmente se sinteticen determinados compuestos en las plantas.

Ante la pregunta de si los genes influyen o no en alguna medida en la variación observada en un carácter, en nuestro caso en la cantidad de compuestos del metabolismo secundario secretados por *C. ladanifer*, podemos afirmar que la variación

de unos individuos a otros no resulta necesariamente una variación genética. En principio, es fácil determinar si para un rasgo particular hay una variación genética influyendo en la variación fenotípica entre organismos. Si están implicados genes, los individuos biológicamente emparentados deberían parecerse más unos a otros que los no emparentados. Tales correlaciones entre parientes, sin embargo, indican variación genética sólo si los parientes no comparten un ambiente común en mayor medida que los individuos no emparentados (Griffiths y col, 2008).

III.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos efectuados en los diferentes estudios, han sido realizados mediante el programa estadístico SPSS-Win 15.0.

III.5.1. Análisis estadístico en la cuantificación de la variabilidad en los metabolitos secundarios

III.5.1.1. Entre estaciones, órganos, edades y años

En relación al procedimiento para cuantificar la variabilidad del metabolismo secundario como respuesta al ambiente, y debido a la no normalidad de los datos, se decidió utilizar tests no paramétricos. Los resultados se sometieron al test de Friedman (muestras apareadas) para determinar si había diferencias significativas entre estaciones, órganos, edades y años. Para establecer entre qué estación, órgano, edad y año había diferencias significativas, fue usado el test estadístico Wilcoxon. Las diferencias se consideraron significativas con un nivel de significación $p \leq 0,05$.

III.5.1.2. Intrapoblacional: en una población de *C. ladanifer*

En el estudio de la variabilidad de los metabolitos secundarios en una población de *C. ladanifer*, se utilizó el Análisis Clúster (método UPGMA) para analizar la similitud química en la composición de metabolitos secundarios entre individuos. Debido a la gran cantidad de datos se pudo utilizar test paramétricos. ANOVA para determinar si había diferencias significativas entre diferentes grupos y la corrección de Bonferroni para establecer qué grupos eran significativamente diferentes (con un nivel de significación $p \leq 0,05$).

III.5.1.3. Interpoblacional: en varias poblaciones de *C. ladanifer*

Para analizar cómo varían los compuestos del metabolismo secundario en varias poblaciones de *C. ladanifer* también se aplicó Análisis Clúster (método UPGMA) con el fin de analizar también la similitud química en este tipo de compuestos de las poblaciones seleccionadas. Debido a la no normalidad de los datos y a que las muestras son independientes, los resultados se sometieron al test de Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas entre poblaciones y el test U de Mann-Whitney para determinar entre qué poblaciones había diferencias significativas, con un nivel de significación $p \leq 0.05$.

III.5.1.4. Entre clones de *C. ladanifer*

Finalmente, para estudiar cómo influye la componente genética en la variabilidad fenotípica en la síntesis de metabolitos secundarios, debido a la no normalidad de los datos, los resultados se expusieron al igual que en el estudio anterior al test de Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas entre genotipos y el test U de Mann-Whitney para determinar entre cuáles había diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

III.5.2. Análisis Clúster

El Análisis Cluster es un conjunto de técnicas multivariantes cuyo objetivo es agrupar elementos, en nuestro caso individuos y poblaciones, basándose en las características que éstos poseen. El Análisis Clúster clasificará a los objetos, de tal forma que cada objeto será muy parecido a los que hay en su grupo (clúster). Los grupos resultantes deben mostrar mucha homogeneidad entre los elementos del grupo y un alto grado de heterogeneidad entre los diferentes grupos.

En principio, para poder unir los individuos o poblaciones en grupos, se eligió una medida de similitud entre ellos, de tal manera que ésta nos marcaba la relación entre los individuos. Se eligió la distancia como medida de asociación,

específicamente la Distancia Euclídea (la distancia que existe entre los datos tomados como puntos en el espacio). Así, los grupos que se formarán como más parecidos serán aquellos cuya distancia sea la mínima.

La técnica clúster que se eligió fue el Método Jerárquico disociativo, aquel que para formar un cluster nuevo une o separa alguno ya existente para dar origen a otros dos de forma que se minimice una distancia. En este tipo de método, se parte de un solo grupo que contenga a todos los individuos y se va separando hasta llegar a formar grupos individuales.

Como Método de Conglomeración se eligió la Vinculación Inter-grupos, es decir, el Método del Promedio, UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages). Finalmente, la variable se estandariza utilizando puntuaciones Z.

El resultado final de este tipo de análisis es una estructura jerárquica de conglomerados llamado dendrograma.

III.5.3. Análisis de las Componentes de la varianza

El procedimiento de Análisis de Componentes de Varianza está diseñado para estimar la contribución de múltiples factores a la variabilidad de una variable dependiente, en nuestro caso sería cantidad secretada de compuestos del metabolismo secundario en *C. ladanifer*. A partir del programa estadístico Spss 15.0 se estimaron las componentes de la varianza mediante el Modelo Lineal General, el cual relaciona la distribución aleatoria de la variable dependiente con la parte sistemática (no aleatoria) a través de una función.

En este trabajo, hemos recurrido al Análisis de las Componentes de la Varianza en dos estudios: para analizar la variación intra e interpoblacional entre distintas poblaciones muestreadas y para determinar cómo repercute la componente genética (genotipo) en el fenotipo, por lo que el tratamiento y significado de los datos será diferente. Sin embargo, en ambos estudios se utilizó el Modelo Factorial Completo y el método de análisis elegido para estimar las componentes de la varianza

fue el de Máxima Verosimilitud Restringida (este tipo de método fuerza la estimación para que los resultados no sean negativos).

III.5.3.1. Variación inter e intrapoblacional

En este estudio y para el cálculo de las Componentes de la Varianza se realizó el siguiente diseño estadístico: como variable dependiente se consideró la variable “Cantidad total de compuestos”, y como factor aleatorio, “Población”. En este tipo de estudio se tuvo en cuenta las cantidades medias secretadas de cada compuesto en las 13 poblaciones elegidas. A partir del Análisis de las Componentes de la Varianza, se obtuvo una estimación de la variabilidad existente dentro de una población (intrapoblacional) y la que existe entre poblaciones (interpoblacional), de forma que se puede estimar qué componente es mayor o menor.

III.5.3.2. Estimación de la heredabilidad

Para evaluar el nivel de determinación genética en la producción de compuestos del metabolismo secundario en *C. ladanifer*, fue necesario realizar el análisis de las componentes de la varianza (S^2) a partir del Modelo Lineal General, como se ha comentado anteriormente.

El diseño estadístico consistió en determinar como variable dependiente la variable “Cantidad total secretada” de los diferentes compuestos; el factor fijo fue la variable “Estrés ambiental” y el factor aleatorio fue la variable “Genotipo”. A partir de las estimaciones de las componentes de la varianza y con la fórmula anterior se pudo estimar la heredabilidad de los compuestos del metabolismo secundario en *C. ladanifer* según diferentes estreses ambientales.

RESULTADOS

IV.1. VARIACIÓN CUANTITATIVA DE COMPUESTOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN HOJAS JÓVENES, MADURAS Y TALLOS DE *Cistus ladanifer*

En la Figura 17 se muestra la suma total de flavonoides y diterpenos (mg/g de peso seco -PS-) cuantificados en hojas jóvenes, maduras y tallos fotosintéticos de *C. ladanifer*, que han sido muestreados desde el verano del 2006 hasta la primavera del 2008. Estas cantidades son el resultado de realizar la media de 15 individuos en las 8 estaciones analizadas (número de datos = 15 individuos x 3 réplicas x 8 estaciones = 360).

Los resultados ponen de manifiesto que existen diferencias cuantitativas significativas entre las tres partes de la planta elegidas para realizar este estudio. Las hojas jóvenes son las que presentan mayor cantidad de flavonoides y diterpenos (16.7 mg/g PS), a éstas le siguen los tallos (10.6 mg/g PS), y finalmente son las hojas maduras (9.3 mg/g PS) las que tienen menor cantidad.

Si analizamos las cantidades de cada uno de los flavonoides y diterpenos (Tabla 4), los compuestos mayoritarios son los flavonoides, destacando el K-3,7 con cantidades superiores al resto. Cuando se analizan las diferencias significativas entre hojas jóvenes, maduras y tallos, se observa que entre flavonoides, la Ap-7 y el K-3,7 presentan diferencias significativas en las tres partes analizadas mientras que Ap, Ap-4 y K-3 sólo presentan diferencias entre hojas jóvenes y tallos respecto a hojas maduras. En los diterpenos, el compuesto mayoritario es el Dt-1 siendo significativamente diferente entre las hojas jóvenes, maduras y tallos.

La diferencia existente entre órganos y en diferentes estados de desarrollo, tanto para flavonoides como para diterpenos, se hace más patente cuando las cantidades de estos compuestos se expresan como porcentajes relativos al total (Tabla 5). Como puede apreciarse, en relación a los flavonoides, los porcentajes de

Ap, K-3, Ap-4 y Ap-7 son parecidos entre hojas jóvenes y maduras, diferenciándose en la contribución del K-3,7; sin embargo los tallos difieren en la composición de todos los flavonoides. Con respecto a los diterpenos, al igual que con las cantidades expresadas en la Tabla 3, la contribución porcentual difiere considerablemente entre ellos.

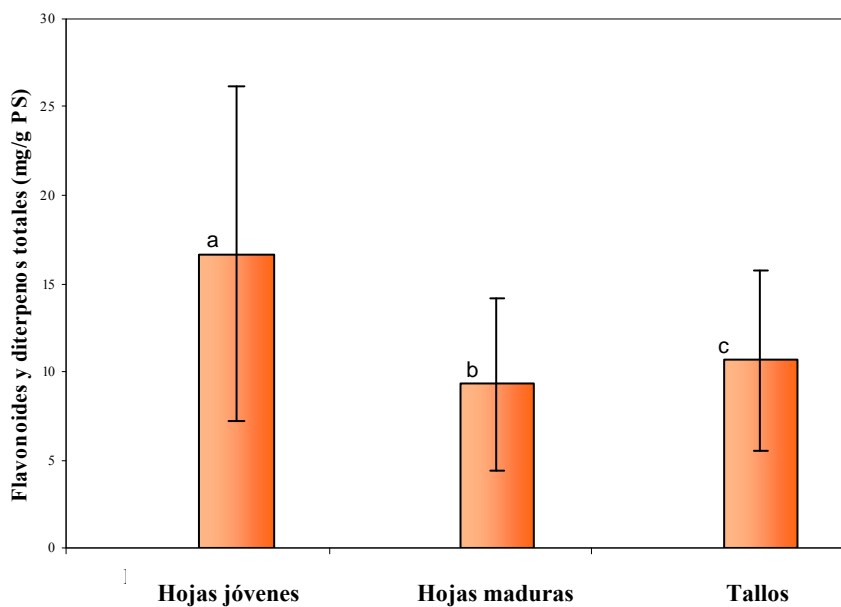


Figura 17. Flavonoides y diterpenos totales (mg/g PS) obtenidos en muestras de hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer* ($n=15 \times 3 \times 8=360$). Barras de error representan \pm desviación estándar. a, b, c : diferentes letras significan diferencias significativas, $p \leq 0.05$ (Test de Wilcoxon).

Tabla 4. Flavonoides y diterpenos (mg/g PS) obtenidos en muestras de hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer*. Entre paréntesis la desviación estándar. (n=15x3x8=360).

	Hojas jóvenes	Hojas maduras	Tallos
Flavonoides (mg/g PS)			
Ap	0.11(0.07) ^a	0.06(0.03) ^b	0.13(0.10) ^a
K-3	1.29(0.95) ^a	0.65(0.50) ^b	1.26(0.91) ^a
Ap-4	1.41(0.69) ^a	0.69(0.20) ^b	1.39(0.64) ^a
Ap-7	1.96(0.87) ^a	1.08(0.44) ^b	1.51(0.66) ^c
K-3,7	9.83(7.93) ^a	6.21(3.92) ^b	5.31(3.49) ^c
Total	14.40(9.38) ^a	8.69(4.72) ^b	9.61(4.87) ^b
Diterpenos (mg/g PS)			
Dt-1	2.04(1.19) ^a	0.56(0.32) ^b	0.88(0.87) ^c
Dt-2	0.11(0.09) ^a	0.03(0.02) ^b	0.04(0.04) ^c
Dt-3	0.16(0.19) ^a	0.03(0.04) ^b	0.07(0.08) ^c
Total	2.31(1.32) ^a	0.62(0.34) ^b	0.99(0.95) ^c

^{a, b, c}: diferentes letras significan diferencias significativas en hojas jóvenes, maduras y tallos, $p \leq 0.05$ (Wilcoxon Test). Ap: apigenina; Ap-4: 4'-O-metilapigenina; Ap-7: 7-O-metilapigenina; K-3: 3-O-metilcamferol; K-3,7: 3,7-di-O-metilcamferol; Dt-1: Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3: Ácido oxocátívico.

Tabla 5. Porcentajes relativos de flavonoides y diterpenos respecto al total obtenidos en muestras de hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer*. (n=15x3x8=360).

%	Hojas jóvenes	Hojas maduras	Tallos
Flavonoides			
Ap	0.67	0.61	1.23
K-3	7.70	6.96	11.92
Ap-4	8.41	7.43	13.08
Ap-7	11.58	11.65	14.25
K-3,7	57.70	66.68	50.20
Diterpenos			
Dt-1	12.14	6.05	8.12
Dt-2	0.66	0.28	0.35
Dt-3	0.96	0.35	0.65

Ap: apigenina; Ap-4: 4'-O-metilapigenina; Ap-7: 7-O-metilapigenina; K-3: 3-O-metilkamferol; K-3,7: 3,7-di-O-metilkamferol; Dt-1: Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3: Ácido oxocátívico.

IV.2. VARIACIÓN CUANTITATIVA ESTACIONAL DE LOS COMPUESTOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN HOJAS JÓVENES, MADURAS Y TALLOS DE *Cistus ladanifer*

Para cuantificar la variación estacional tanto de flavonoides como de diterpenos en la planta, por una parte se ha realizado la media de hojas y tallos en los 15 individuos en cada una de las estaciones ($n=15 \times 3 \times 3 \times 2=270$ por estación) correspondientes a los dos años de estudio y por otra parte se ha calculado la media estacional diferenciando entre hojas jóvenes, maduras y tallos ($n=15 \times 3 \times 2=90$ en cada estación).

Los resultados ponen de manifiesto (Figura 18) que existe una diferencia cuantitativa significativa entre las diferentes estaciones estudiadas, siendo en verano cuando se segrega la mayor cantidad de compuestos y en invierno la menor. En primavera y otoño se segregan cantidades intermedias.

Si realizamos el análisis por grupos de compuestos (Tabla 6), los flavonoides totales son los compuestos mayoritarios en todas las estaciones, estando su síntesis potenciada durante el verano. Por el contrario, los diterpenos son más abundantes en las estaciones de otoño-invierno. Si se considera el total de flavonoides y de diterpenos, existen diferencias significativas entre las cuatro estaciones; y analizando cada compuesto por separado, el K-3,7 muestra cantidades significativamente diferentes en cada una de las estaciones, la Ap-7, Ap-4 en tres de ellas, el K-3 y el Dt-3 en dos y la Ap solamente se diferencia el otoño del resto de las estaciones. Destacar que las cantidades de Dt-1 y el Dt-2 difieren entre estaciones aunque no son estadísticamente significativas debido a la alta desviación de los datos.

Si expresamos los porcentajes de cada uno de estos compuestos en las diferentes estaciones, las diferencias entre ellas son más evidentes. Como se observa en la Tabla 7, hay una clara diferencia en el aporte de K-3,7 en verano (70.2 %) frente

a otoño, invierno y primavera (56.4, 41.3 y 49.6 % respectivamente) y una menor contribución de las apigeninas en esta estación. Esto significa que la síntesis de los flavonoides está potenciada hacia el K-3,7 en verano.

Con respecto a los diterpenos, el comportamiento es distinto, es en invierno cuando se potencia la síntesis de los mismos, disminuyendo considerablemente en verano.

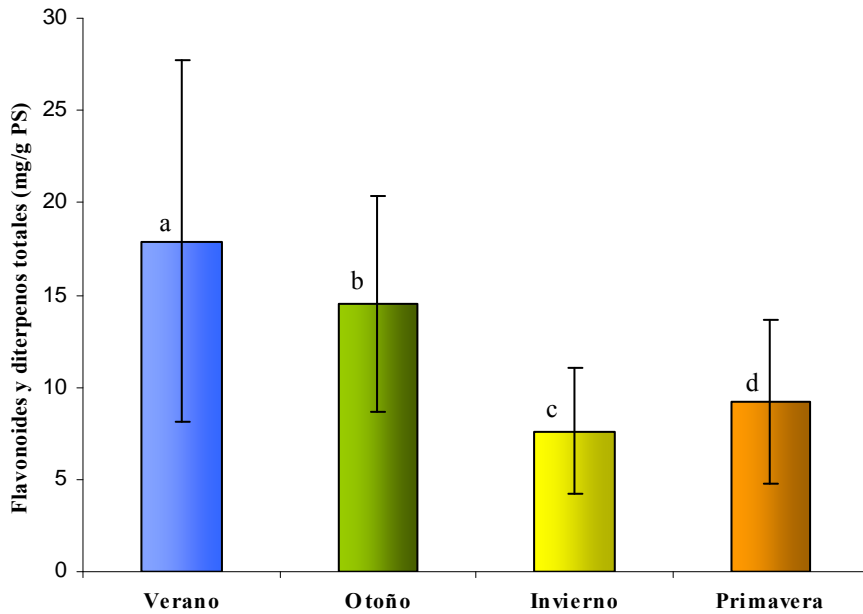


Figura 18. Flavonoides y diterpenos totales (mg/g PS) de *C. ladanifer* obtenidos en las estaciones de verano, otoño, invierno y primavera, (n=15x2x3x3=270). Barras de error representan \pm desviación estándar. a, b, c, d: diferentes letras significan diferencias significativas, $p \leq 0.05$ (Test de Wilcoxon).

Tabla 6. Flavonoides y diterpenos (mg/g PS) en *C. ladanifer* obtenidos en las diferentes estaciones estudiadas. Entre paréntesis la desviación estándar. (n=15x2x3x3=270).

	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Flavonoides (mg/g PS)				
Ap	0.10(0.05) ^a	0.13(0.09) ^b	0.08(0.06) ^a	0.09(0.10) ^a
K-3	1.40(0.08) ^a	1.51(0.97) ^a	0.63(0.50) ^b	0.76(0.67) ^b
Ap-4	1.07(0.40) ^a	1.35(0.90) ^a	1.11(0.47) ^b	1.18(0.70) ^c
Ap-7	1.77(0.69) ^a	1.82(0.98) ^a	1.18(0.56) ^b	1.38(0.61) ^c
K-3,7	12.54(7.70) ^a	8.21(3.43) ^b	3.15(1.78) ^c	4.57(2.82) ^d
Total	16.93(9.32) ^a	13.01(5.00) ^b	6.13(2.60) ^c	7.98(3.97) ^d
Diterpenos (mg/g PS)				
Dt-1	0.91(0.51) ^a	1.39(1.52) ^a	1.26(1.25) ^a	1.09(0.69) ^a
Dt-2	0.05(0.03) ^a	0.07(0.11) ^a	0.06(0.07) ^a	0.05(0.04) ^a
Dt-3	0.03(0.04) ^a	0.06(0.06) ^b	0.18(0.22) ^a	0.06(0.05) ^b
Total	0.99(0.56) ^a	1.53(1.66) ^b	1.50(1.41) ^{bc}	1,21(0.76) ^a

^{a, b, c, d:} diferentes letras significan diferencias significativas entre estaciones $p \leq 0.05$ (Wilcoxon Test). Ap: apigenina; Ap-4: 4'-O-metilapigenina; Ap-7: 7-O-metilapigenina; K-3: 3-O-metilcamferol; K-3,7: 3,7-di-O-metilcamferol; Dt-1: Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3: Ácido oxocátívico.

Tabla 7. Porcentajes relativos de flavonoides y diterpenos de *C. ladanifer* en las cuatro estaciones estudiadas. (n=15x2x3x3=270).

	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Flavonoides (mg/g)				
Ap	0.56	0.87	1.06	1.01
K-3	7.80	10.38	8.00	8.28
Ap-4	5.99	9.27	14.53	12.89
Ap-7	9.88	12.51	15.46	14.98
K-3,7	70.24	56.48	41.33	49.68
Diterpenos (mg/g PS)				
Dt-1	5.10	9.55	16.47	11.89
Dt-2	0.26	0.50	0.84	0.58
Dt-3	0.16	0.44	2.30	0.71

Ap: apigenina; Ap-4: 4'-O-metilapigenina; Ap-7: 7-O-metilapigenina; K-3: 3-O-metilkamferol; K-3,7: 3,7-di-O-metilkamferol; Dt-1: Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3: Ácido oxocatívico.

Por otra parte, cuando se cuantifica la variación estacional en hojas y tallos, los resultados ponen de manifiesto que existen diferencias significativas entre ellos en una misma estación (Figura 19), así como variación estacional en los diferentes órganos (Figura 20).

Es de destacar que las diferencias entre las tres partes de la planta estudiadas, no son las mismas en todas las estaciones (Figura 19). De esta forma, en verano existe una clara diferencia significativa entre ellos, destacando las hojas jóvenes con una mayor presencia de compuestos, mientras que en otoño se diferencian hojas maduras y tallos de hojas jóvenes, y en invierno y primavera hojas maduras de hojas jóvenes y tallos. Otro hecho importante a resaltar es que las hojas jóvenes y hojas maduras, cuya diferencia es el estado de desarrollo, muestran cantidades significativamente diferentes en las cuatro estaciones.

Por otra parte, las diferencias estacionales en hojas jóvenes, maduras y tallos muestran patrones diferentes (Figura 20). Así, las hojas jóvenes y maduras presentan cantidades significativamente diferentes en las cuatro estaciones mientras que la secreción en los tallos es más homogénea entre estaciones, únicamente otoño es la estación donde la secreción es significativamente superior.

Si analizamos cada grupo de compuestos por separado (Tabla 8), podemos destacar que los diterpenos totales muestran cantidades significativamente diferentes entre las partes de la planta estudiadas en las cuatro estaciones. Este comportamiento se repite para cada uno de los tres diterpenos, excepto para el Dt-2 en primavera y el Dt-3 en verano donde las hojas jóvenes muestran mayor cantidad de estos compuestos. Con respecto a los flavonoides, si observamos el total, únicamente existen diferencias significativas entre hojas jóvenes, maduras y tallos en verano. En invierno y primavera se diferencian las hojas maduras, que presentan menor cantidad que hojas jóvenes y tallos. En otoño sólo existen diferencias significativas en las cantidades secretadas en hojas jóvenes frente a hojas maduras. Destacar que dentro de los flavonoides, la cantidad secretada de Ap-4 muestra valores significativamente

diferentes en hojas jóvenes, maduras y tallos en las cuatro estaciones, el K-3,7 presenta cantidades diferentes en las estaciones de verano, invierno y primavera, el K-3 también es diferente significativamente en tres de las cuatro estaciones (verano, otoño y primavera) y la cantidad de Ap-7 es diferente en estos órganos en otoño y primavera. Por último, la cantidad de Ap en hojas maduras es significativamente diferente en las cuatro estaciones a las cantidades que muestran los tallos y las hojas jóvenes.

Si observamos cómo varían los flavonoides y diterpenos en cada estación en hojas jóvenes, maduras y tallos (Tabla 9) puede destacarse que cuando se cuantifica el total de flavonoides, las hojas presentan diferencias significativas en todas las estaciones; sin embargo en tallos no hay diferencias significativas entre verano y otoño ni entre invierno y primavera. Respecto al total de diterpenos, en hojas jóvenes la cantidad secretada en otoño e invierno es significativamente superior a la de primavera y verano; en hojas maduras hay una cantidad significativamente mayor en verano que en el resto de estaciones, y en tallos durante el verano-otoño se secretan cantidades significativamente menores a invierno-primavera. Entre los flavonoides, destaca el K-3,7 que presenta en hojas jóvenes cantidades significativamente diferentes en las cuatro estaciones, siendo muy superior en verano; sin embargo en tallos aunque se da una mayor cantidad, ésta no es significativa. En los diterpenos, destaca el Dt-3 por presentar diferencias significativas en todas las estaciones en las hojas jóvenes; el Dt-1 y el Dt-2 muestra mayor cantidad significativa en hojas jóvenes durante el otoño, mientras que en maduras, la mayor cantidad significativa se observa en verano. Con respecto a los tallos, aparecen mayores cantidades significativas en primavera-otoño.

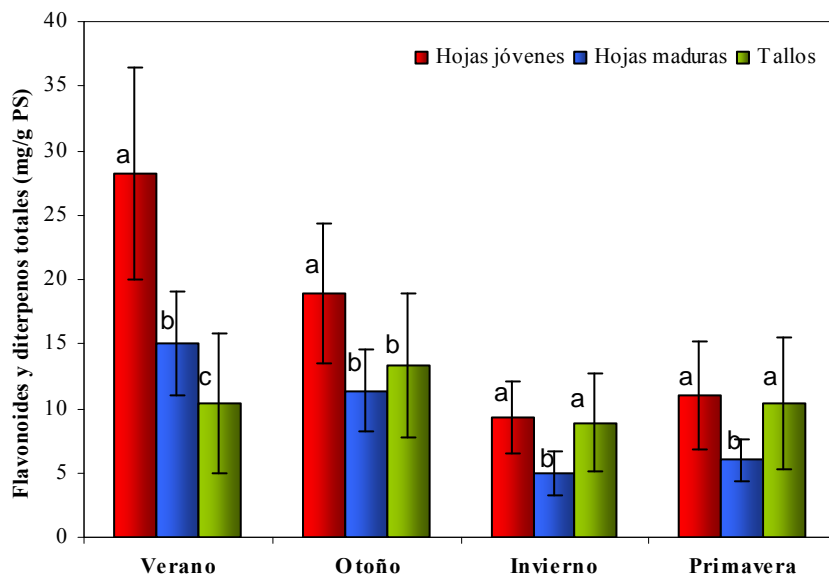


Figura 19. Flavonoides y diterpenos totales (mg/g PS) obtenidos en las estaciones de verano, otoño, invierno y primavera en el exudado de hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer* ($n=15 \times 3 \times 2=90$). Barras de error representan \pm desviación estándar. a, b, c: diferentes letras significan diferencias significativas en hojas jóvenes, maduras y tallos, $p \leq 0,05$ (Wilcoxon Test).

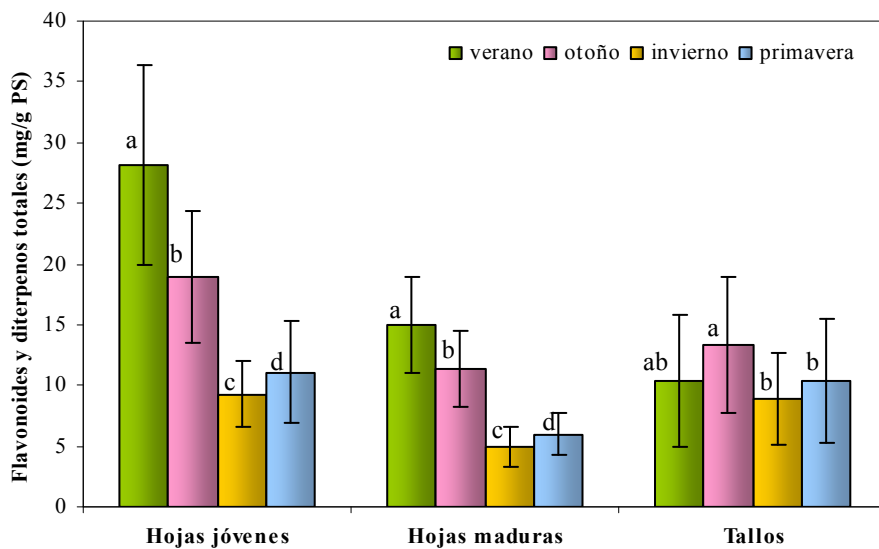


Figura 20. Flavonoides y diterpenos totales (mg/g PS) obtenidos en las estaciones de primavera, verano, otoño e invierno en hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer* (n=15x3x2=90). Barras de error representan \pm desviación estándar. a, b, c, d: diferentes letras significan diferencias significativas entre estaciones $p \leq 0,05$ (Wilcoxon Test).

Tabla 8. Flavonoides y diterpenos (mg/g PS) en hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer* en las 4 estaciones estudiadas, (n=15x3x2=90)

	Verano			Otoño			Invierno			Primavera		
	Hj	Hm	T	Hj	Hm	T	Hj	Hm	T	Hj	Hm	T
Flavonoides												
(mg/g PS)												
Ap	0.12(0.04) ^a	0.08(0.03) ^b	0.11(0.06) ^{ab}	0.15(0.11) ^a	0.07(0.02) ^b	0.16(0.07) ^a	0.10(0.05) ^a	0.03(0.01) ^b	0.11(0.06) ^a	0.08(0.04) ^a	0.05(0.02) ^b	0.15(0.15) ^b
K-3	1.95(0.95) ^a	1.09(0.51) ^b	1.25(0.86) ^c	1.66(1.08) ^a	0.91(0.46) ^b	2.02(0.96) ^c	0.75(0.53) ^a	0.27(0.20) ^b	0.80(0.52) ^a	0.83(0.45) ^a	0.32(0.16) ^b	1.13(0.90) ^c
Ap-4	1.37(0.28) ^a	0.78(0.19) ^b	1.06(0.43) ^c	2.06(1.03) ^a	0.69(0.16) ^b	1.30(0.66) ^c	1.28(0.25) ^a	0.56(0.11) ^b	1.48(0.36) ^c	1.01(0.42) ^a	0.75(0.25) ^b	1.79(0.81) ^c
Ap-7	2.49(0.58) ^a	1.41(0.24) ^b	1.42(0.54) ^b	2.56(1.12) ^a	1.21(0.51) ^b	1.68(0.69) ^c	1.46(0.33) ^a	0.67(0.13) ^b	1.40(0.64) ^a	1.43(0.49) ^a	1.07(0.38) ^b	1.64(0.75) ^c
K-3,7	20.72(6.62) ^a	10.82(3.30) ^b	6.68(3.50) ^c	9.25(4.01) ^a	7.85(2.42) ^a	7.46(3.40) ^a	3.22(1.64) ^a	2.91(1.29) ^b	3.64(2.29) ^c	5.95(2.66) ^a	3.27(1.09) ^b	4.48(3.59) ^c
Total	26.65(7.90) ^a	13.99(3.86) ^b	9.90(5.25) ^c	15.59(5.09) ^a	10.71(2.99) ^b	12.58(5.29) ^{ab}	6.78(2.10) ^a	4.45(1.59) ^b	7.51(3.05) ^c	9.29(3.67) ^a	5.45(1.41) ^b	9.18(4.85) ^b
Diterpenos												
(mg/g PS)												
Dt1	1.44(0.43) ^a	0.75(0.24) ^b	0.53(0.26) ^c	3.03(1.61) ^a	0.48(0.19) ^b	0.66(0.40) ^c	2.14(1.03) ^a	0.42(0.33) ^b	1.21(1.45) ^c	1.56(0.62) ^a	0.57(0.32) ^b	1.15(0.60) ^c
Dt 2	0.08(0.03) ^a	0.04(0.03) ^b	0.02(0.01) ^c	0.17(0.16) ^a	0.02(0.01) ^b	0.03(0.01) ^c	0.12(0.07) ^a	0.02(0.01) ^b	0.06(0.05) ^c	0.09(0.03) ^a	0.03(0.02) ^b	0.05(0.03) ^b
Dt 3	0.04(0.02) ^a	0.02(0.02) ^b	0.02(0.02) ^b	0.13(0.06) ^a	0.02(0.01) ^b	0.04(0.02) ^c	0.35(0.28) ^a	0.05(0.04) ^b	0.13(0.10) ^c	0.09(0.04) ^a	0.03(0.02) ^b	0.07(0.05) ^c
Total	1.56(0.46) ^a	0.81(0.26) ^b	0.56(0.30) ^c	3.32(1.75) ^a	0.52(0.20) ^b	0.72(0.43) ^c	2.60(1.11) ^a	0.48(0.36) ^b	1.46(1.55) ^c	1.73(0.70) ^a	0.62(0.41) ^b	1.26(0.66) ^c

^{a, b, c} diferentes letras significan diferencias significativas entre hojas jóvenes, maduras y tallos, p<0.05 (Wilcoxon Test).

Hj: hojas jóvenes. Hm: hojas maduras. T: tallos

Ap: apigenina; Ap-4: 4'-O-metilapigenina; Ap-7: 7-O-metilapigenina; K-3: 3-O-metilcamferol; K-3,7: 3,7-di-O-metilcamferol; Dt-1: Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3: Ácido oxocetáico.

Tabla 9. Flavonoides y diterpenos (mg/g PS) de *C. ladaniifer* en las diferentes estaciones en hojas jóvenes, maduras y tallos. Los datos son el resultado de realizar la media de los 15 individuos en cada estación (n=15x3x2=90).

	Hojas jóvenes						Hojas maduras			Tallos						
	Verano		Otoño		Invierno		Primavera		Verano		Otoño		Invierno		Primavera	
Flavonoides																
(mg/g PS)																
Ap	0.12(0.04) ^a	0.15(0.11) ^{abc}	0.10(0.05) ^{ad}	0.08(0.04) ^b	0.08(0.03) ^a	0.07(0.02) ^b	0.03(0.01) ^c	0.05(0.02) ^d	0.11(0.06) ^a	0.16(0.07) ^b	0.11(0.06) ^a	0.15(0.15) ^{ab}				
K-3	1.95(0.95) ^a	1.66(1.08) ^a	0.75(0.53) ^{bc}	0.83(0.45) ^c	1.09(0.51) ^a	0.91(0.46) ^a	0.27(0.20) ^b	0.32(0.16) ^c	2.02(0.96) ^b	1.25(0.86) ^a	0.80(0.52) ^a	1.13(0.90) ^a				
Ap-4	1.37(0.28) ^a	2.06(1.03) ^b	1.28(0.25) ^a	1.01(0.42) ^c	0.78(0.19) ^a	0.69(0.16) ^b	0.56(0.11) ^c	0.75(0.25) ^{ab}	1.30(0.66) ^{abc}	1.06(0.43) ^a	1.48(0.36) ^{bc}	1.79(0.81) ^a				
Ap-7	2.49(0.58) ^a	2.56(1.12) ^a	1.46(0.33) ^b	1.43(0.49) ^b	1.41(0.24) ^a	1.21(0.51) ^b	0.67(0.13) ^c	1.07(0.38) ^d	1.68(0.69) ^a	1.42(0.54) ^a	1.40(0.64) ^a	1.64(0.75) ^a				
K-3,7	20.72(6.62) ^a	9.25(4.01) ^b	3.22(1.64) ^c	5.95(2.66) ^d	10.82(3.30) ^a	7.85(2.42) ^b	2.91(1.29) ^c	3.27(1.09) ^c	7.46(3.40) ^a	6.68(3.50) ^a	3.64(2.29) ^b	4.48(3.59) ^b				
Total	26.65(7.90) ^a	15.59(5.09) ^b	6.78(2.10) ^c	9.29(3.67) ^d	13.99(3.86) ^a	10.71(2.99) ^b	4.45(1.59) ^c	5.45(1.41) ^d	12.58(5.29) ^{ab}	9.90(5.25) ^a	7.51(3.05) ^{bc}	9.18(4.85) ^{bc}				
Diterpenos																
(mg/g PS)																
Dt-1	1.44(0.43) ^a	3.03(1.61) ^b	2.14(1.03) ^c	1.56(0.62) ^a	0.75(0.24) ^a	0.48(0.19) ^b	0.42(0.33) ^b	0.57(0.32) ^b	0.66(0.40) ^{abc}	0.53(0.26) ^a	1.21(1.45) ^{bc}	1.15(0.60) ^b				
Dt-2	0.08(0.03) ^a	0.17(0.16) ^b	0.12(0.07) ^c	0.09(0.03) ^a	0.04(0.03) ^a	0.02(0.01) ^b	0.02(0.01) ^c	0.03(0.02) ^{bc}	0.03(0.01) ^a	0.02(0.01) ^a	0.06(0.05) ^b	0.05(0.03) ^b				
Dt-3	0.04(0.02) ^a	0.13(0.06) ^b	0.35(0.28) ^c	0.09(0.04) ^d	0.02(0.02) ^a	0.02(0.01) ^{abc}	0.05(0.04) ^b	0.03(0.02) ^{bc}	0.04(0.02) ^b	0.02(0.02) ^a	0.13(0.10) ^c	0.07(0.05) ^c				
Total	1.56(0.46) ^a	3.32(1.75) ^b	2.60(1.11) ^c	1.73(0.70) ^a	0.81(0.26) ^a	0.52(0.20) ^b	0.48(0.36) ^b	0.62(0.41) ^b	0.72(0.43) ^a	0.56(0.30) ^a	1.46(1.55) ^b	1.26(0.66) ^b				

^{a, b, c, d} diferentes letras significan diferencias significativas entre estaciones; p<0.05 (Wilcoxon Test).

Ap: apigenina; Ap-4: 4'-O-metilapigenina; Ap-7: 7-O-metilapigenina; K-3: 3-O-metilapigenina; K-3,7: 3,7-di-O-metilapigenina; Dt-1: Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3: Ácido oxocativico.

IV. 3. VARIACIÓN CUANTITATIVA INTERANUAL DE LOS COMPUESTOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN HOJAS JÓVENES, MADURAS Y TALLOS DE *Cistus ladanifer*

Para estudiar la variación interanual en la síntesis de flavonoides y diterpenos en *C. ladanifer* se han procesado los datos de forma diferente: por un lado se ha calculado la media de hojas jóvenes, maduras y tallos de los 15 individuos y las cuatro estaciones para cada año (Figura 21); por otro lado, se ha calculado la media de hojas jóvenes, maduras y tallos de los 15 individuos para cada estación por año (Figura 22) y finalmente se ha cuantificado la variación interanual diferenciando hojas jóvenes, maduras y tallos (Figura 23). En la Tabla 10 se muestran los porcentajes de cada uno de los flavonoides y diterpenos obtenidos como media en hojas jóvenes, maduras y tallos en las cuatro estaciones de cada año. En la Tabla 11 se exponen las cantidades de flavonoides y diterpenos totales como media de los diferentes tejidos analizados de *C. ladanifer* por estación en cada año estudiado y finalmente en la Tabla 12 se han representado las cantidades de cada uno de los flavonoides y diterpenos obtenidos como media de los 15 individuos en cuatro estaciones, diferenciando entre hojas jóvenes, maduras y tallos.

Los resultados muestran (Figura 21) que la cantidad total de compuestos (suma de flavonoides y diterpenos) presentes en el exudado de hojas y tallos es significativamente mayor en el 2006 que en el 2007. Pero es de destacar, que la contribución porcentual de cada uno de los compuestos en los dos años estudiados (Tabla 10) es prácticamente la misma, no mostrándose variaciones cualitativas entre un año y otro.

Al examinar las cantidades totales de flavonoides y diterpenos en la planta en su conjunto (Figura 22) en las distintas estaciones de cada año que comprende el estudio, puede observarse que en las cuatro estaciones, las mayores cantidades son

superiores en el año 2006, aunque sólo son significativamente diferentes entre los inviernos.

Si analizamos los datos considerando las diferentes partes de la planta estudiadas (Figura 23), podemos destacar que en el 2006 se dan cantidades ligeramente superior al 2007, aunque sólo existen diferencias significativas en la cantidad presente en hojas jóvenes.

Observando las cantidades totales de flavonoides y diterpenos de hojas jóvenes, maduras y tallos de forma estacional y por años (Tabla 11), puede destacarse que las mayores cantidades significativas para el 2006 se dan en hojas jóvenes en las estaciones de invierno y primavera y en tallos en la estación de primavera; en el año 2007 las mayores cantidades significativas aparecen en tallos en verano.

Al analizar los grupos de compuestos por separado (Tabla 12) en las diferentes partes de la planta estudiadas durante los dos años de estudio, en relación al total de flavonoides, las mayores cantidades se obtienen en el año 2006 aunque sólo son significativas en hojas jóvenes. Por compuestos puede destacarse que las mayores cantidades significativas secretadas se dan en el año 2006 en la Ap-4 y Ap-7 en hojas jóvenes y el K-3,7 en hojas jóvenes y maduras. Respecto al total de diterpenos, se segregan mayores cantidades significativas en el 2006 en hojas jóvenes y tallos y en el 2007 en hojas maduras. Los Dt-1 y Dt-2 aparecen en mayor cantidad significativa en el 2006 en hojas jóvenes y tallos, sin embargo el Dt-3 muestra cantidades significativamente superiores en el 2007 en hojas jóvenes y maduras al igual que el Dt-1 en hojas maduras.

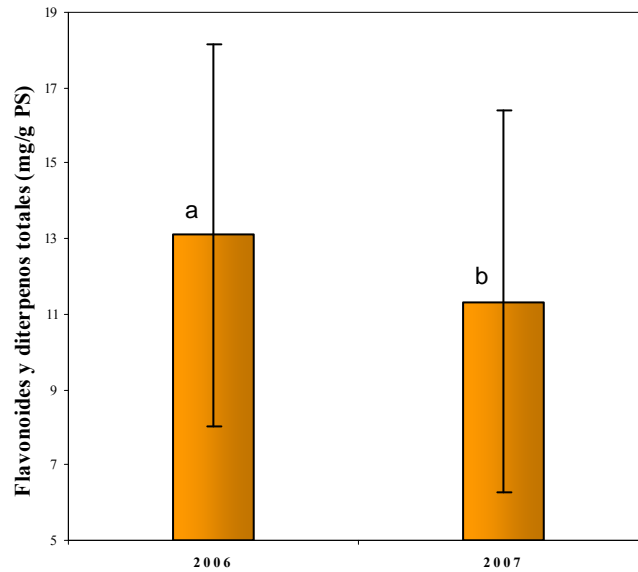


Figura 21. Flavonoides y diterpenos totales (mg/g PS) obtenidas como media de hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer* en cada año de muestreo ($n=15 \times 4 \times 3 \times 3=540$). Barras de error representan \pm desviación estándar. a, b: diferentes letras significan diferencias significativas, $p \leq 0,05$ (Wilcoxon Test).

Tabla 10. Porcentajes relativos de flavonoides y diterpenos respecto al total obtenidos como media de hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer* y en las cuatro estaciones de cada año de muestreo (n=15x4x3x3=540).

	2006	2007
Flavonoides (mg/g PS)		
Ap	0.76	0.88
K-3	8.07	9.39
Ap-4	9.94	8.98
Ap-7	12.70	11.95
K-3,7	57.67	58.35
Total	89.14	89.55
Diterpenos (mg/g PS)		
Dt-1	9.86	9.01
Dt-2	0.53	0.41
Dt-3	0.47	1.03
Total	10.86	10.45

Ap: apigenina; Ap-4: 4'-O-metilapigenina; Ap-7: 7-O-metilapigenina; K-3: 3-O-metilkamferol; K-3,7: 3,7-di-O-metilkamferol; Dt-1: Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3: Ácido oxocátívico.

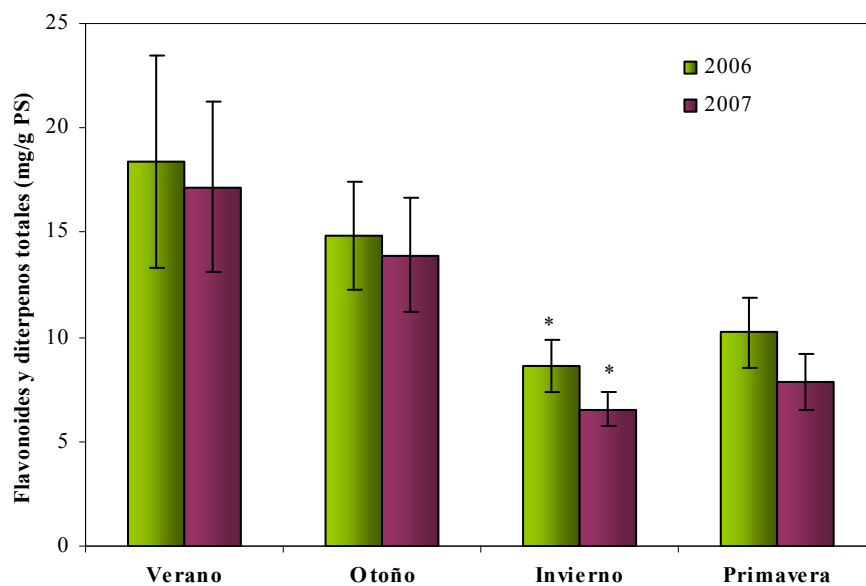


Figura 22. Flavonoides y diterpenos totales (mg/g PS) obtenidos como media de hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer* en las diferentes estaciones que comprende el estudio ($n=15 \times 3=45$). Barras de error representan \pm desviación estándar.* diferencias significativas entre años, $p \leq 0,05$ (Friedman Test).

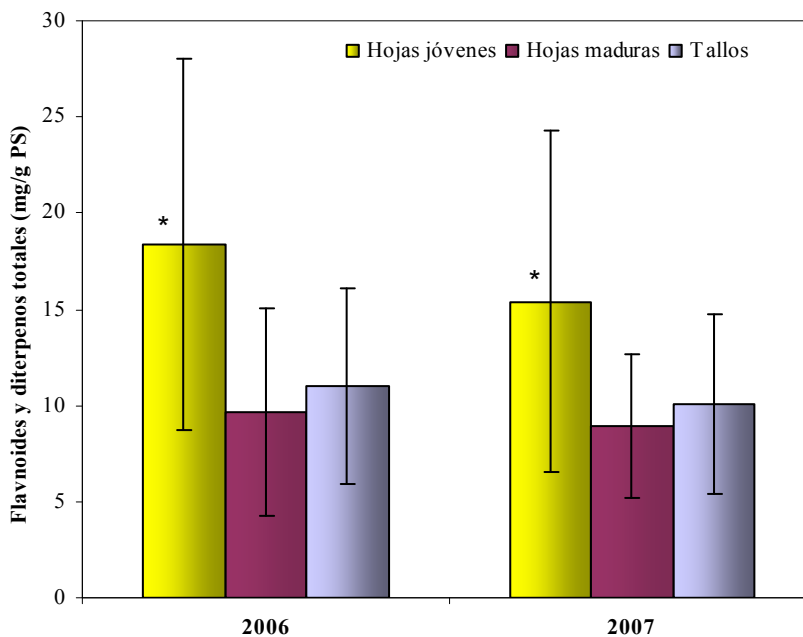


Figura 23. Flavonoides y diterpenos totales (mg/g PS) obtenidos en hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer* en cada uno de los años de muestreo ($n=15 \times 4 \times 3=180$). Barras de error representan \pm desviación estándar.* diferencias significativas entre años, $p \leq 0,05$ (Friedman Test).

Tabla 11. Flavonoides y diterpenos totales (mg/g PS) en hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladamifer* en los dos años estudiados (n=15x3=45).

	Verano		Otoño		Invierno		Primavera	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007
Hojas jóvenes	30.41(7.68)	25.69(6.23)	19.10(2.73)	19.21(3.49)	10.60(1.32)*	7.56(0.74)*	13.48(2.29)*	7.97(1.48)*
Hojas maduras	16.85(4.28)	12.61(2.83)	10.99(2.53)	11.62(2.81)	5.36(1.12)	4.64(0.82)	5.46(0.95)	6.79(1.29)
Tallos	7.94(1.69)*	13.23(2.43)*	14.58(2.76)	10.95(1.92)	9.98(1.30)	7.43(1.01)	11.75(1.50)*	8.77(1.45)*

* diferencias significativas entre años, $p < 0.05$ (Friedman Test).

Tabla 12. Flavonoides y diterpenos (mg/g PS) en hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer* analizados en los dos años de estudio (n=15x3x4=180).

	Hojas jóvenes		Hojas maduras		Tallos	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007
Flavonoides (mg/g PS)						
Ap	0.12(0.04)	0.10(0.09)	0.05(0.03)	0.06(0.03)	0.12(0.09)	0.14(0.10)
K-3	1.29(0.87)	1.30(1.04)	0.67(0.57)	0.61(0.42)	1.19(0.91)	1.32(0.91)
Ap-4	1.67(0.76)*	1.13(0.45)*	0.71(0.21)	0.67(0.19)	1.53(0.75)	1.26(0.45)
Ap-7	2.30(0.89)*	1.57(0.68)*	1.11(0.48)	1.05(0.39)	1.55(0.82)	1.45(0.43)
K-3,7	10.51(8.55)*	9.19(7.16)*	6.56(4.54)*	5.81(3.07)*	5.37(3.59)	5.17(3.40)
Total	15.89(9.65)*	13.29(8.89)*	9.11(5.40)	8.19(3.74)	9.76(5.10)	9.34(4.65)
Diterpenos (mg/g PS)						
Dt-1	2.28(1.30)*	1.79(0.09)*	0.49(0.32)*	0.64(0.31)*	1.10(1.13)*	0.65(0.32)*
Dt-2	0.13(0.12)*	0.09(0.05)*	0.02(0.02)	0.03(0.03)	0.05(0.06)*	0.03(0.01)*
Dt-3	0.11(0.11)*	0.21(0.24)*	0.01(0.01)*	0.05(0.05)*	0.06(0.06)	0.08(0.10)
Total	2.52(1.44)*	2.09(1.11)*	0.53(0.34)*	0.72(0.33)*	1.21(1.22)*	0.76(0.37)*

* diferencias significativas entre años, $p \leq 0.05$ (Friedman Test). Ap: apigenina; Ap-4: 4'-O-metilapigenina; Ap-7: 7-O-metilapigenina; K-3: 3-O-metilkamferol; K-3,7: 3,7-di-O-metilkamferol; Dt-1: Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3: Ácido oxocátívico

IV. 4. VARIACIÓN CUANTITATIVA POR EDAD DE LOS COMPUESTOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN HOJAS JÓVENES, MADURAS Y TALLOS DE *Cistus ladanifer*

Si analizamos los flavonoides y diterpenos totales del exudado de los 52 individuos seleccionados según la edad (véase Materiales y Métodos apartado III.1.3 y III.1.4), podemos destacar que existe una variación cuantitativa dependiente de la edad (Figura 24). Las jaras más jóvenes (de menos de un año de edad) segregan significativamente una cantidad menor de metabolitos secundarios que el resto de individuos con edades mayores. La secreción de compuestos a partir de una cierta edad (de 1 a 6 años) se mantiene más o menos constante hasta una edad más avanzada (a partir de 20 años) donde la secreción es menor aunque no es significativamente diferente.

El estudio de la variación de cada uno de los grupos de compuestos estudiados en jaras con edades diferentes (Tabla 12) mostró que todas las jaras estudiadas presentaban la misma cantidad de diterpenos independientemente de la edad, y cuando se analizan cada uno de ellos se observa que únicamente existen diferencias significativas en el Dt-3 en los individuos con edades de 1 a 6 años respecto al resto. Con respecto al grupo de flavonoides, tanto el total como cada uno de ellos por separado, la cantidad secretada por los individuos menores de 1 año es significativamente inferior.

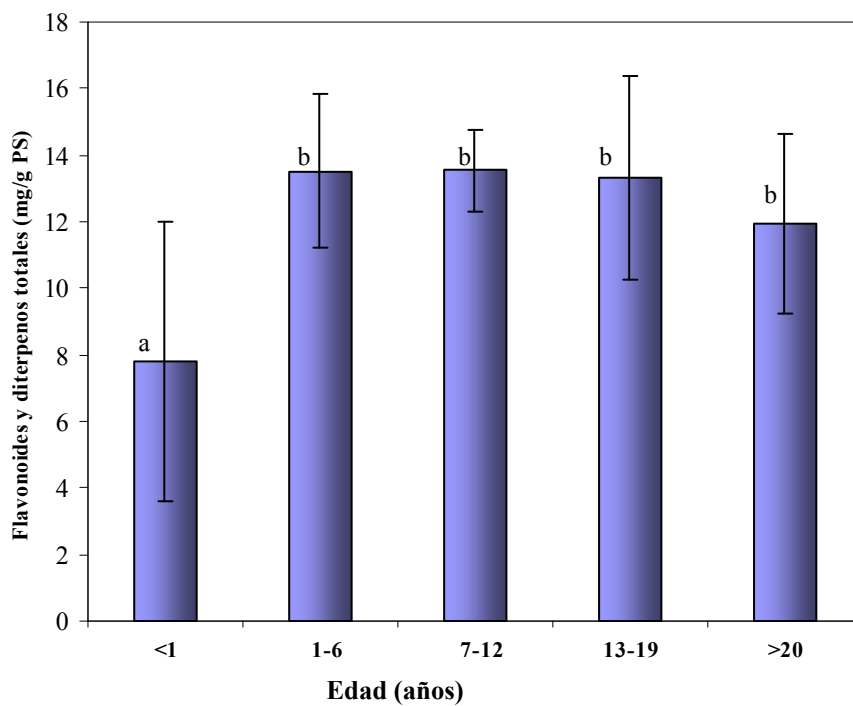


Figura 24. Flavonoides y diterpenos totales (mg/g PS) en el exudado de *C. ladanifer* según la edad ($n=52 \times 3 \times 3=468$). Barras de error representan \pm desviación estándar. a, b: diferentes letras implican diferencias significativas entre edades (Wilcoxon Test, $p < 0.05$).

Tabla 13. Flavonoides y diterpenos (mg/g PS) de *C. ladanifer* dependientes de la edad.

Edad (años)	< 1	1-6	7-12	13-19	> 20
Flavonoides (mg/g PS)					
Ap	0.05(0.02) ^a	0.11(0.03) ^b	0.13(0.03) ^b	0.12(0.08) ^b	0.12(0.04) ^b
K-3	1.64(0.69) ^a	3.32(0.73) ^b	3.72(0.65) ^b	3.23(1.74) ^{ab}	3.08(0.97) ^{ab}
Ap-4	0.87(0.39) ^a	1.32(0.30) ^b	1.14(0.14) ^a	1.20(0.21) ^a	1.25(0.27) ^{ab}
Ap-7	1.13(0.52) ^a	1.59(0.32) ^b	1.48(0.25) ^c	1.39(0.38) ^{abc}	1.43(0.19) ^{ac}
K-3,7	2.79(1.58) ^a	5.68(1.85) ^{ac}	5.69(1.26) ^{bc}	5.91(1.26) ^c	4.55(0.89) ^{abc}
Total	6.49(3.17) ^a	12.02(2.25) ^{bc}	12.15(1.40) ^c	11.85(2.54) ^{ac}	10.43(2.18) ^{ab}
Diterpenos (mg/g PS)					
Dt-1	1.17(1.07) ^a	1.30(0.30) ^a	1.17(0.33) ^a	1.29(0.61) ^a	1.37(0.51) ^a
Dt-2	0.05(0.04) ^a	0.07(0.02) ^a	0.08(0.02) ^a	0.08(0.04) ^a	0.07(0.03) ^a
Dt-3	0.08(0.04) ^a	0.13(0.06) ^b	0.16(0.11) ^{ab}	0.10(0.02) ^a	0.09(0.04) ^a
Total	1.30(1.15) ^a	1.50(0.32) ^a	1.41(0.30) ^a	1.47(0.65) ^a	1.53(0.55) ^a

^{a, b, c} : diferentes letras implican diferencias significativas entre edades (Wilcoxon Test, $p \leq 0.05$). Ap: apigenina; Ap-4: 4'-O-metilapigenina; Ap-7: 7-O-metilapigenina; K-3: 3-O-metilkamferol; K-3,7: 3,7-di-O-metilkamferol; Dt-1: Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3: Ácido oxocatívico.

IV.5. VARIABILIDAD EN LA SECRECIÓN DE FLAVONOIDES Y DITERPENOS EN EL EXUDADO DE *Cistus ladanifer*

Con el objetivo final de estudiar la variabilidad fenotípica en una población de *C. ladanifer*, una vez que se han calculado las diferencias cuantitativas de los compuestos del metabolismo secundario en el exudado de hojas jóvenes, maduras y tallos, entre las diferentes estaciones, años y edades, a continuación, se ha calculado la variabilidad de éstos.

Para el cálculo de esta variabilidad entre los individuos muestreados se ha utilizado el parámetro estadístico denominado coeficiente de variación (CV) que es el cociente entre la desviación típica y el valor medio, expresado en porcentaje.

IV. 5.1. Variabilidad entre hojas jóvenes, maduras y tallos

En la Tabla 14 se muestra el CV de hojas jóvenes, maduras y tallos respecto a la concentración de flavonoides y diterpenos totales. Posteriormente se diferencia entre flavonoides y diterpenos: en la Tabla 15 se representa respecto a la cantidad total de flavonoides y en la Tabla 16 respecto al total de diterpenos.

En estas tablas, puede observarse que el CV para hojas jóvenes, maduras y tallos tanto en la cantidad de compuestos totales como de flavonoides y diterpenos por separado supera el 50 %. Si consideramos la cantidad total de compuestos, el órgano que muestra mayor variación son los tallos (59.5%), al igual que para la cantidad total de diterpenos (98%). Sin embargo, al cuantificar los flavonoides por separado, las hojas jóvenes son las que presentan mayor variación (64.2%), seguidas de hojas maduras y tallos (54.3 y 51.2 % respectivamente).

Tabla 14. Coeficiente de variación (%) del total de flavonoides y diterpenos obtenido en muestras de hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer*. (n=15x3x8=360).

	Flavonoides y diterpenos totales (mg/g PS)	Desviación típica	Coeficiente de variación
Hojas jóvenes	16.85 ^a	9.36	55.5
Hojas maduras	8.90 ^b	5.14	57.7
Tallos	10.05 ^c	5.98	59.5

^{a, b, c}: diferentes letras significan diferencias significativas entre hojas jóvenes, maduras y tallos, ($p \leq 0,05$ Wilcoxon Test).

Tabla 15. Coeficiente de variación (%) del total de flavonoides obtenido en muestras de hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer*. (n=15x3x8=360).

	Flavonoides totales (mg/g PS)	Desviación típica	Coeficiente de variación
Hojas jóvenes	14.46 ^a	9.33	64.2
Hojas maduras	8.67 ^b	4.73	54.3
Tallos	9.61 ^c	4.93	51.2

^{a, b, c}: diferentes letras significan diferencias significativas entre hojas jóvenes, maduras y tallos ($p \leq 0,05$ Wilcoxon Test).

Tabla 16. Coeficiente de variación (%) del total de diterpenos obtenido en muestras de hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer*. (n=15x3x8=360).

	Diterpenos totales (mg/g PS)	Desviación típica	Coefficiente de variación
Hojas jóvenes	2.31 ^a	1.31	56.4
Hojas maduras	0.62 ^b	0.34	54.1
Tallos	0.96 ^{bc}	0.95	98.1

^{a, b, c:} diferentes letras significan diferencias significativas entre hojas jóvenes, maduras y tallos ($p \leq 0,05$ Wilcoxon Test).

IV.5.2. Variabilidad estacional

La cuantificación de la variabilidad en la síntesis de compuestos derivados del metabolismo secundario en las diferentes estaciones, se ha realizado haciendo la media en hojas jóvenes, maduras y tallos (Tabla 17, 18 y 19) y posteriormente se ha diferenciado entre hojas jóvenes, maduras y tallos (Tabla 20).

Si consideramos la planta en su conjunto y cuantificamos la suma de flavonoides y diterpenos (Tabla 17), los resultados ponen de manifiesto que en la estación donde la secreción varía menos es la de otoño (40.4%) seguido del invierno y primavera (45.1 y 48.2 % respectivamente) y la variación individual más elevada se obtiene durante el verano (54.7%). Si diferenciamos flavonoides de diterpenos (Tablas 18 y 19), con respecto a los flavonoides estudiados el comportamiento es el mismo: la menor variación se da en otoño (38.4%) seguida de invierno y primavera (42.4 y 49.7 %) y la mayor en verano (55.1%); aunque en este caso cabe destacar que

las diferencias entre otoño y verano son mayores. Si sólo consideramos los diterpenos, el orden que se establece es diferente, ahora el verano es la estación que presenta menor variabilidad (56.5%) y el otoño la que más (108.1%). Resaltar que los diterpenos presentan mayor variabilidad que los flavonoides a lo largo de todo el año.

Si consideramos la variabilidad estacional diferenciando hojas jóvenes, maduras y tallos (Tabla 20), podemos destacar por una parte que al considerar la suma total de compuestos, es el tallo la parte de la planta que mayor variabilidad muestra en las cuatro estaciones. La variabilidad en éste es muy parecida entre otoño e invierno (41.2 y 43.8 % respectivamente) y aumenta en verano y primavera (50.3 y 48.5 %). Con respecto a las hojas jóvenes, la variabilidad es prácticamente la misma en verano, otoño e invierno (29.5, 28.3 y 29.2 % respectivamente), aumentando en primavera (37.3 %). Por último, en hojas maduras obtenemos un CV muy parecido en verano, otoño y primavera (26.1, 27.5 y 27.2 % respectivamente) y crece en invierno (34.1 %).

Si separamos flavonoides y diterpenos, el comportamiento de los flavonoides es el mismo que el descrito para los compuestos totales. Con respecto a diterpenos, es necesario señalar que los CV son superiores a los flavonoides y el comportamiento en las estaciones también es diferente. De esta forma, en hojas jóvenes, la estación con un CV menor es el verano (29.5 %) seguido de invierno y primavera (42.3 y 40.7 % respectivamente) y por último el otoño (52.6%); en hojas maduras, el verano y otoño (32.0 y 38.4 % respectivamente) muestran los menores valores seguidos de la primavera e invierno (66.1 y 75.2 % respectivamente) con una diferencia considerable. Por último, los tallos en verano, otoño y primavera (50.1, 59.4 y 52.3 % respectivamente) presentan CV parecidos, incrementándose la variabilidad en invierno (69.4%).

Tabla 17. Coeficiente de variación (%) del total de flavonoides y diterpenos de *C. ladanifer* en las estaciones estudiadas. (n=15x3x3x2=270).

	Flavonoides y diterpenos totales (mg/g PS)	Desviación típica	Coeficiente de variación
Verano	17.92 ^a	9.81	54.7
Otoño	14.54 ^b	5.87	40.4
Invierno	7.62 ^c	3.43	45.1
Primavera	9.19 ^d	4.45	48.2

^{a, b, c, d}: diferentes letras significan diferencias significativas entre estaciones ($p \leq 0,05$ Wilcoxon Test).

Tabla 18. Coeficiente de variación (%) del total de flavonoides de *C. ladanifer* en las cuatro estaciones estudiadas. (n=15x3x3x2=270).

	Flavonoides totales (mg/g PS)	Desviación típica	Coeficiente de variación
Verano	16.93 ^a	9.32	55.1
Otoño	13.01 ^b	5.00	38.4
Invierno	6.14 ^c	2.60	42.4
Primavera	7.98 ^c	3.57	49.7

^{a, b, c}: diferentes letras significan diferencias significativas entre estaciones ($p \leq 0,05$ Wilcoxon Test).

Tabla 19. Coeficiente de variación (%) del total de diterpenos de *C. ladanifer* en las cuatro estaciones estudiadas. (n=15x3x3x2=270).

	Diterpenos totales (mg/g PS)	Desviación típica	Coeficiente de variación
Verano	0.99 ^a	0.56	56.5
Otoño	1.53 ^b	1.66	108.1
Invierno	1.50 ^{bc}	1.41	94.1
Primavera	1.21 ^a	0.76	62.8

^{a, b, c}: diferentes letras significan diferencias significativas entre estaciones ($p \leq 0,05$ Wilcoxon Test).

Tabla 20. Coeficiente de variación (%) de flavonoides y diterpenos totales en hojas jóvenes, maduras y tallos de *C. ladanifer* estudiadas por estaciones.

	Hojas jóvenes				Hojas maduras				Tallos			
	V	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P
Flavonoides totales	29.1	32.4	31.1	39.2	27.2	27.3	35.5	26.6	51.3	42.6	42.2	53.1
Diterpenos totales	29.2	52.6	42.3	40.7	32.0	38.4	75.2	66.1	50.1	59.4	69.4	52.3
Total compuestos	29.5	28.3	29.2	37.3	26.1	27.5	34.1	27.2	50.3	41.2	43.8	48.5

V: verano; O: otoño; I: invierno; P: primavera

IV. 5.3. Variabilidad por edades

Si se analiza la variabilidad para la cantidad media de flavonoides y diterpenos totales de *C. ladanifer* según la edad (Tabla 21), podemos destacar que la mayor variabilidad se produce en jaras con edades menores a 1 año (54.0%). A partir de esta edad la variabilidad disminuye (16.9 y 9.0 %) en los intervalos de edad 1-6 y de 7-12, volviendo a aumentar (22.9 y 22.6 %) en edades superiores.

Si diferenciamos por grupos de compuestos podemos destacar que los diterpenos (Tabla 23) presentan en todas las edades una mayor variabilidad que los flavonoides (Tabla 22), llegando incluso a CV cercanos al 88% en edades menores a 1 año. Sin embargo, en flavonoides el mayor CV es del 48.8%, coincidiendo también con esa edad. Puede destacarse que en ambos grupos, la edad que menor variabilidad registra es la comprendida entre 7 y 12 años (11.5 % para flavonoides y 21.2 % para diterpenos).

Tabla 21. Coeficiente de variación (%) de flavonoides y diterpenos totales de *C. ladanifer* según la edad.

	Flavonoides y diterpenos totales (mg/g PS)	Desviación estándar	Coeficiente de variación
< 1	7.79a	4.21	54.0
1-6	13.52b	2.29	16.9
7-12	13.55b	1.23	9.0
13-19	13.32b	3.06	22.9
> 20	11.96b	2.71	22.6

^{a, b}: diferentes letras significan diferencias significativas entre edades ($p \leq 0,05$ Wilcoxon Test).

Tabla 22. Coeficiente de variación (%) de flavonoides totales de *C. ladanifer* obtenido según la edad.

	Flavonoides totales (mg/g PS)	Desviación estándar	Coeficiente de Variación
< 1	6.49a	3.17	48.8
1-6	12.02b	2.25	18.7
7-12	12.15b	1.40	11.5
13-19	11.85b	2.54	21.4
> 20	10.43b	2.18	20.9

^{a, b}: diferentes letras significan diferencias significativas entre edades, ($p \leq 0,05$ Wilcoxon Test).

Tabla 23. Coeficiente de variación (%) de diterpenos totales de *C. ladanifer* obtenido según la edad.

	Diterpenos totales (mg/g PS)	Desviación estándar	Coeficiente de Variación
< 1	1.30a	1.15	87.9
1-6	1.50a	0.32	21.4
7-12	1.41a	0.30	21.2
13-19	1.47a	0.65	44.2
> 20	1.53a	0.55	36.0

^a: diferentes letras significan diferencias significativas entre edades (Wilcoxon Test).

IV. 5.4. Variabilidad anual

Cuando calculamos el CV anual para flavonoides y diterpenos totales (Tabla 24), la variabilidad es patente en ambos años, siendo mayor en el 2007 (45.5%) que en 2006 (38.6%) aunque este comportamiento difiere si se considera a los flavonoides y diterpenos por separado. Los flavonoides muestran un CV mayor en el 2007 (49.5%) y los diterpenos en el 2006 (47.8%) existiendo mayor diferencia en la variabilidad de estos compuestos entre los dos años de estudio. Estos resultados, nuevamente corroboran la mayor variabilidad de los diterpenos frente a los flavonoides.

Si analizamos el CV diferenciando hojas jóvenes, maduras y tallos (Tabla 25), respecto al total de los compuestos analizados, los mayores CV se dan en el año 2007 para hojas jóvenes (59.5%) y en el año 2006 para hojas maduras y tallos (58.2 y 49.6 %). Por grupos de compuestos, tanto flavonoides y diterpenos presentan mayor variabilidad en hojas maduras y tallos en el 2006 (59.3 y 64.0 % para flavonoides y diterpenos respectivamente en hojas maduras y 52.2 y 101.3 % respectivamente en tallos). Sin embargo, en hojas jóvenes los flavonoides presentan mayor variabilidad en el 2007 (66.8%) y los diterpenos en el 2006 (57.2%). Esto implica que las hojas jóvenes son las más variables entre años. Además cabe destacar que cuando se realiza la media de hojas jóvenes, maduras y tallos (Tabla 24), la mayor variabilidad para el total de los compuestos en el 2007 puede deberse a la contribución de las hojas jóvenes, en especial a los flavonoides.

Tabla 24. Coeficiente de variación (%) de flavonoides y diterpenos totales de *C. ladanifer* en los dos años que comprende el estudio (n=15x3x3x4=540).

	2006	2007
Flavonoides	43.7	49.5
Diterpenos	47.8	35.9
Total compuestos	38.6	45.5

Tabla 25. Coeficiente de variación (%) de flavonoides y diterpenos totales de *C. ladanifer* en hojas jóvenes, maduras y tallos en los dos años de estudio (n=15x3x4=180).

	Hojas jóvenes		Hojas maduras		Tallos	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007
Flavonoides totales	60.7	66.8	59.3	45.6	52.2	49.7
Diterpenos totales	57.2	53.0	64.0	45.2	101.3	48.9
Total compuestos	51.2	59.5	58.2	43.1	49.6	46.4

IV.6. VARIACIÓN INTRAPOBLACIONAL DE LOS COMPUESTOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN *Cistus ladanifer*

La primera observación que podemos destacar de los resultados obtenidos al analizar 100 individuos de una misma población de *C. ladanifer*, es que la variación entre los individuos es cuantitativa y no cualitativa (Anexo I). Los individuos analizados secretan los mismos compuestos, siendo mayoritarios los flavonoides agliconas: Ap, Ap-4, Ap-7, K-3 y K-3,7 frente a los diterpenos Dt-1, Dt-2 y Dt-3. Entre los flavonoides, el K-3,7 es el compuesto mayoritario, siendo la cantidad media de la población de 18.66 mg/g PS. Respecto a los diterpenos, el Dt-1 es el compuesto mayoritario, secretado con una media de 1.30 mg/g PS en la población analizada.

Las cantidades medias de flavonoides y diterpenos totales y del total de compuestos en los 100 individuos analizados (y como media de 3 muestras por cada individuo) se muestran en la Tabla 26. Con estos datos, se pone de manifiesto que como media, existen mayores cantidades de flavonoides (28.63 mg/g PS) que de diterpenos (1.45 mg/g PS). También podemos destacar que el coeficiente de variación en diterpenos (41.82 %) es ligeramente superior al de flavonoides (40.37 %), resaltando esta mayor variabilidad en la secreción de diterpenos que de flavonoides, como se ha demostrado en apartados anteriores.

Por otro lado, para estudiar las posibles similitudes entre estos 100 individuos pertenecientes a la misma población, se agruparon según la síntesis de los metabolitos secundarios mediante el dendrograma obtenido según el método de clasificación UPGMA (Figura 25). Este dendrograma nos indica que podemos obtener 4 grupos diferentes (A, B, C y D). También se han calculado el valor medio de la cantidad de compuestos secretados en los individuos que forman cada uno de los grupos (Figura 26). De forma general, la agrupación obtenida en el dendrograma pone de manifiesto que los valores en la concentración de estos compuestos (Tabla 27) oscilan entre 52.74 mg/g PS de flavonoides (en el grupo B) y 23.00 mg/g PS (en el grupo A) y entre 2.10 mg/g PS de diterpenos (en el grupo D) y 1.21 mg/g PS (en

el grupo A). Estas variaciones en las cantidades de compuestos son significativas. A continuación se destacan las siguientes particularidades de cada grupo (Figura 26).

Tabla 26. Cantidad (mg/g PS) de compuestos totales, flavonoides totales y diterpenos totales en hojas de *C. ladanifer* (valor medio de los 100 individuos muestreados). Desviación típica y coeficiente de variación (CV) ($n=100 \times 3=300$).

	Cantidad (mg/g PS)	Desviación típica (mg/g PS)	CV (%)
Compuestos totales	30.08	11.86	39.43
Flavonoides totales	28.63	11.56	40.37
Diterpenos totales	1.45	0.60	41.82

El grupo A está constituido por 66 individuos, siendo éstos los que muestran las concentraciones más bajas tanto de flavonoides (23.00 mg/g PS) como de diterpenos (1.21 mg/g PS).

Los 8 individuos que componen el grupo B constituyen un perfil químico con altas concentraciones de flavonoides, de hecho, son las cantidades más elevadas encontradas (54.72 mg/g PS). Sin embargo, el Dt-1 aunque se cuantifica en gran cantidad (1.4 mg/g PS), no es la más elevada de todos los grupos.

Un tercer grupo (C) lo forman también 8 individuos. Éstos presentan altas concentraciones de K-3,7 (27.2 mg/g PS) pero cantidades bajas del resto de los flavonoides (parecidas a las del grupo A). El Dt-1 es cuantificado en grandes cantidades (1.4 mg/g PS) y destaca el Dt-3 que presenta la mayor cantidad de todos los grupos (0.2 mg/g PS).

Finalmente, el grupo D lo componen 18 individuos con una secreción media de K-3,7 y K-3 (22.4 y 6.9 mg/g PS respectivamente). Este grupo lo constituyen individuos donde destaca la cantidad de Dt-1 que es superior a la del resto de grupos (1.93 mg/g PS).

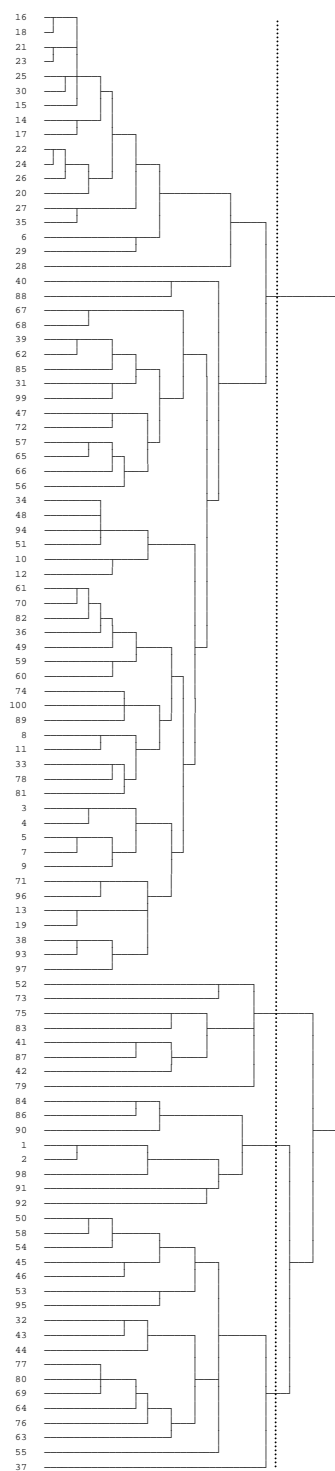


Figura 25. Dendrograma UPGMA de similaridad química en los metabolitos secundarios de *C. ladanifer* entre los individuos muestreados (n=100). ---- Corte a partir del cual se han elegido los grupos.

Como se puede apreciar en la Tabla 28, en general, los diterpenos presentan mayor CV que los flavonoides. Los mayores CV aparecen en el grupo A tanto para flavonoides (32.29%) como para diterpenos (41.10%), destacando con mayor CV la Ap-4 (45.39 %) entre los flavonoides y el Dt-3 (47.62%) entre los diterpenos. Los menores CV se cuantifican en el grupo B (14.78%) para flavonoides y en D para diterpenos (19.69%), en este caso la Ap-7 muestra el menor CV (15.59%) para flavonoides y el Dt-1 (21.57%) para los diterpenos.

En la Figura 27 se muestran las cantidades medias de cada compuesto en los diferentes grupos. Respecto a los flavonoides se observa que el grupo A es el que menor cantidad presenta de todos los flavonoides cuantificados y el grupo B el que mayor, siendo siempre estas diferencias significativas entre estos dos grupos. Los grupos C y D presentan cantidades intermedias. Las cantidades cuantificadas en el grupo C son menores que en el D excepto para K-3,7. Sólo se encuentran diferencias significativas entre A y C para Ap-7 y K-3,7, mientras que entre B y D las diferencias significativas se encuentran en Ap, K-3 y K-3,7.

Respecto a Dt-1 y Dt-2, es en el grupo A donde se han cuantificado las menores cantidades y en D las mayores, siendo estas diferencias significativas. Los grupos B y C presentan cantidades intermedias aunque no son significativamente diferentes al resto de los grupos. El Dt-3 aparece con mayor cantidad significativa en el grupo C y en el A con menor cantidad significativa.

Tabla 27. Cantidad (mg/g PS) de compuestos totales, flavonoides totales y diterpenos totales según los grupos establecidos por el dendrograma. Desviación típica entre paréntesis.

	Grupo			
	A	B	C	D
Compuestos totales	24.20 (7.66)a	54.34 (7.91)b	38.49 (6.80)c	37.70 (7.08)c
Flavonoides totales	23.00 (7.43)a	52.74 (7.80)b	36.84 (6.54)c	35.60 (7.01)c
Diterpenos totales	1.21 (0.50)a	1.60 (0.35)b	1.65 (0.55)bc	2.10 (0.41)c

a. b. c: diferentes letras significan diferencias significativas entre grupos ($p \leq 0.05$. ANOVA)

Tabla 28. Coeficiente de variación (%) de compuestos totales, flavonoides totales y diterpenos totales según los grupos obtenidos en el dendrograma.

	Grupo			
	A	B	C	D
Ap	37.07	20.84	22.17	16.62
Ap-4	45.39	17.89	39.49	16.03
Ap-7	35.09	15.59	24.95	9.33
K-3	42.14	18.02	36.33	36.05
K-3,7	39.14	18.72	18.44	26.44
Flavonoides totales	32.29	14.78	17.75	19.69
Dt-1	43.10	23.93	38.20	21.57
Dt-2	40.86	31.96	27.82	22.80
Dt-3	47.62	43.82	11.20	29.84
Diterpenos totales	41.10	22.09	33.08	19.69
Compuestos totales	31.64	14.55	17.67	18.78

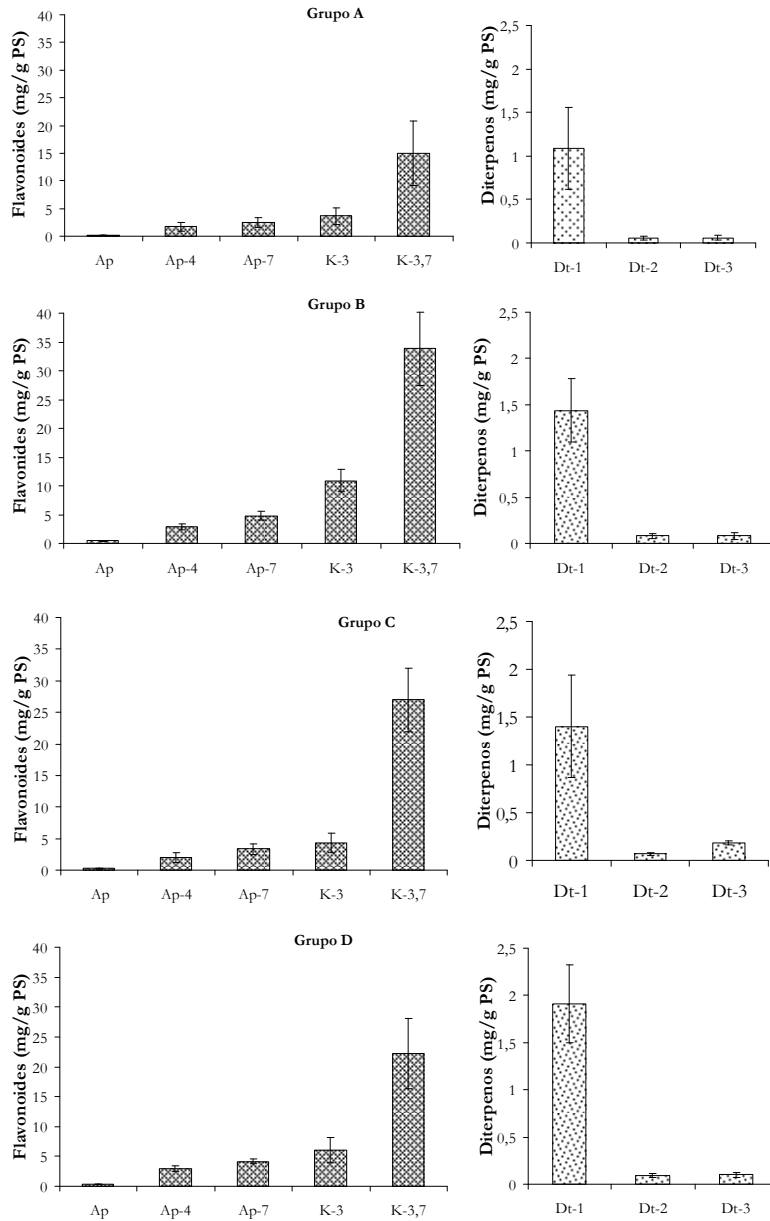


Figura 26. Cantidades de flavonoides y diterpenos (mg/g PS) en los diferentes grupos que se han establecido a partir del dendograma. Ap: apigenina; Ap-4: 4'-O-metilapigenina; Ap-7: 7-O-metilapigenina; K-3: 3-O-metilkamferol; K-3,7: 3,7-di-O-metilkamferol; Dt-1: Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3: Ácido oxocátívico.

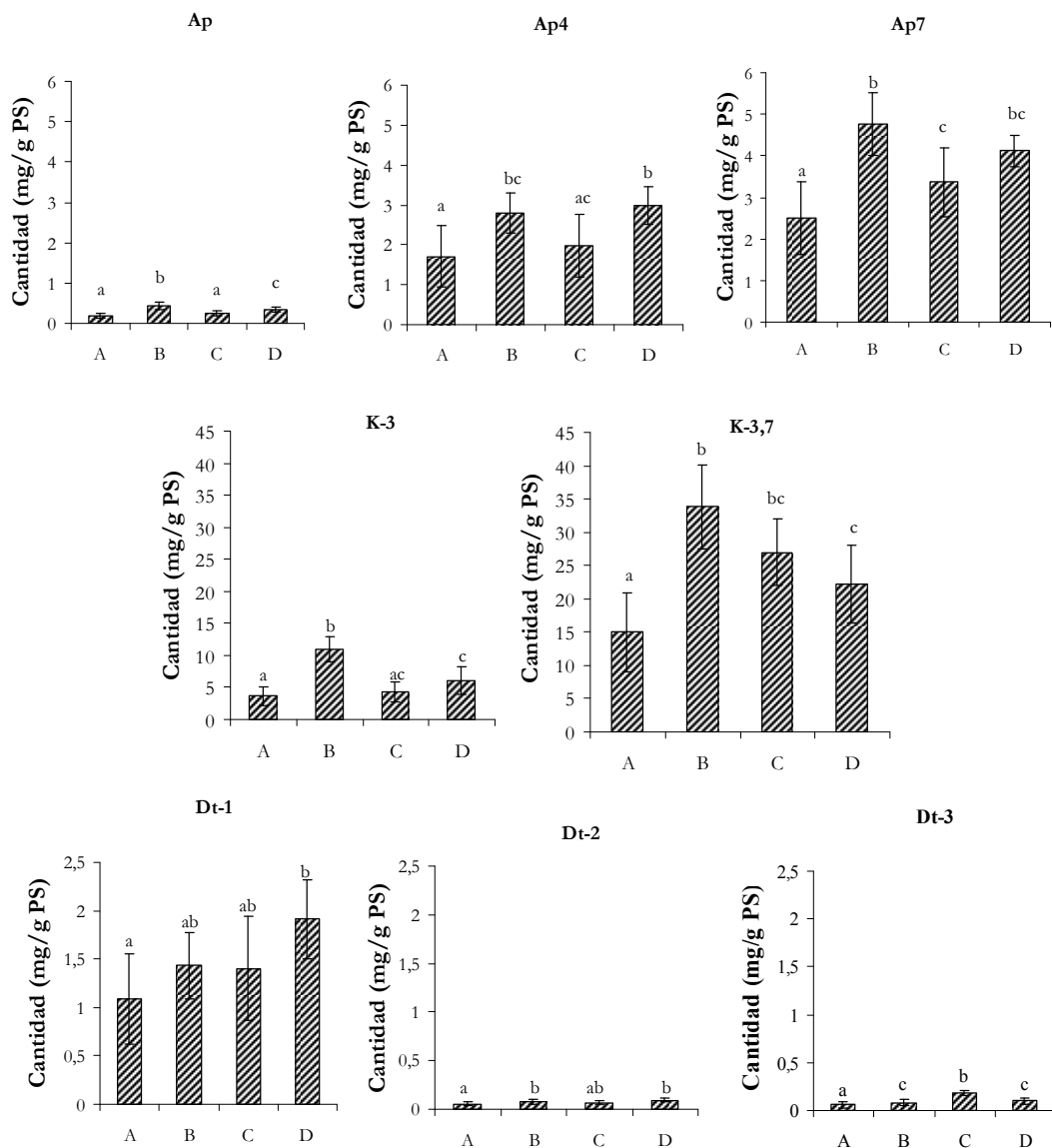


Figura 27. Cantidades de flavonoides y diterpenos (mg/g PS) en los 4 grupos obtenidos del dendrograma. Ap: apigenina; Ap-4: 4'-O-metilapigenina; Ap-7: 7-O-metilapigenina; K-3: 3-O-metilkamferol; K-3,7: 3,7-di-O-metilkamferol; Dt-1: Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3: Ácido oxocátivico. A: grupo A; B: grupo B; C: grupo C y D: grupo D. a.b.c: diferentes letras significan diferencias significativas entre grupos ($p \leq 0.05$, ANOVA).

IV.6.1. Distribución espacial de los individuos de la población estudiada

En la Figura 28 se muestra cómo se distribuyen espacialmente los individuos muestreados en la población. Según la diferenciación de los grupos realizada, se observa que el grupo A, al ser el más numeroso (66 individuos), se encuentra ampliamente distribuido por toda la zona. El grupo D (18 individuos) forma pequeños grupos distribuidos aleatoriamente y sólo hay una columna en la que no se encuentra ningún individuo de este grupo. Los grupos B y C son los grupos que menores individuos poseen, 8 individuos cada uno. El grupo B se distribuye al azar por todas las columnas menos por una y sólo tres de ellos se encuentran juntos en la zona centro. Los individuos del grupo C no se encuentran tan dispersos, concentrándose únicamente en las dos columnas exteriores de la zona estudiada.

De la distribución observada cabe destacar que la mayoría de los individuos que forman una población (66%) presentan bajas cantidades de todos y cada uno de los compuestos estudiados estando ampliamente distribuidos por toda la zona ocupada por la población. Por otro lado, tanto los individuos que presentan mayores cantidades en la mayoría de los compuestos (grupo B) como los que muestran cantidades intermedias (C y D) se intercalan entre los individuos de menores cantidades (grupo A). Los individuos de B y C están distribuidos de forma aleatoria y los del D formando grupos. Esta observación muestra que la disposición espacial de los diferentes individuos hace que la población presente una alta diversidad, de manera que cualquier individuo está rodeado de otro diferente a menos de 14,4 m de distancia. Únicamente 11 de los individuos muestreados, el 11% de la población, se podrían encontrar rodeados de individuos del mismo grupo, siendo de 30 m la distancia más lejana a la que se podría encontrar un individuo de otro grupo.

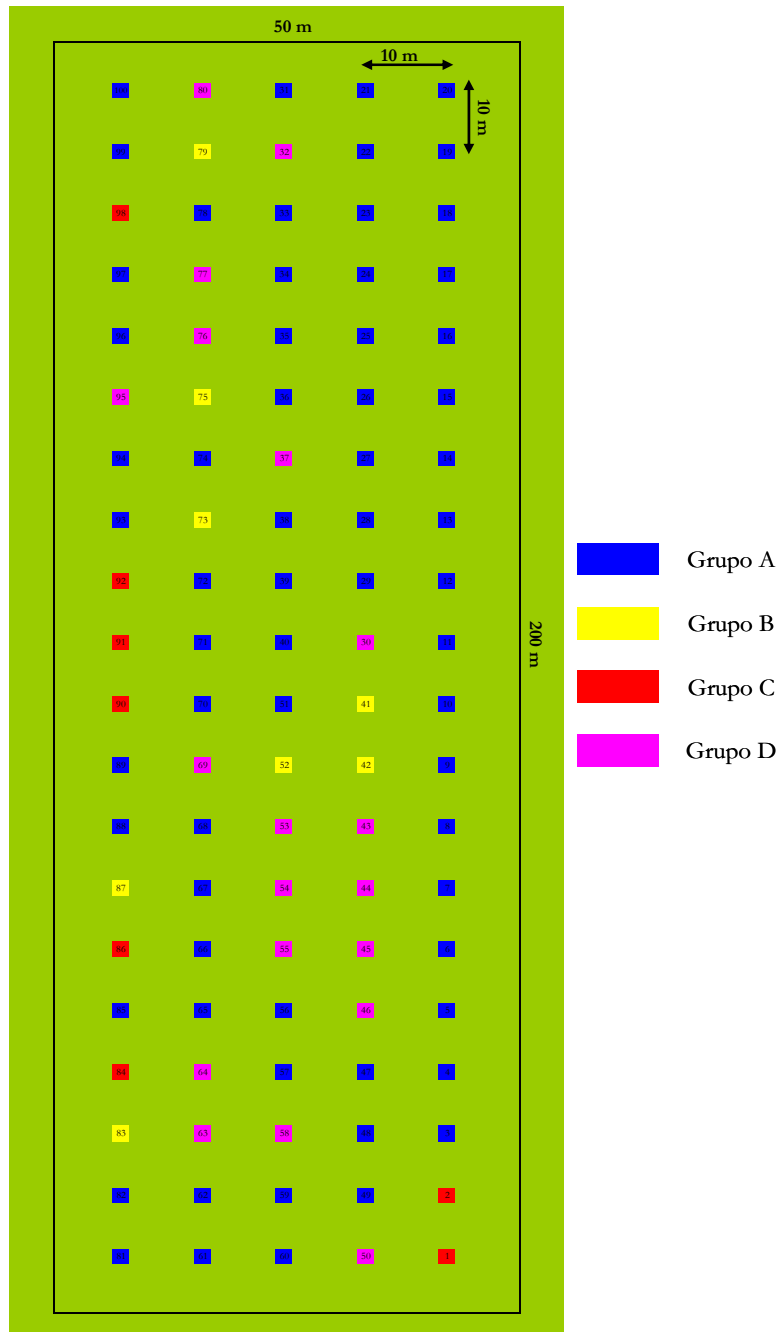


Figura 28. Distribución espacial de los diferentes individuos muestreados de *C. ladanifer*. Se han señalado los individuos que pertenecen a cada uno de los grupos diferenciados en el dendograma.

IV.7. VARIABILIDAD INTERPOBLACIONAL DE LOS COMPUESTOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN *Cistus ladanifer*

Para estudiar la variabilidad interpoblacional en la secreción de los compuestos del metabolismo secundario en *C. ladanifer*, es importante conocer las diferencias y similitudes entre las poblaciones estudiadas, qué relación hay entre esta síntesis y las diferentes variaciones ambientales y finalmente analizar si la variabilidad interpoblacional es mayor o menor que la intrapoblacional. Estos resultados nos aportarían información sobre si la variación entre poblaciones es mayor o menor que dentro de una misma población y por lo tanto si las condiciones ambientales son determinantes en la síntesis de este tipo de compuestos.

IV.7.1. Diferencias y similitudes entre las poblaciones estudiadas

Los resultados obtenidos del muestreo realizado en el mes de Octubre de 2009 en 13 poblaciones de *C. ladanifer* distribuidas por la Península Ibérica (Figura 14) ponen de manifiesto que la secreción tanto de flavonoides como de diterpenos difieren entre ellas. Teniendo en cuenta los compuestos totales, las poblaciones que secretan mayor cantidad significativa (Tablas 29 y 30) son Ponferrada y Hervás (48.91 y 47.96 mg/g PS, respectivamente) mientras que las que secretan menores cantidades son Huelva y Alburquerque (21.23 y 20.32 mg/g PS, respectivamente).

Si se realiza el análisis por grupos de compuestos, los flavonoides totales muestran el mismo patrón de secreción que el descrito anteriormente: las cantidades son mayores significativamente (Tablas 29 y 31) en las poblaciones de Hervás y Ponferrada (45.84 y 47.30 mg/g PS respectivamente) y las menores cantidades aparecen en Huelva y Alburquerque (19.63 y 18.74 mg/g PS). En los diterpenos totales se cuantifican mayores cantidades en Hervás y Monesterio (2.13 y 2.74 mg/g PS, respectivamente) (Tablas 29 y 32) y menores en el Pantano de Ricobayo y Azuaga (0.84 y 0.85 mg/g PS respectivamente).

Para determinar la variabilidad en la cantidad de compuestos secretados en las diferentes poblaciones se calculó el coeficiente de variación, CV, (Tabla 29). Destacando Huelva como la población con el mayor coeficiente de variación (51.40%) para flavonoides totales y Albuquerque (50.57%) para diterpenos totales. Destriana (2.28%) y Ricobayo (16.03%) presentan el menor coeficiente de variación para flavonoides y diterpenos respectivamente.

Las localidades con los mayores y menores CV difieren dependiendo de los grupos de compuestos estudiados. Las localidades ordenadas en función de los valores de los CV para la cantidad de flavonoides de mayor a menor cantidad son: Huelva (51.40), Monesterio (38.48), La Nava (32.08), Cazalla (26.72), Albuquerque (22.88), El Cubo (21.18), Azuaga (21.06), Ponferrada (18.31), Robledillo (15.45), Hornachos (12.80), Hervás (9.01), Ricobayo (7.49) y Destriana (2.28). Para los diterpenos totales, se estima el siguiente orden: Albuquerque (50.57), Huelva (36.61), Ponferrada (31.94), Robledillo (25.20), Monesterio (24.74), El Cubo (24.63), Hervás (23.64), La Nava (22.36), Azuaga (19.90), Hornachos (19.69), Destriana (16.58), Cazalla (16.46) y Ricobayo (16.03).

Según el análisis de la varianza y cuantificando la cantidad de flavonoides totales (Tabla 31), Hervás y Ponferrada son las poblaciones que presentan mayores diferencias significativas con el resto. El mismo resultado se obtiene si se tienen en cuenta los compuestos totales (Tabla 30). Sin embargo, la población de Monesterio es la que más se diferencia del resto al analizar las cantidades de diterpenos totales (Tabla 32).

Tabla 29. Cantidad media de compuestos totales, flavonoides totales y diterpenos totales (mg/g PS) en hojas jóvenes presentes en las distintas poblaciones muestreadas. DS: desviación estándar (mg/g PS). CV: coeficiente de variación (%) (n=10 x 5=50).

	Compuestos totales			Flavonoides totales			Diterpenos totales		
	Media	SD	CV	Media	SD	CV	Media	SD	CV
Alburquerque	20.32	4.21	20.73	18.74	4.29	22.88	1.58	0.80	50.57
Azuaga	28.44	5.76	20.25	27.59	5.81	21.06	0.85	0.17	19.90
Cazalla	33.81	8.61	25.46	32.27	8.62	26.72	1.54	0.25	16.46
Destriana	34.03	0.79	2.31	32.71	0.75	2.28	1.32	0.22	16.58
El Cubo	27.47	5.76	20.98	26.15	5.54	21.18	1.32	0.33	24.63
Hervás	47.96	4.27	8.90	45.84	4.13	9.01	2.13	0.50	23.64
Hornachos	26.69	3.41	12.79	24.83	3.18	12.80	1.86	0.37	19.69
Huelva	21.23	10.00	47.11	19.63	10.09	51.40	1.59	0.58	36.61
La Nava	21.93	6.93	31.61	20.81	6.68	32.08	1.4	0.31	22.36
Monesterio	22.08	8.00	36.24	19.34	7.44	38.48	2.74	0.68	24.74
Ponferrada	48.91	9.16	18.74	47.30	8.66	18.31	1.61	0.51	31.94
Ricobayo	32.07	2.32	7.23	31.23	2.34	7.49	0.84	0.13	16.03
Robledillo	33.76	5.47	16.22	32.76	5.06	15.45	1.62	0.41	25.20

Tabla 30. Diferencias significativas (*, $p \leq 0.05$) en la cantidad total (mg/g PS) de flavonoides y diterpenos en las distintas poblaciones muestreadas de *C. ladanifer* (ANOVA).

	Hue	Alb	Ric	Caz	Nav	Azu	Rob	Mon	Her	Des	Hor	Pon	Cub
Hue									*			*	
Alb									*			*	
Ric									*			*	
Caz												*	
Nav									*			*	
Azu									*			*	
Rob												*	
Mon												*	
Her											*		*
Des												*	
Hor												*	
Pon													*
Cub													

Hue: Huelva; Alb: Alburquerque; Ric: Pantano de Ricobayo; Caz: Cazalla de la Sierra; Nav: Nava de la Concepción; Azu: Azuaga; Rob: Robledillo; Mon: Monesterio; Her: Hervás; Des: Destriana; Hor: Hornachos; Pon: Ponferrada; Cub: El Cubo de la Tierra del Vino.

Tabla 31. Diferencias significativas (*, $p \leq 0.05$) en la cantidad (mg/g PS) total de flavonoides en las distintas poblaciones muestreadas de *C. ladanifer* (ANOVA).

	Hue	Alb	Ric	Caz	Nav	Azu	Rob	Mon	Her	Des	Hor	Pon	Cub
Hue									*			*	
Alb				*			*		*	*		*	
Ric									*			*	
Caz									*			*	
Nav									*			*	
Azu									*			*	
Rob												*	
Mon									*			*	
Her											*		*
Des												*	
Hor												*	
Pon													*
Cub													

Hue: Huelva; Alb: Alburquerque; Ric: Pantano de Ricobayo; Caz: Cazalla de la Sierra; Nav: Nava de la Concepción; Azu: Azuaga; Rob: Robledillo; Mon: Monesterio; Her: Hervás; Des: Destriana; Hor: Hornachos; Pon: Ponferrada; Cub: El Cubo de la Tierra del Vino.

Tabla 32. Diferencias significativas (*, $p \leq 0.05$) en la cantidad (mg/g PS) total de diterpenos en las distintas poblaciones muestreadas de *C. ladanifer* (ANOVA).

	Hue	Alb	Ric	Caz	Nav	Azu	Rob	Mon	Her	Des	Hor	Pon	Cub
Hue								*					
Alb								*					
Ric								*	*		*		
Caz								*					
Nav								*					
Azu								*	*		*		
Rob								*					
Mon										*		*	*
Her													
Des													
Hor													
Pon													
Cub													

Hue: Huelva; Alb: Alburquerque; Ric: Pantano de Ricobayo; Caz: Cazalla de la Sierra; Nav: Nava de la Concepción; Azu: Azuaga; Rob: Robledillo; Mon: Monesterio; Her: Hervás; Des: Destriana; Hor: Hornachos; Pon: Ponferrada; Cub: El Cubo de la Tierra del Vino.

Los datos obtenidos de las distintas poblaciones elegidas en base a un gradiente ambiental, se sometieron a un Análisis (ver apartado III.5.2 de Materiales y Métodos), mediante el cual se obtuvo el dendrograma que se muestra en la Figura 29. Las distintas poblaciones aparecen agrupadas según el patrón de secreción. Como se aprecia a partir del corte (-----) elegido, las poblaciones se reúnen en 4 grupos: Grupo A formado por las poblaciones de Hervás, Destriana, Ricobayo y Cazalla de la Sierra; Grupo B constituido por las poblaciones de Huelva, Robledillo de Trujillo, Albuquerque, La Nava de la Concepción, Azuaga y El Cubo de la Tierra del Vino. El Grupo C lo forman Hornachos y Ponferrada, y finalmente el Grupo D está compuesto por Monesterio.

Las cantidades más elevadas de compuestos (37.80 mg/g PS) secretados por los individuos de las poblaciones que constituyen este estudio corresponden a las que pertenecen al Grupo C (Tabla 33), éste mismo grupo también presenta la mayor cantidad de flavonoides (36.07 mg/g PS) pero combinada con una cantidad intermedia de diterpenos. El Grupo A también presenta altas cantidades de flavonoides (35.51 mg/g PS) pero combinada con bajas cantidades de diterpenos. El Grupo B muestra cantidades intermedias de flavonoides (24.28 mg/g PS) y bajas cantidades de diterpenos (1.40 mg/g PS). El Grupo D es el que presenta la menor cantidad de flavonoides (19.34 mg/g PS) combinada con la mayor cantidad de diterpenos (2.74 mg/g PS).

Analizando el CV de cada grupo obtenido mediante el dendrograma (Tabla 34), podemos resaltar que los Grupos A y C son los que mayor y menor CV presentan en relación a los grupos de compuestos estudiados. Entre los flavonoides el Grupo C es el que mayor CV presenta (44.06%), destacando la Ap (66.36%), y entre los diterpenos en el Grupo A (36.70%), destacando el Dt-2 (39.02%). El menor CV para flavonoides se da en el Grupo A (19.46%), distinguiéndose la Ap-7 (12.48%) y para diterpenos en el Grupo C (10.45%), destacando igualmente el Dt-2 (9.56%).

Si se observan las cantidades medias de cada compuesto secretado por grupos de poblaciones (Figura 30) según el Análisis Clúster realizado, se puede destacar que las poblaciones que pertenecen al Grupo A (Hervás, Destriana, Ricobayo y Cazalla

de la Sierra) son las que secretan una mayor cantidad de K-3,7 (28.58 mg/g PS), compuesto mayoritario entre los flavonoides; el resto de flavonoides y diterpenos son secretados en cantidades bajas. Las poblaciones que pertenecen al grupo B (Huelva, Robledillo de Trujillo, Albuquerque, La Nava de la Concepción, Azuaga y El Cubo de la Tierra del Vino), presentan cantidades medias de K-3,7 (17.01 mg/g PS) y cantidades bajas de los tres diterpenos. Los individuos de las poblaciones de Hornachos y Ponferrada, pertenecientes al grupo C, presentan elevadas cantidades de K-3,7 (24.86 mg/g PS), cantidades medias de Dt-1 (1.55 mg/g PS) y las mayores cantidades de K-3 (5.69 mg/g PS) y Ap-7 (3.56 mg/g PS) secretadas. Finalmente los individuos del grupo D, la población de Monesterio, presentan las menores cantidades de K-3,7 (13.76 mg/g PS), K-3 (1.34 mg/g PS) y Ap-7 (2.33 mg/g PS) y las mayores cantidades de Dt-1 y Dt-2 (2.51 y 0.14 mg/g PS respectivamente).

Las diferencias en la secreción de cada uno de los compuestos entre grupos (Figura 31) es significativa para los siguientes compuestos: K-3 se secreta en mayores cantidades en el grupo C; K-3,7 se secreta en mayores cantidades significativas en el grupo A y menores cantidades significativas en los grupos B y D; el grupo C presenta cantidades intermedias sin diferenciarse significativamente de ninguno de los grupos. Ap, Ap-4 y Ap-7 se distribuyen homogéneamente entre grupos. Si tenemos en cuenta los diterpenos, Dt-2 y Dt-3 se cuantifica en cantidades similares en todos los grupos y Dt-1 se secreta en cantidades significativamente mayores en el grupo D. En resumen, el K-3, K-3,7 y Dt-1 son los compuestos que más varían entre grupos.

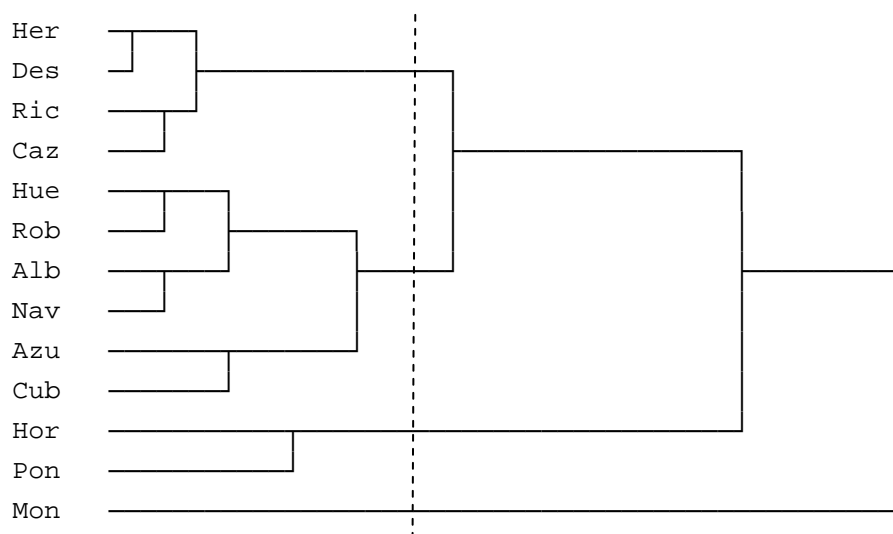


Figura 29. Dendrograma UPGMA de similaridad química en los compuestos del metabolismo secundario de *C. ladanifer* entre las poblaciones muestreadas. - - - : corte elegido para diferenciar grupos.

Tabla 33. Cantidad (mg/g PS) de compuestos totales, flavonoides totales y diterpenos totales analizadas en hojas jóvenes en las diferentes poblaciones según los grupos establecidos en el dendrograma.

	Grupo			
	A	B	C	D
Compuestos totales	36.97 (7.38) ^a	25.68 (5.42) ^a	37.80 (15.71) ^a	22.08 (8.00) ^a
Flavonoides totales	35.51 (6.91) ^a	24.28 (5.49) ^{ab}	36.07 (15.89) ^{ab}	19.34 (7.44) ^b
Diterpenos totales	1.46 (0.53) ^a	1.40 (0.30) ^a	1.74 (0.18) ^{ab}	2.74 (0.68) ^b

a,b: diferentes letras significan diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$, Test U Mann-Whitney)

Tabla 34. Coeficiente de variación (%) de compuestos totales, flavonoides totales y diterpenos totales según los grupos de poblaciones establecidos en el dendrograma.

	Grupo			
	A	B	C	D
Ap	42.22	35.20	66.36	47.19
Ap-4	16.36	18.13	39.18	19.17
Ap-7	12.48	25.85	54.12	32.32
K-3	27.17	32.19	46.88	49.70
K-3,7	21.03	23.04	42.10	41.10
Flavonoides totales	19.46	22.61	44.06	38.48
Dt-1	38.50	22.55	13.60	23.15
Dt-2	39.02	24.05	9.56	44.90
Dt-3	31.59	24.90	34.16	46.25
Diterpenos totales	36.70	21.33	10.45	24.74
Compuestos totales	19.97	21.12	41.56	36.24

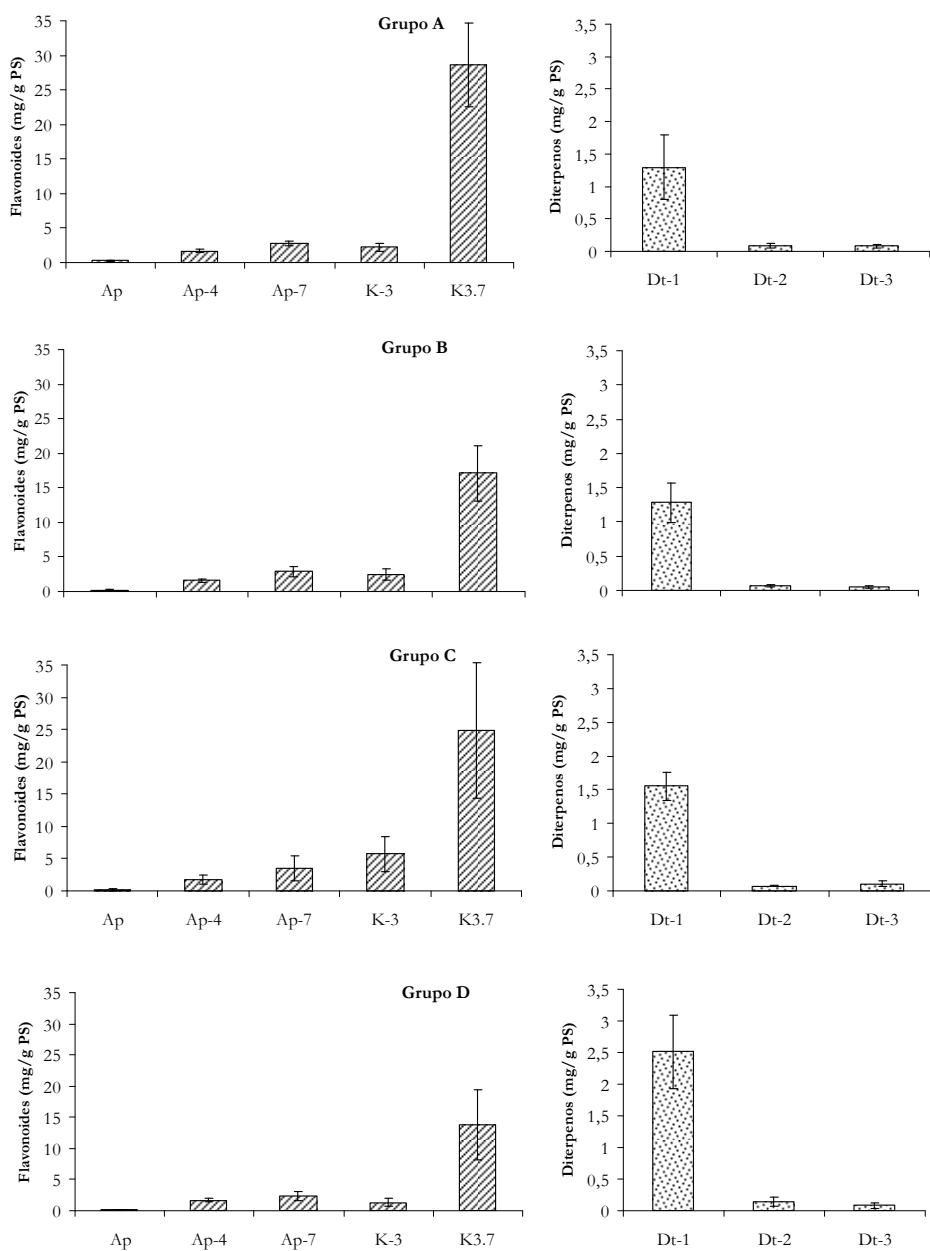


Figura 30. Cantidades de flavonoides y diterpenos (mg/g PS) según los diferentes grupos establecidos en el dendrograma. Ap: apigenina; Ap-4: 4'-O-metilapigenina; Ap-7: 7-O-metilapigenina; K-3: 3-O-metilkamferol; K-3,7: 3,7-di-O-metilkamferol; Dt-1: Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3: Ácido oxocátivico.

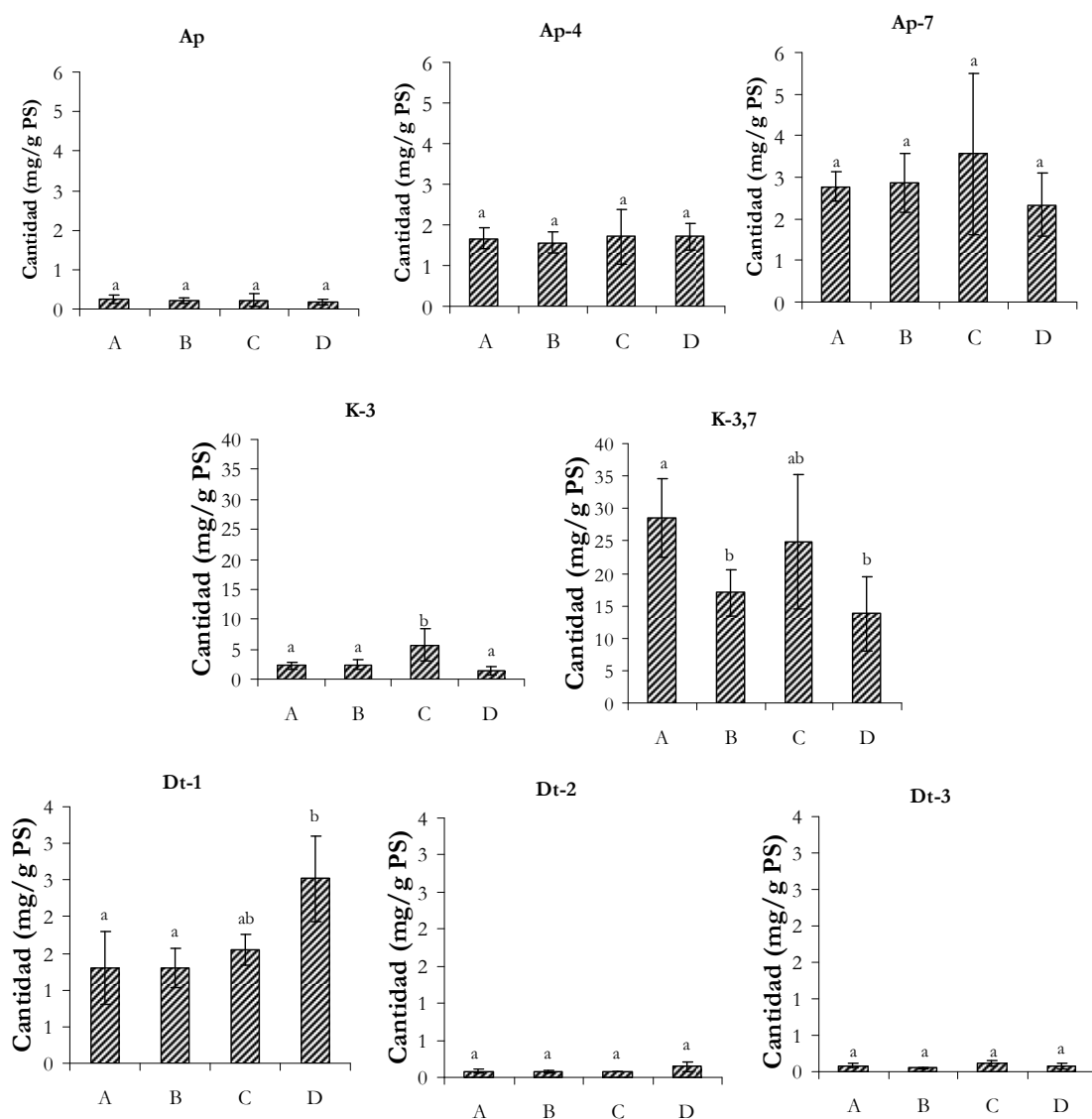


Figura 31. Cantidades de flavonoides y diterpenos (mg/g PS) según los diferentes grupos establecidos en el dendrograma. Ap: apigenina; Ap-4: 4'-O-metilapigenina; Ap-7: 7-O-metilapigenina; K-3: 3-O-metilkamferol; K-3,7: 3,7-di-O-metilkamferol; Dt-1: Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-2: Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; Dt-3: Ácido oxocativico. A: grupo A; B: grupo B; C: grupo C y D: grupo D. ^{a,b}: diferentes letras significan diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$, Test U Mann-Whitney). Los diferentes grupos de compuestos tienen diferente escala de ejes de ordenadas.

IV.7.2. Relación de la síntesis de los compuestos del metabolismo secundario con las variables ambientales

Para determinar la relación existente entre las distintas variables ambientales y las cantidades secretadas de flavonoides y diterpenos en las poblaciones muestreadas se realizó un Análisis de Correlación. Este análisis se realizó con las cantidades medias de flavonoides y diterpenos según los grupos obtenidos en el dendrograma (Figura 29) y los valores medios de temperaturas y precipitaciones por grupos. Los resultados (Tabla 35) sugieren que la cantidad media de flavonoides está relacionada de forma positiva con las temperaturas máximas ($R= 0.140$) y de forma negativa con las temperaturas mínimas ($R=-0,850$) y precipitaciones ($R=-0,615$; $p \leq 0.05$). Es decir, las poblaciones que presentan mayores temperaturas máximas muestran mayor síntesis de flavonoides y por el contrario, las poblaciones que presentan mayores temperaturas mínimas muestran menor síntesis. Respecto a los diterpenos, destacar que están relacionados negativamente con las temperaturas máximas ($R=-0,527$; $p \leq 0.05$) y de forma positiva con las temperaturas mínimas ($R=0.149$) y precipitaciones ($R=0.979$; $p \leq 0.05$). Así, las poblaciones con mayores temperaturas máximas presentan menor síntesis de diterpenos y por el contrario, las poblaciones con mayores temperaturas mínimas y precipitaciones muestran una mayor síntesis de los mismos.

La altura del relieve modifica sustancialmente el clima, un aumento de la altitud implica un descenso progresivo de las temperaturas y un aumento progresivo de la radiación ultravioleta y las precipitaciones. Por todo ello, para esta variable se realizó una regresión lineal teniendo en cuenta los datos de cada población. Los resultados reflejaron que la altitud estaba relacionada de forma positiva con la cantidad media de flavonoides ($R= 0.154$; $p \leq 0.05$) y con la cantidad media de diterpenos ($R=0.172$).

Tabla 35. Coeficientes de correlación de Pearson (R) obtenido entre la cantidad media de flavonoides y diterpenos (mg/g PS) y las temperaturas (°C) y precipitaciones (mm) medias obtenidas por grupos, según el dendrograma.

	T_{máx}	T_{mín}	T_{med}	P
Flavonoides	0.140	-0,850	-0,509	-0,615
Diterpenos	-0,527	0,668	0,149	0,979

T_{máx}: temperatura máxima (°C); T_{mín}: temperatura mínima (°C); T_{med}: temperatura media (°C); P: precipitaciones (mm).

IV.7.3. Estimación de la variabilidad intra e interpoblacional

El Análisis de las Componentes de la Varianza (ver Materiales y Métodos apartado III.5.3) nos muestra la variabilidad en la secreción de los compuestos del metabolismo secundario en *C. ladanifer* interpoblacional [Var (pob)] e intrapoblacional [Var (error)] como se puede apreciar en la Tabla 36.

Si analizamos cada compuesto secretado en estas poblaciones por separado, se puede destacar que Ap, Ap-7, K-3, K-3,7 y Dt-1 presentan una mayor componente interpoblacional que intrapoblacional, es decir, la variabilidad de estos compuestos es mayor entre las poblaciones muestreadas que dentro de cada población. Sin embargo, la variabilidad encontrada en las cantidades de Ap-4, Dt-2 y Dt-3 es mayor dentro de una población (intrapoblacional) que entre poblaciones (interpoblacional).

Considerando los grupos de compuestos, tanto flavonoides totales como diterpenos totales presentan una mayor componente interpoblacional, es decir, en general, los flavonoides y diterpenos presentan una mayor variación entre las distintas poblaciones muestreadas que dentro de una misma población.

Tabla 36. Estimación de las componentes de la varianza intra [Var (error)] e interpoblacional [Var (pob)] entre las diferentes poblaciones muestreadas en octubre de 2009.

	Componente	
	Var(pob)	Var(error)
Ap	$6 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$
Ap4	0.08	0.08
Ap7	0.59	0.45
K-3	2.43	1.24
K-3,7	53.28	23.38
Total Flavonoides	79.30	37.90
Dt-1	0.19	0.17
Dt-2	$6 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$
Dt-3	0.61	0.95
Total Diterpenos	0.21	0.20
Compuestos totales	78.81	40.01

Datos obtenidos a partir del Modelo lineal general en $\mu\text{g/g PS}$

Los resultados mostrados anteriormente corresponden al muestreo realizado de hojas jóvenes de las poblaciones en Octubre de 2009. Para confirmar las variaciones en la secreción de los compuestos del metabolismo secundario de *C. ladanifer* en estas poblaciones se optó por repetir el muestreo en abril de 2010 eligiendo en este caso hojas maduras, teniendo en cuenta así los resultados obtenidos en el estudio de variabilidad realizado anteriormente (apartado IV.5).

Los resultados obtenidos en este segundo muestreo corroboran lo ya mencionado anteriormente: existen diferencias en cuanto a la secreción de los compuestos del metabolismo secundario de *C. ladanifer* en las distintas localidades (Anexo II). Las mayores cantidades significativas de flavonoides se muestrean en Destriana (26.14 mg/g PS) y Hervás (27.78 mg/g PS) y menores en Cazalla (7.67 mg/g PS) y Hornachos (8.68 mg/g PS). Las mayores cantidades significativas de diterpenos han sido secretadas en Ricobayo (5.72 mg/g PS) y Monesterio (4.90 mg/g PS) y las menores en Hornachos (1.08 mg/g PS) y Cazalla (1.34 mg/g PS). Al igual que en el muestreo de Octubre, Huelva es la población que presenta mayor CV para flavonoides (58.25%) y Robledillo para diterpenos (43.71%). La Nava (8.68 %) y Hervás (6.16%) son las poblaciones con menores CV para flavonoides y diterpenos respectivamente. Hervás y Destriana son las poblaciones que presentan mayores diferencias significativas en cuanto a cantidad de flavonoides totales y Ricobayo y Monesterio en los diterpenos.

En la Tabla 37 se muestran las componentes de la varianza intra e interpoblacional del muestreo realizado en Abril de 2010. Como puede apreciarse, y al igual que en el muestreo de Octubre de 2009, la componente interpoblacional es mayor que la intrapoblacional en la mayoría de los compuestos analizados. De esta manera, flavonoides y diterpenos presentan una mayor variación entre las distintas poblaciones que dentro de una misma población.

Tabla 37. Estimación de las componentes de la varianza intra [Var (error)] e interpoblacional [Var(pob)] entre las diferentes poblaciones muestreadas en abril de 2010.

	Componente	
	Var(pob)	Var(error)
Ap	0,02	0,01
Ap4	0,18	0,26
Ap7	0,27	0,25
K-3	0,06	0,44
K-3,7	32,25	31,11
Total Flavonoides	48,24	37,79
Dt-1	1,25	1,10
Dt-2	3*10 ⁻³	2*10 ⁻³
Dt-3	0,05	0,01
Total Diterpenos	1,69	1,22
Compuestos totales	59,58	45,76

Datos obtenidos a partir del Modelo lineal general en $\mu\text{g/g PS}$

IV.8. RESPUESTA DEL GENOTIPO DE *Cistus ladanifer* A DIFERENTES AMBIENTES

En nuestro estudio con clones, en la Tabla 38 se muestra la cantidad media de compuestos totales, flavonoides y diterpenos secretados como media de los tres genotipos analizados. Algo importante a destacar es que aparecen mayores cantidades de diterpenos que de flavonoides en todos los experimentos. Como puede apreciarse, en los tres genotipos analizados, la síntesis de los compuestos del metabolismo secundario es plástica: flavonoides y diterpenos (y compuestos totales) aumentan significativamente con la radiación ultravioleta y disminuyen de forma significativa con el potencial hídrico y la suma de potencial hídrico y radiación ultravioleta, mostrándose plasticidad en la síntesis de estos compuestos en condiciones ambientales diferentes.

IV.8.1. Estudio de las normas de reacción en *C. ladanifer*

Como ya ha comentado en Materiales y Métodos, la manifestación de la plasticidad se suele expresar por medio de gráficos conocidos como “normas de reacción” en los que se representa en el eje de abscisas los distintos valores ambientales y en el de ordenadas los fenotípicos.

En las figuras 32, 33 y 34 se muestran las normas de reacción para las cantidades totales de compuestos, flavonoides totales y diterpenos totales de cada genotipo analizado según los distintos estreses ambientales: radiación ultravioleta, potencial hídrico elevado ($\psi = 0.80$ MPa), potencial hídrico muy elevado ($\psi = 1.5$ MPa), combinación de radiación ultravioleta y potencial hídrico elevado y combinación de radiación ultravioleta y potencial hídrico muy elevado.

En relación a la radiación ultravioleta (Figura 32), podemos decir que flavonoides y diterpenos aumentan su síntesis con la radiación ultravioleta siendo significativa para el genotipo 2 (0.09 mg/g PS) en flavonoides y para el genotipo 1 y 2 en diterpenos (0,50 y 0,53 mg/g PS, respectivamente). Si se tiene en cuenta la

totalidad de compuestos, este tipo de estrés también aumenta la síntesis en los tres genotipos originando mayores cantidades significativas respecto al control (0.59, 0.61 y 0.49 mg/g PS, respectivamente).

Cuando se simula un elevado potencial hídrico ($\psi = 0.80$ MPa) (Figura 33) se observa una disminución significativa de las cantidades de compuestos totales secretadas en los tres genotipos (0.22, 0.28 y 0.23 mg/g PS). Si se simula un potencial hídrico muy elevado ($\psi = 1.5$ MPa), los genotipos 1 y 2 disminuyen aún más las cantidades de compuestos totales secretados (0.18 y 0.14 mg/g PS), mientras que el genotipo 3 presenta un comportamiento diferente, aumentando significativamente la síntesis. Esta misma pauta se observa cuando analizamos los diterpenos por separado; el estrés hídrico elevado (0.80 MPa) origina una disminución significativa de la secreción en los diferentes genotipos (0.16, 0.21 y 0.20 mg/g PS) y cuando se potencia este potencial (1.50 MPa) disminuyen significativamente más las cantidades en dos de los genotipos (0.15 y 0.12 mg/g PS). Si se analiza la cantidad de flavonoides totales en los tres genotipos, para un potencial de 0.80 MPa los genotipos 1 y 3 secretan una cantidad significativamente menor (0.032 y 0.028 mg/g PS), sin embargo, si aumenta el potencial hídrico se dan mayores reducciones en la síntesis de flavonoides totales para los tres genotipos analizados, aunque sólo son significativamente menores en el genotipo 1 y 2 (0.028 y 0.019 mg/g PS respectivamente).

Respecto a la combinación de radiación ultravioleta y potencial hídrico elevado o muy elevado (Figura 34), se observa una disminución significativa de compuestos totales, flavonoides y diterpenos en los diferentes genotipos, siendo mayor la diferencia cuando el potencial aplicado es muy elevado. Únicamente encontramos un comportamiento diferente en la cantidad de flavonoides de los genotipos 2 y 3 sometidos a radiación ultravioleta y potencial hídrico muy elevado, observándose un aumento respecto a las cantidades encontradas en la combinación de radiación ultravioleta y potencial hídrico elevado.

En resumen, podemos destacar que la radiación ultravioleta potencia la síntesis de los diferentes compuestos estudiados, y sin embargo, el potencial hídrico y la combinación de potencial hídrico con radiación ultravioleta la inhiben, de manera

que esta disminución es tanto mayor cuanto mayor es el potencial hídrico aplicado, no siendo esta diferencia entre potenciales significativa.

En general, los genotipos estudiados poseen normas de reacción inclinadas y paralelas, esto nos indicaría que los genotipos reaccionan de forma similar ante el estrés ambiental (aunque no cuantitativamente) y la existencia de plasticidad en la síntesis de metabolitos secundarios (los genotipos son similarmente plásticos). Destacar que no existiría interacción de los genotipos estudiados respecto al ambiente, ya que todos reaccionan de forma paralela ante el mismo estrés ambiental.

Así, respecto a la radiación ultravioleta, los genotipos responden mediante normas de reacción con pendiente positiva (aumentando la síntesis) sin embargo en relación al potencial hídrico y a la suma de potencial hídrico y radiación ultravioleta, la pendiente es negativa (disminuye la síntesis). De esta manera, se pone de manifiesto la importancia del efecto del ambiente en el fenotipo, en nuestro caso, la síntesis de los compuestos del metabolismo secundario y la plasticidad existente en estos genotipos, al reaccionar de forma distinta ante distintas condiciones ambientales.

Cuando se analiza cómo varían las cantidades secretadas de compuestos totales, y flavonoides y diterpenos totales entre los diferentes genotipos ante los diferentes estreses (Figura 35) se observa que, en general, los genotipos no difieren en la secreción de compuestos. Sólo es significativa la secreción de los compuestos totales y diterpenos totales en el genotipo 3, frente a la radiación ultravioleta y el potencial hídrico muy elevado (1.5 MPa); y en los flavonoides totales en el genotipo 1, en el ambiente control.

Tabla 38. Cantidades medias del total de compuestos, de flavonoides y diterpenos (mg/g PS) obtenidas como media de los tres genotipos analizados. Desviación típica entre paréntesis (n=3x10).

	Control	UV	ψ 0.80 Mpa	ψ 1.5 Mpa	UV + ψ 0.80 Mpa	UV + ψ 1.5 Mpa
Compuestos totales	0.42 (0.03)	0.57* (0.02)	0.25* (0.04)	0.22* (0.05)	0.20* (0.04)	0.16* (0.05)
Flavonoides	0.06 (0.01)	0.09* (0.01)	0.04* (0.01)	0.03* (0.01)	0.03* (0.01)	0.02* (0.01)
Diterpenos	0.36 (0.02)	0.48 (0.02)	0.20* (0.02)	0.18* (0.02)	0.16* (0.02)	0.14* (0.02)

*: diferencias significativas respecto al control

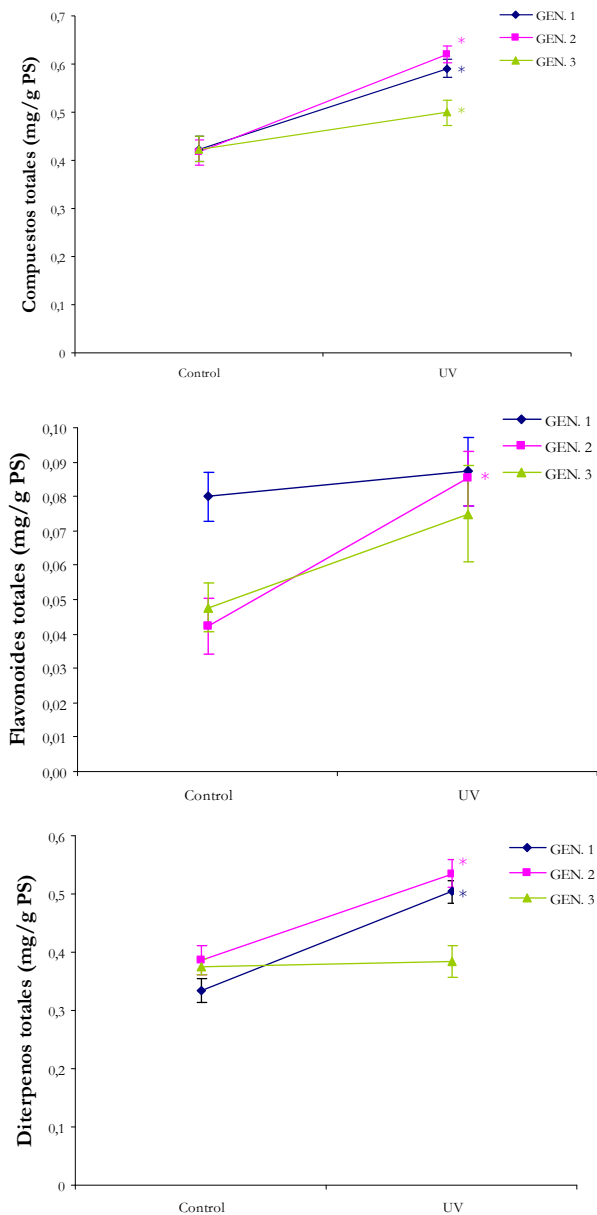


Figura 32. Normas de reacción de la cantidad total de compuestos, flavonoides totales y diterpenos totales (mg/g PS) secretadas por los diferentes genotipos frente a la radiación UV. GEN: genotipo. * : diferencias significativas respecto al control ($p \leq 0.05$, Test U-Mann Whitney).

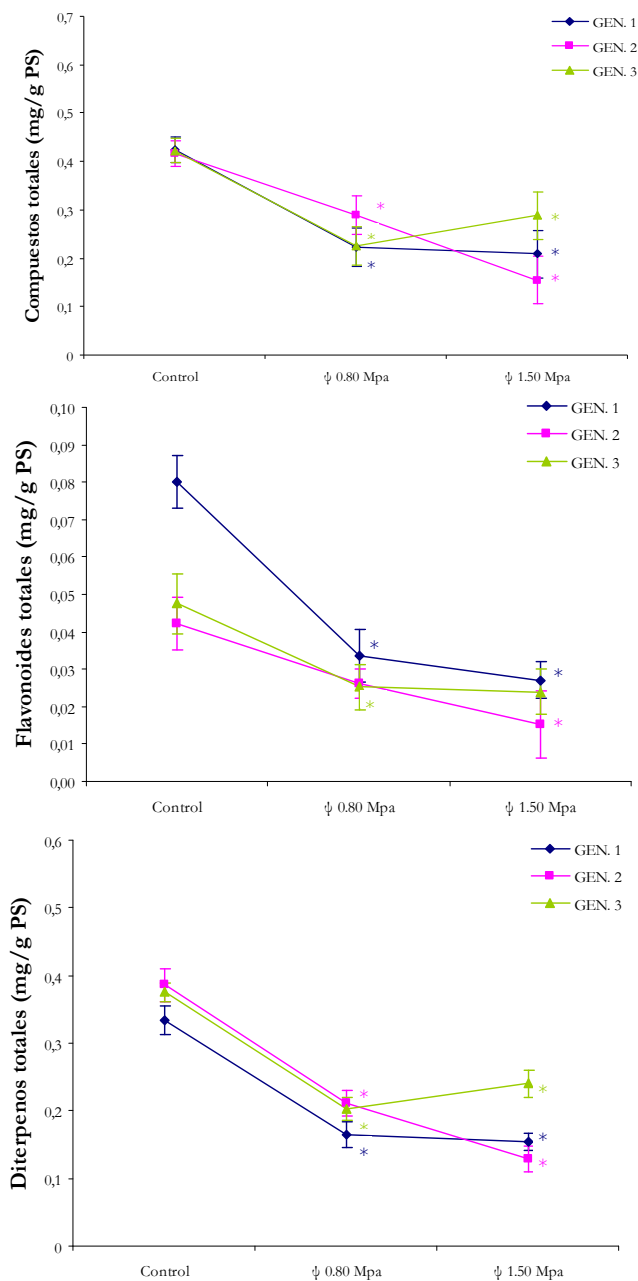


Figura 33. Normas de reacción de la cantidad total de compuestos, flavonoides totales y diterpenos totales (mg/g PS) secretadas por los diferentes genotipos frente al estrés hídrico (ψ). GEN: genotipo. * : diferencias significativas respecto al control ($p \leq 0.05$, Test U-Mann Whitney).

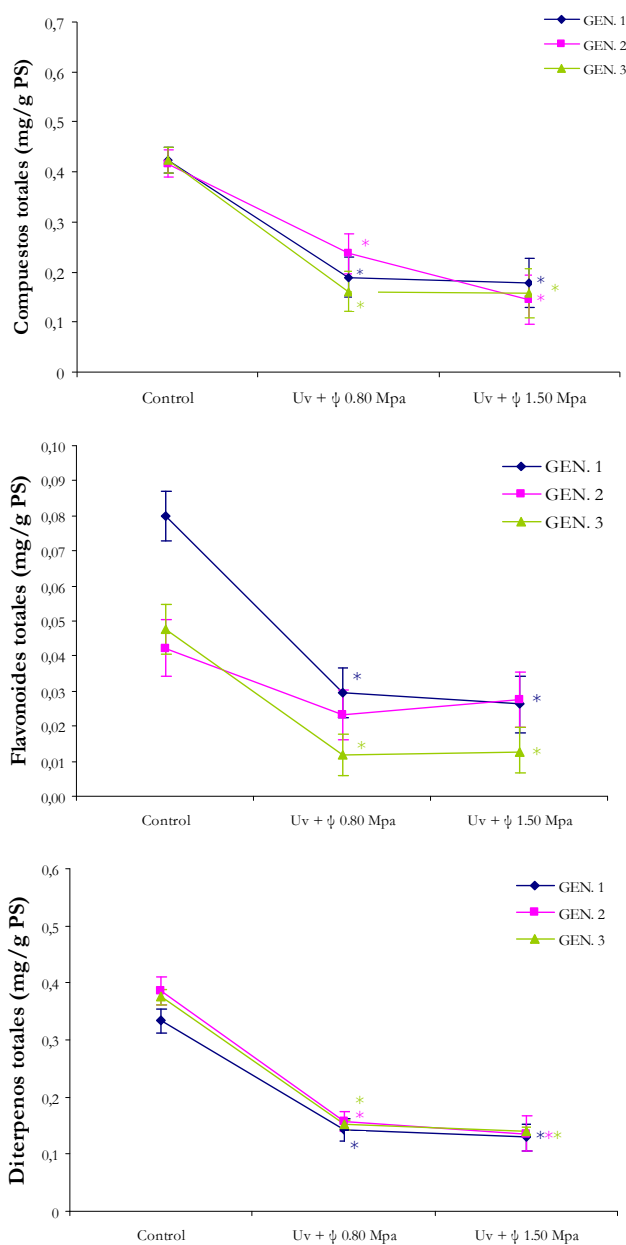


Figura 34. Norma de reacción de la cantidad total de compuestos, flavonoides totales y diterpenos totales (mg/g PS) secretadas por los diferentes genotipos frente a la radiación UV y estrés hídrico (ψ). GEN: genotipo. * : diferencias significativas respecto al control ($p \leq 0.05$, Test U-Mann Whitney).

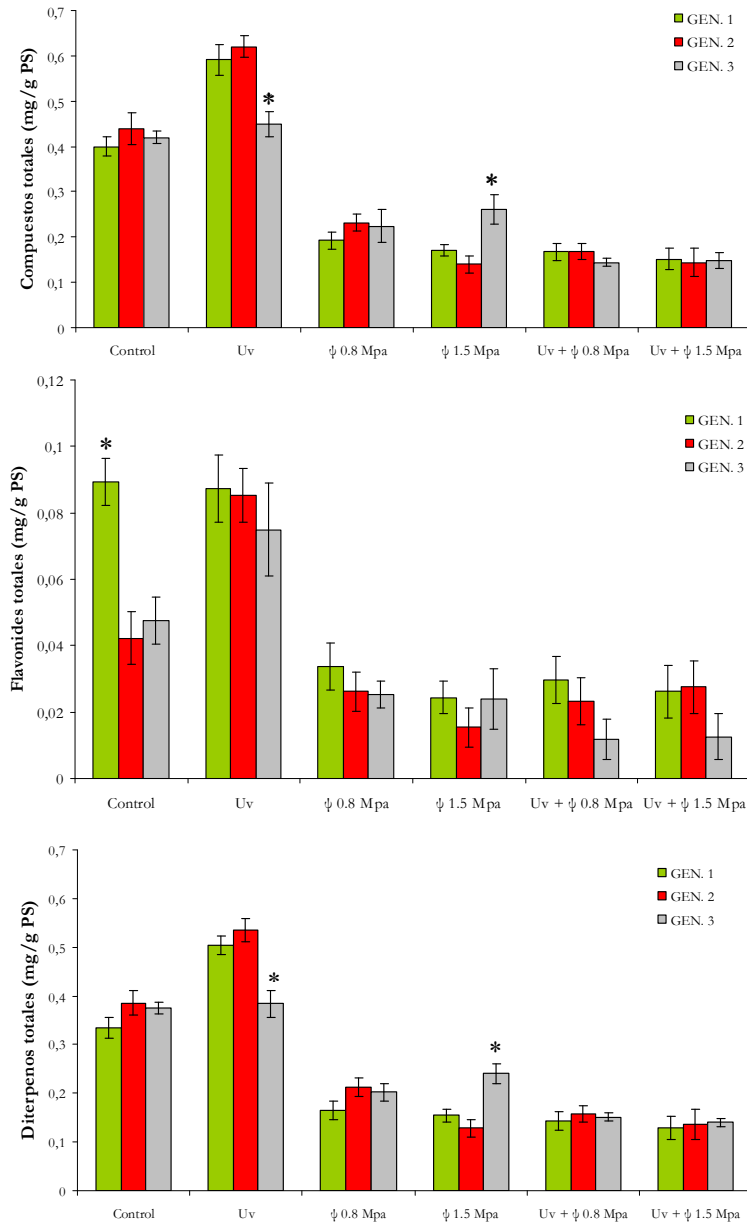


Figura 35. Variación de las cantidades totales, flavonoides totales y diterpenos totales (mg/g PS) secretadas por los diferentes genotipos según el tratamiento. Uv: radiación ultravioleta; ψ= potencial hídrico; GEN: genotipo. *: diferencias significativas entre genotipos ($p \leq 0.05$, Test U-Mann Whitney).

IV.8.2. Estimación de la heredabilidad en *C. ladanifer*

A partir del Análisis de los Componentes de la Varianza (ver apartado III.5.3.2 Materiales y Métodos), se ha determinado la heredabilidad (H^2) en la secreción de compuestos del metabolismo secundario en *C. ladanifer* (Tabla 39). De esta manera, se estimó el grado de determinación genética en relación a la síntesis de compuestos del metabolismo secundario, es decir, se pudo estimar la proporción de la variación fenotípica (fenotipo) que es explicada por la variación genética (genotipo) en los genotipos analizados de esta especie.

Como se puede observar en la Tabla 39, se obtuvieron valores bajos de heredabilidad (H^2) respecto a los distintos estreses a los que se sometieron los clones. Esto significa que el porcentaje de la variación fenotípica debido a la variabilidad genotípica es bajo. Según los datos, el mayor valor de heredabilidad es de 0.23, es decir, un 23% de la variación fenotípica es debida a la variación genotípica. El resto se deben a factores no genotípicos.

Si analizamos las estimaciones de la heredabilidad en el total de compuestos del metabolismo secundario, los mayores valores aparecen cuando los clones están sometidos a un potencial hídrico de 0.80 MPa, y a la combinación de radiación ultravioleta y ambos potenciales hídricos, en cuyo caso el valor es de 0.01 (1 %). En el resto de las condiciones la heredabilidad estimada es 0, en cuyo caso, la varianza fenotípica se debe enteramente a la variaciones no genotípicas (variación ambiental y muestral).

Atendiendo al total de flavonoides, los mayores valores de heredabilidad se dan con un potencial hídrico de 1.5 MPa (23%) seguido de la combinación de radiación ultravioleta y potencial hídrico de 0.80 MPa (21%). Heredabilidades más bajas se estiman cuando se combina radiación ultravioleta y potencial hídrico de 1.5 MPa, radiación ultravioleta y potencial hídrico de 0.80 MPa cuyos valores son respectivamente de 3, 7 y 12%.

En relación a los diterpenos, los mayores valores de heredabilidad se estiman al combinar radiación ultravioleta y potencial hídrico (8% y 6% para el potencial de

1,5 y 0.8 MPa respectivamente), bajo un potencial de 0.80 MPa se da una heredabilidad de 0.05 (un 5%) y sin embargo, bajo radiación ultravioleta y potencial hídrico de 1.5 MPa este valor es 0.

Destacar que los mayores valores de heredabilidad se han estimado en flavonoides totales bajo condiciones de ambos potenciales hídricos, en estos casos, un 23 y 21 % de la variabilidad del fenotipo es explicada por el genotipo. En todas las condiciones a las que se han sometido los clones de *C. ladanifer* el valor de heredabilidad es mayor en flavonoides que en diterpenos, siendo en alguno de los casos muy superior (por ejemplo cuando se combina radiación ultravioleta y potencial hídrico de 0.80 MPa, cuyos valores son 21% y 6% respectivamente). La excepción es la combinación de radiación ultravioleta y potencial hídrico de 1.5 MPa, en el cual el valor de heredabilidad entre flavonoides y diterpenos es similar, 3% y 8% respectivamente.

Tabla 39. Estimación de la heredabilidad (H^2) en la síntesis de metabolitos secundarios de distintos genotipos de *C. ladanifer* sometidos a diferentes estreses ambientales.

Estrés		H^2
	Total	0.00
Radiación Uv	Flavonoides	0.07
	Diterpenos	0.00
	Total	0.01
ψ 0.80 Mpa	Flavonoides	0.12
	Diterpenos	0.05
	Total	0.00
ψ 1.5 Mpa	Flavonoides	0.23
	Diterpenos	0.00
	Total	0.01
Uv + ψ 0.80 Mpa	Flavonoides	0.21
	Diterpenos	0.06
	Total	0.01
Uv + ψ =1,5 Mpa	Flavonoides	0.03
	Diterpenos	0.08

$$H^2 = S^2_{\text{genotipo}} / (S^2_{\text{genotipo}} + S^2_{\text{genotipo} \times \text{estrés}} + S^2_{\text{error}}).$$

DISCUSIÓN

Los compuestos derivados del metabolismo secundario tienen una amplia distribución en las plantas (Rhodes, 1994). A lo largo de la evolución, los diferentes grupos de compuestos y sus enzimas biosintéticas han aparecido en diferentes momentos (Stafford, 1991; Koes y col., 1994) y por ello, la composición en las plantas varía intra e interespecíficamente (Harborne y Turner, 1984). Estos compuestos desempeñan una gran variedad de funciones ecológicas. La mayoría cumplen funciones de defensa contra depredadores y patógenos: inhiben el desarrollo de insectos (Stamp y col., 1997; Zhang y col., 1999), nemátodos (Blum, 1996; Bryant y col., 1991), hongos (Oliva y col., 1999) y bacterias (Grayer y Harborne, 1994), mejorando el crecimiento de la planta (Lattanzio y col., 1994). También incluyen compuestos venenosos, reductores de la digestibilidad de la planta y la palatabilidad a los herbívoros (Lindroth y Batzli, 1984; Baas, 1989; Sosa y col., 2004). Otra función importante es la de favorecer la atracción de polinizadores (Chou y Kou, 1986; Harborne, 1988; Baas, 1989, Bergstrom, 1978; Beker y col., 1989), dispersores de semillas (Swain, 1973; Levin, 1976; Cronquist, 1977) y actuar como agentes alelopáticos. Además, en diversos estudios se ha confirmado su función protectora frente a las radiaciones UV (Zobel y Lynch, 1997), pudiendo incrementar ésta la concentración de metabolitos, tanto en las células como en la superficie de la planta (Zobel y col., 1999). Otra función es la de reducir el efecto pernicioso de los metales pesados en el desarrollo de las plantas (Delgado, 2008). Además, tienen un papel importante en la descomposición de la hoja (Grime y col., 1996), actividad microbiológica del suelo (Vokou y Margaris, 1984) y en la adaptación climática (Seufert y col., 1995).

Todos estos estudios apoyan la idea de que una elevada variación química en una especie puede jugar un papel muy importante en la adaptación de la planta a diferentes factores bióticos y abióticos (Van der Meijden, 1996; Laitinen y col., 2000). La complejidad en la química de la planta dentro de una población podría proporcionar protección contra diferentes factores de estrés. Así, a mayor variación, mayor es la posibilidad que la especie sea resistente. Por lo tanto, cuantificar la variabilidad fenotípica en la presencia de metabolitos secundarios de una especie,

podría aportarnos información de su capacidad de respuesta a cambios ambientales. Para ello, hay que tener en cuenta que las concentraciones de metabolitos secundarios en una especie pueden variar en diferentes partes de la planta (Palo y col., 1985; Tahvanainen y col., 1991), con la ontogenia (Reichardt y col., 1984; Bryant y Julkunen-Tiitto, 1995; Julkunen-Tiitto y col., 1996; Hartley y Jones, 1997), y también puede depender de diversos factores ecológicos como cambios estacionales de luz, temperatura (Chaves y Escudero, 1999), humedad, nivel de nutrientes y presión osmótica (Waterman y Mole, 1989; Waterman, 1992; Dixon y Paiva, 1995).

En *C. ladanifer*, numerosos trabajos han demostrado las diversas funciones ecológicas de los diferentes metabolitos secundarios de esta especie. Estos compuestos actúan como filtro de luz ultravioleta (Chaves y Escudero, 1999), como agentes tóxicos para la protección contra herbívoros (Sosa y col., 2004) y finalmente como agentes alelopáticos inhibidores de la germinación y desarrollo de las plántulas herbáceas que compiten con ella por el mismo espacio, lo que ofrece claras ventajas al facilitar la colonización para esta especie (Chaves, 1994; Chaves y Escudero, 1997; Chaves y col., 2001 a y b).

Los resultados obtenidos en este nuevo trabajo amplían el conocimiento sobre el metabolismo secundario de *C. ladanifer*, mostrando en primer lugar, que existen diferencias cuantitativas significativas de estos compuestos en los diferentes órganos estudiados. Las hojas jóvenes secretan mayor cantidad de flavonoides y diterpenos que los tallos, y éstos a su vez, más que las hojas maduras. Los fenoles (flavonoides) son los compuestos más abundantes, y dentro de ellos el K-3,7, encontrándose diferencias significativas entre hojas jóvenes, maduras y tallos. Si analizamos la contribución porcentual de cada uno de estos compuestos en flavonoides, ésta es parecida en hojas jóvenes y maduras, diferenciándose claramente la composición que muestran los tallos. Con respecto a los diterpenos, la contribución porcentual en cada órgano difiere considerablemente entre ellos.

Características de la planta como el contenido de agua, proteínas y metabolitos secundarios, generalmente cambian durante la estación de crecimiento y estado de desarrollo de un órgano (Krischik y Denno, 1983). La existencia de una mayor cantidad de compuestos en hojas jóvenes que en hojas maduras se explicaría

debido a que en las primeras fases de crecimiento se secreta mayor cantidad de estos compuestos unido a que la relación secreción/degradación va disminuyendo a medida que la edad de la hoja aumenta. Por ejemplo, algunos microbios pueden degradar estos compuestos (Tiarks y col., 1989; Gamble y col., 1996) o producir compuestos intermedios (Hopper y Mahadevan, 1991) a medida que pasa el tiempo tras la secreción. En estudios realizados por otros autores en especies como *Empetrum hermaphroditum* y *Betula pendula* se observa un gran decrecimiento en el contenido de metabolitos secundarios durante la senescencia de la hoja (Nilson y col., 1998; Gallet y col., 1999; Laitinen y col., 2005). En *Empetrum hermaphroditum* sólo el 33% de la suma de fenoles en hojas jóvenes está presente en hojas maduras, y la proporción de compuestos de un estado de desarrollo a otro varía dependiendo del compuesto. Este hecho está también comprobado en *Quercus robur* donde estudios realizados por Covelo y Gallardo (2004) demuestran que las concentraciones de fenoles de hojas jóvenes a maduras decrecía en un 37%. En *C. ladanifer*, la reducción en la presencia de flavonoides desde hojas jóvenes a maduras es aproximadamente de un 40%, valores muy parecidos a los encontrados en otras especies. Aunque se den estas reducciones de compuestos de hojas jóvenes a maduras, hay que destacar la presencia de este tipo de compuestos en las hojas maduras y su implicación en el reciclado de nutrientes en ecosistemas terrestres, debido a la influencia que tienen estos compuestos en la tasa de descomposición de la hojarasca y la forma en que el nitrógeno es liberado al suelo.

Por otra parte, nuestros resultados muestran una clara variación estacional de los compuestos del metabolismo secundario en *C. ladanifer*. Estos datos corroboran los ya constatados en estudios anteriores, donde se demostró la existencia de variaciones cuantitativas dependientes de la estación, estando la síntesis inducida por factores externos, especialmente durante la estación estival (Chaves, 1994). La inducción de la síntesis de los flavonoides depende de la luz ultravioleta y del contenido de agua en las hojas, siendo la suma de estos dos factores especialmente relevantes en su producción total (Chaves, 1994; Chaves y col., 1997). Otros estudios demostraron que la síntesis de determinados compuestos como el K-3,7 es estimulada por las altas temperaturas. Estrés hídrico, altas temperaturas y alta radiación ultravioleta son condiciones que se producen en verano, estación en la cual

la secreción de flavonoides es potenciada. Por otro lado, en estudios de *C. ladanifer* realizados por Alías (2006), se ha comprobado que la cantidad de diterpenos en el exudado de la hoja es inducida por las bajas temperaturas y que la síntesis de los mismos aumenta en invierno. En el presente estudio se ha reflejado el mismo comportamiento, reafirmando la importancia de los factores meteorológicos en la síntesis de terpenos y fenoles. Estudios realizados por otros autores apoyan esta hipótesis, donde se ha demostrado que factores externos, tales como las precipitaciones (Mole y Joern, 1993), luz (Bryant y col., 1987; Pramanik y col. 2000) y disponibilidad de agua (Gershenzon, 1984) están implicados en la síntesis de los metabolitos secundarios.

Esta variabilidad y respuesta a parámetros meteorológicos se hace más patente cuando se comparan los resultados obtenidos en los dos años de estudio. En este caso, se pone de manifiesto que la cantidad total de compuestos presentes en el exudado (flavonoides y diterpenos) de hojas y tallos es significativamente mayor en el 2006 que en el 2007. Esta diferencia cuantitativa entre años puede deberse a las características meteorológicas de cada año. El efecto de las variables meteorológicas en plantas de larga vida es generalmente difícil de detectar, no así el efecto del microclima como determinante de la producción de compuestos fenólicos. En nuestro estudio, si analizamos las precipitaciones medias estacionales (Tabla 1, Materiales y Métodos) que se registraron durante los dos años del estudio, podemos destacar que durante la primavera del primer año se registraron menores precipitaciones (132.0 mm) que durante la primavera del segundo año (221.9 mm). La diferencia encontrada de metabolitos secundarios entre 2006 y 2007 viene determinada, principalmente, por la cantidad que se ha cuantificado en la estación de primavera (13.48 mg/g PS en 2006 frente a 7.97 mg/g PS en 2007), pudiendo ser responsable de estas diferencias las precipitaciones recibidas. Por lo tanto, es importante destacar que las diferencias meteorológicas interanuales podrían ser determinantes en la secreción de estos compuestos. Nilsson y col., en 1998 demostraron que en *Empetrum hermaphroditum* los niveles de fenoles producidos y especialmente la actividad fitotóxica del extracto difiere significativamente entre años, al igual que en estudios realizados con hojas de *Betula pendula* (Laitinen y col., 2000). Hay que resaltar que hay autores que defienden que la variabilidad interanual en la

síntesis de compuestos derivados del metabolismo secundario probablemente puede ser atribuible a un conjunto de factores, tanto internos como externos y que la adaptación y la resistencia de un individuo respecto a otros individuos de la misma población es dependiente de condiciones específicas y de un año en particular (Laitinen y col., 2000).

En el presente trabajo se pone de manifiesto que existen diferencias significativas estacionales en la secreción de estos compuestos tanto en hojas jóvenes, como maduras y tallos. Además también existen diferencias entre ellos dentro de una misma estación. Así, en la estación de verano aparecen diferencias significativas entre las tres partes de la planta estudiadas, y en el resto de estaciones, claramente entre hojas jóvenes y maduras.

Si los niveles de metabolitos secundarios varían de forma estacional, el nivel de resistencia de una planta puede cambiar estacionalmente (Pilson, 1992). Por tanto, la variación estacional registrada en este estudio y en otros estudios parecidos podría tener consecuencias ecológicas para un individuo y en última instancia para la especie. La mayoría de las especies vegetales tienen compuestos pertenecientes a diferentes familias químicas como forma de defensa. Los compuestos fenólicos y terpénicos han sido considerados como productos de defensa contra herbívoros y sus concentraciones pueden responder a la selección natural. El comportamiento del herbívoro influye en la evolución de la planta y por tanto en la evolución de los metabolitos secundarios. En estudios realizados por Riipi y col. (2004) se comprobó cómo el estado de la resistencia de un árbol varía a lo largo de la estación en relación al contenido de metabolitos secundarios. Se evidenció que había un cambio en la aparición de compuestos desde hojas jóvenes a hojas maduras y que a partir de una edad se estabilizaban los compuestos. Así, por ejemplo, si una planta es atacada por un herbívoro puede pasar de ser “resistente” a “susceptible”, lo que quiere decir que las plantas “resistentes” sufrirán menos daños que las plantas “susceptibles”. Esto permitiría un cambio evolutivo en la población como respuesta a la presión del herbívoro. Por lo tanto, el estado de resistencia de una planta no es constante en el tiempo y por ello es importante estudiar la dinámica temporal de estos compuestos y

las implicaciones en la evolución que producen las variaciones estacionales de los mismos (Riipi y col., 2004).

Es importante destacar que estudios realizados por Lattanzio y col. (2000) encontraron una correlación positiva entre el contenido de flavonoides glicósidos y la resistencia a ciertos herbívoros. Los perfiles metabólicos pueden predecir los niveles de resistencia de la planta hacia los herbívoros (Brennan y col., 1992; Brignolas y col., 1998; Smith, 2005), o dicho de otra forma, si la resistencia o capacidad de respuesta a factores ambientales de una especie está determinada por la composición de aleloquímicos, el análisis de los mismos podría servirnos para caracterizar la especie (Ranger, 2007).

Otro aspecto es la dependencia de los factores climáticos en la síntesis de estos compuestos. En la mayoría de los ecosistemas existen grandes diferencias en las variables meteorológicas a lo largo del año e interanualmente. Esto es muy importante al afectar a la variabilidad temporal en la producción de metabolitos secundarios. Dicha variación temporal, como se ha comentado, podría afectar a las interacciones bióticas en las que las plantas están involucradas (por ejemplo, interacción con herbívoros), pero también podría afectar al comportamiento ecofisiológico, variando éste dependiendo de las características meteorológicas del hábitat donde se encuentre. Esto significa que si una especie tolera un amplio margen en los valores de temperatura y precipitación, como es el caso de *C. ladanifer* (Cabezas y Escudero, 1989), su comportamiento ecofisiológico puede diferir bastante de un lugar a otro con condiciones meteorológicas diferentes.

Otro factor importante a tener en cuenta para la cuantificación del metabolismo secundario en una especie es la edad de los individuos. Durante el crecimiento de la planta y la ontogenia, los metabolitos secundarios pueden cambiar considerablemente, tanto cualitativa como cuantitativamente. En general, estados más juveniles expresan más defensas que edades más maduras (Bryant y Julkunen-Tiitto, 1995), lo cual les puede permitir soportar mejor diferentes tipos de estrés. En este estudio los resultados han puesto de manifiesto que en *C. ladanifer* la variación de los metabolitos secundarios es dependiente de la edad: los individuos más jóvenes (de menos de un año de edad) segregan significativamente menos cantidad total de

compuestos que el resto de individuos con edades mayores. Además, la secreción de compuestos a partir de 1 a 6 años se mantiene más o menos constante hasta una edad más avanzada (a partir de 20 años) donde la secreción es menor aunque no es significativa. Este comportamiento anteriormente descrito se mantiene para flavonoides, sin embargo, los diterpenos se secretan en cantidades prácticamente iguales en todas las edades. Resultados diferentes obtuvieron Laitinen y col. (2005) en estudios con *Betula pendula* en las que las concentraciones de terpenos eran más elevadas en edades de 1 año respecto a edades más avanzadas.

Es importante destacar que cuando cuantificamos la cantidad de metabolitos secundarios en una planta, estamos cuantificando un carácter fenotípico. Los niveles de compuestos del metabolismo secundario están en parte controlados genéticamente y en parte determinados por las condiciones ambientales (Jones y Hartley, 1999). La variabilidad genética y fenotípica de una especie es un indicador de la plasticidad ecológica y capacidad de respuesta de la misma a los cambios ambientales y juega un importante papel en el comportamiento de las plantas ante condiciones desfavorables o adversas. La variación fenotípica, cuantificada mediante la variación en la producción de compuestos derivados del metabolismo secundario, es muy importante en la ecología y evolución de las plantas, contribuyendo a la capacidad de una especie para sobrevivir en condiciones ambientales heterogéneas y representando una oportunidad para que las especies aumenten su rango de distribución (Cariveau y col., 2004; Cahill y col., 2005; Moore y Foley, 2005).

Como se ha comentado con anterioridad, es importante cuantificar la variabilidad fenotípica del metabolismo secundario en las plantas. Pero resolver esta cuestión plantea ciertas complicaciones en el diseño experimental, debido a la variabilidad en la secreción de los aleloquímicos descrita anteriormente. Por ello, previamente es necesario cuantificar las variaciones dentro de un propio individuo, que pueden ser debidas a diferencias entre órganos y estados de desarrollo de los mismos, entre estaciones y entre edad de los individuos. Igualmente es importante determinar la variabilidad de cada uno de los parámetros responsables de esta variación; o lo que es lo mismo: ¿En qué órgano o estado de desarrollo, estación o edad se produce más variabilidad en la síntesis de estos compuestos? Atendiendo a

nuestros resultados y analizando la variabilidad desde un punto de vista general (Tabla 40) a más específico (Tabla 41) puede apreciarse que dentro de los compuestos del metabolismo secundario dominantes en *C. ladanifer*, los coeficientes de variación son mayores en diterpenos (91.9%) que en flavonoides (64.9%) (Tabla 40). Destacar que la variabilidad en la cuantificación de flavonoides y el total de compuestos (suma de flavonoides y diterpenos) es semejante (64.9% y 61.2%, respectivamente). Este comportamiento se mantiene cuando analizamos los valores desglosados obtenidos en las diferentes partes de la planta y en las distintas estaciones, de ahí que a partir de ahora nos referiremos a datos obtenidos de compuestos totales.

Tabla 40. Coeficiente de variación (%) de hojas jóvenes, maduras, tallos y la planta en su conjunto de forma anual.

	Total	Flavonoides	Diterpenos
Hojas jóvenes	55.5	64.2	56.4
Hojas maduras	55.7	53.3	54.1
Tallos	59.5	51.2	98.1
Planta	61.2	64.9	91.9

En las diferentes partes de la planta estudiadas (Tabla 40), los coeficientes de variación son elevados (mayor de 50%); la menor variabilidad se encuentra en hojas y la mayor en tallos, aunque estas cantidades no difieren considerablemente entre ellos. Estudios realizados por Covelo y Gallardo (2004) obtienen resultados diferentes, existiendo una mayor diferencia en los CV entre hojas maduras (38.1%) y hojas jóvenes (27.2%). Si cuantificamos la variabilidad diferenciando entre estaciones (Tabla 41) y no consideramos las diferentes partes de la planta, la estación que

presenta una menor variabilidad es el otoño (40.4%), seguido del invierno (45.1%) y primavera (48.2%) y finalmente el verano (54.7%).

Si observamos los coeficientes de variación obtenidos con los datos cuantificados en los diferentes órganos y estado de desarrollo de los mismos por estación (Tabla 41), en hojas jóvenes los coeficientes de variación son similares en verano (29.5%), otoño (28.3%) e invierno (29.2%) y mayores en primavera (37.3%). Con respecto a las hojas maduras los coeficientes de variación en verano (26.1%), otoño (27.5%) y primavera (27.2%) son semejantes, aumentando en invierno (34.1%). Finalmente en tallos los coeficientes de variación en otoño (41.2%) e invierno (43.8%) son parecidos frente a los cuantificados en primavera (48.5%) y verano (50.3%).

Al realizar el análisis a diferentes edades de las jaras seleccionadas, los individuos con edades inferiores a 1 año presentan variabilidades muy superiores respecto a otras edades. La menor variabilidad se obtiene en edades de 7 a 12 años (9.04%).

Los resultados anteriores ponen de manifiesto que previamente a realizar un estudio para determinar la variabilidad fenotípica intrapoblacional mediante la cuantificación del metabolismo secundario en una población, es necesario responder a cuestiones como: ¿Existen variaciones de los metabolitos secundarios dentro de un mismo individuo, dependiendo del órgano y estado de desarrollo del mismo? ¿Estas variaciones son dependientes de las condiciones estacionales? ¿La variabilidad es la misma para todos los órganos, edades y estaciones? Por una parte, se ha podido establecer qué órgano, edad y estación deberíamos elegir para determinar las diferencias individuales en la secreción de los metabolitos secundarios en *C. ladanifer*. Según nuestro criterio, debería elegirse el parámetro que menor variabilidad presente, o lo que es lo mismo aquel con un coeficiente de variación menor, ya que si encontráramos variación entre los individuos, podríamos determinar con mayor certeza que la variabilidad cuantificada deriva de la diferencia intrapoblacional. Por lo tanto, en nuestro caso elegiríamos individuos con una edad comprendida entre 7 a 12 años. El órgano sería la hoja con un estado de desarrollo que variaría en función de la estación elegida para la toma de las muestras. De tal forma que se podría elegir hojas

jóvenes en verano-otoño-invierno, o bien hojas maduras en verano, otoño o primavera. Por todo ello, este estudio previo nos permite conocer la metodología más apropiada para cuantificar la variabilidad y/o plasticidad en el metabolismo secundario de *C. ladanifer*, para posteriormente estudiar el significado de dicha plasticidad en la supervivencia exitosa de un individuo, una población, o una especie.

Las plantas como organismos sésiles en un mundo cambiante, deberían siempre obtener ventajas funcionales de una plasticidad fenotípica elevada. Son muchos los estudios que han identificado situaciones en las que la selección natural ha maximizado la plasticidad fenotípica (Valladares, 2006).

Los niveles de compuestos del metabolismo secundario en la planta pueden ser modificados por variables genéticas o ambientales (Berenbaum y Zangerl, 1992; Herms y Mattson, 1992). Por ejemplo, las variaciones estacionales de diferentes metabolitos encontradas en varios estudios reflejan las distintas demandas fisiológicas asociadas con el crecimiento, la defensa, y la reproducción (Crawley, 1983; Coleman, 1986; Herms y Mattson, 1992; Simms, 1992; Zangerl y Bazzaz, 1992; Wilkens y col., 1996). Al mismo tiempo, una diversidad de factores ambientales tales como agua, luz, o deficiencia de nutrientes, temperaturas extremas, la contaminación, o la presencia o ausencia de organismos patógenos contribuyen a la variación espacial de los compuestos del metabolismo secundario dentro y entre poblaciones (Mihaliak y Lincoln, 1989; Muzika y col., 1989; Waterman y Mole, 1989, Coleman y Jones, 1991; Dudt y Shure, 1994; Wilkens y col., 1996). El patrón espacial y la magnitud de la concentración de metabolitos secundarios en las poblaciones naturales son prácticamente desconocidos, a pesar de existen múltiples evidencias que los recursos que influyen en la cantidad de compuestos fenólicos de las hojas (como la disponibilidad de luz o nutrientes) muestran variabilidad espacial en la escala de metros a decenas de metros.

Tabla 41 . Coeficiente de variación (%) de hojas jóvenes, maduras y tallos y la planta en su conjunto por estación.

	Verano			Otoño			Invierno			Primavera		
	Tot.	Flav.	Dit.	Tot.	Flav.	Dit.	Tot.	Flav.	Dit.	Tot.	Flav.	Dit.
Hojas jóvenes	29.5	29.1	29.2	28.3	34.2	52.6	29.2	31.1	42.3	37.3	39.2	40.7
Hojas maduras	26.1	27.2	32	27.5	27.3	38.4	34.1	35.5	75.2	27.2	26.6	66.1
Tallos	50.3	51.3	50.1	41.2	42.6	59.4	43.8	42.2	69.4	48.5	53.1	52.3
Planta	54.7	55.1	56.5	40.4	38.4	108.1	45.1	42.4	94.3	48.2	49.7	62.8

Tot.: suma total de flavonoides y diterpenos

Flav.: total flavonoides

Dit.: total diterpenos

En nuestro estudio, una vez conocido el tipo de muestra a elegir y cuándo es mejor realizar el muestreo, para conocer el aporte genético y la plasticidad en el metabolismo secundario de *C. ladanifer* frente a los factores ambientales, se ha trabajado a dos niveles: a nivel de población (variabilidad intrapoblacional) y a nivel interpoblacional (variabilidad interpoblacional).

Los resultados obtenidos a nivel intrapoblacional han puesto de manifiesto que existe una clara variación cuantitativa y no cualitativa entre los individuos que constituyen la población. Todos los individuos sintetizan los mismos compuestos pero no en las mismas cantidades; y son mayores las cantidades de flavonoides que de diterpenos. Esta continuidad del fenotipo puede resultar de dos fenómenos: la expresión fenotípica de cada genotipo, que no es única sino una norma de reacción que cubre una amplia gama fenotípica, y/o puede haber segregado alelos en muchos *loci* distintos que contribuyan a las diferencias en el fenotipo observado, si la síntesis es poligénica (Griffiths y col., 2008).

Según el Análisis Clúster realizado, los individuos analizados se pueden reagrupar en 4 grupos principales, que se diferencian en las cantidades secretadas de cada uno de los compuestos. A pesar de que esta agrupación es un método artificial, constituye una herramienta útil para obtener una visión global de la variación de estos compuestos dentro de una población. Los resultados muestran que existe una gran variabilidad espacial en la secreción de metabolitos secundarios en hojas de *C. ladanifer*. El 66% de los individuos (Grupo A) se distribuye aleatoriamente y presenta bajas cantidades de todos y cada uno de los compuestos estudiados, un 16 % (Grupos B y C) de los individuos se distribuye también al azar y presenta las mayores cantidades de flavonoides y un 18% (Grupo D) se distribuye formando pequeños grupos y presenta las mayores cantidades de diterpenos. Vourc'h y col. (2002) explicaron la variación de las defensas de las plantas dentro de una población como consecuencia de la interacción de la variabilidad ambiental de los recursos vegetales, las diferencias genotípicas entre los individuos, y los efectos de los herbívoros y patógenos. Esta variabilidad intrapoblacional muestra la capacidad de la población para adaptarse a variaciones bióticas y abióticas del medio. Cabe destacar también el hecho de que la mayoría de los individuos de la población presente una baja

concentración de metabolitos secundarios, esto puede suponer un ahorro energético para la especie sin perder variabilidad o capacidad de respuesta frente a factores ambientales.

Debido a que la interacción entre las especies tiene lugar en el espacio, el patrón espacial de los compuestos del metabolismo secundario puede influir en cualquier proceso biológico, afectando en su concentración. La estructura espacial de los metabolitos secundarios de las hojas puede ser relevante para la interacción planta-herbívoro, y puede crear patrones espaciales de ataque de los herbívoros sobre las plantas (Karban y col., 1997; Dolch y Tschardtke, 2000). Según lo sugerido por Karban y col. (1997), las respuestas inducidas hacia la herbivoría aumentan la variabilidad temporal y espacial de los metabolitos secundarios de las plantas. La probabilidad de que un individuo sea atacado puede ser mayor si los vecinos cercanos han sido atacados. Este mecanismo podría crear dependencia espacial. Por otra parte, Dolch y Tschardtke (2000) observaron un decrecimiento en la palatabilidad de la hoja de individuos inducida por la defoliación de los vecinos de las inmediaciones. Destacar que la variación espacial de la concentración de fenoles en hojas es importante porque puede ralentizar la adaptación del herbívoro hacia los compuestos de defensa de las plantas (Shelton, 2000; Karban y col., 1997).

Esta variabilidad en la secreción de los compuestos del metabolismo secundario en el espacio puede ser debida también a diferencias genotípicas entre los individuos y a la variabilidad de los recursos ambientales, como se ha comentado anteriormente. La luz podría ser el factor más importante para explicar el contenido de metabolitos secundarios, y su disponibilidad es especialmente importante para la vegetación. La disponibilidad de la luz muestra una autocorrelación espacial en los diversos ecosistemas y puede inducir a un patrón espacial de la concentración de compuestos fenólicos de la hoja (Becker y Smith, 1990; Nicotra y col., 1999). La disponibilidad de nutrientes, especialmente nitrógeno, también puede influir en la concentración de polifenoles (Koricheva y col., 1998; Haukioja y col., 1998; Keinänen y col., 1999). Estudios de Covelo y Gallardo en 2004 mostraron una correlación positiva entre la radiación total transmitida y la disponibilidad de nutrientes del suelo respecto al contenido de fenoles en hojas de *Quercus robur*.

Los factores espaciales pueden ser críticos para cada uno de estos procesos, y aunque hay una fuerte evidencia de la importancia de la distribución espacial de las diferentes especies de plantas (Baraza y col., 2006), patrones espaciales complejos también influyen en la variación intraespecífica y pueden tener una influencia similar (Klinkhamer y col., 2001). Por lo tanto, los factores que originan una estructura espacial en los fenotipos de las plantas deben ser considerados como moderadores de los procesos ecológicos y evolutivos en los que están implicadas las plantas. Esta fuerte variación intraespecífica en la concentración de compuestos de defensa se produce en muchas especies de plantas y es a menudo hereditaria (Carroll y col., 2000, Orians y col., 2003).

Las características genéticas de cada individuo así como las variables del medio en que se desarrollan son determinantes para la planta, de tal manera que la variabilidad intrapoblacional refleja mayoritariamente la influencia del genotipo, mientras que la interpoblacional manifiesta la importancia del medio. Por ello, es importante también estudiar cómo varían los compuestos del metabolismo secundario entre poblaciones de *C. ladanifer* en diferentes condiciones ambientales (variabilidad interpoblacional).

Existen estudios realizados con otras especies (Wolfson, 1982; Woodhead, 1981; Waterman y col., 1985; Wilkens y col., 1996) que han demostrado que las características bioquímicas y físicas de las plantas varían como resultado de cambios fenológicos y en respuesta a estreses ambientales como temperatura, valores de humedad extremos, disponibilidad de nutrientes minerales, agua, altitud, latitud, contaminación, daños mecánicos, o interacciones con otros organismos (Gershenzon, 1984; Waterman y Mole, 1989). Así, las diferencias encontradas en la cantidad secretada de compuestos del metabolismo secundario en las poblaciones muestreadas pueden servirnos para reconocer los mecanismos que influyen en la secreción de estos compuestos de *C. ladanifer* en el rango de distribución.

Los resultados obtenidos muestran en primer lugar, que existe una elevada variación interpoblacional en los compuestos del metabolismo secundario en *C. ladanifer*, es decir, las cantidades de flavonoides y diterpenos totales varían en las distintas poblaciones. Esta variación está comprendida entre 18.74 mg/g PS

(Alburquerque) y 47.30 mg/g PS (Ponferrada) para flavonoides y entre 0.84 mg/g PS (Ricobayo) y 2.74 mg/g PS (Monesterio) para diterpenos. Las poblaciones que secretan mayor cantidad significativa de compuestos totales son Ponferrada y Hervás (48.91 y 47.96 mg/g PS, respectivamente) mientras que las que secretan menores cantidades son Huelva y Alburquerque (21.23 y 20.32 mg/g PS, respectivamente). Las localidades con los mayores y menores CV (variabilidad) difieren dependiendo de los grupos de compuestos estudiados. Para flavonoides el mayor CV aparece en Huelva (51.54%) y el menor en Destriana (2.28%), y en diterpenos esta distribución es distinta: mayor CV para Alburquerque (50.57%) y menor para Ricobayo (16.03%).

Estos resultados corroboran el efecto del ambiente en la síntesis de los distintos compuestos. Además, las cantidades medias de flavonoides cuantificadas presentan una relación lineal positiva con las temperaturas máximas ($r=0.140$) y negativa con las temperaturas mínimas ($r=-0.850$) y precipitación ($r=-0.615$). Los diterpenos, si embargo presentan una relación negativa con las temperaturas máximas ($r=-0.527$), y positiva con las temperaturas mínimas ($r=0.668$) y precipitación ($r=0.979$). Estos resultados coinciden con resultados obtenidos en estudios anteriores en *C. ladanifer* (Chaves, 1997; Sosa, 1994; Alías, 2006) y apoyan la idea de que la secreción de flavonoides es potenciada a altas temperaturas y la de diterpenos a bajas.

En nuestro estudio, la altitud influye significativamente de forma positiva en la secreción de flavonoides ($r=0.154$; $p \leq 0.05$). Las localidades con mayor altitud secretan mayor cantidad de flavonoides que las de menor altitud. Por ejemplo, en Destriana, a 902 m, la cantidad media secretada de flavonoides fue de 32.71 mg/g PS y sin embargo en Alburquerque, a 289m, se secretó una cantidad media de 18.74 mg/g PS. Resultados parecidos obtuvieron Zidorn y col. (2005) en estudios con *Hieracium pilosilla* en donde las cantidades de flavonoides variaban desde 54 mg/g PS a los 230 m hasta 67 mg/g PS a los 840 m. Nikolova e Ivancheva (2005) y Alonso-Amelot y col. (2006) demostraron la relación dependiente de la altitud con la concentración de flavonoides en *Veronica chamaedrys* L. y *Pteridium arachnoideum*. La radiación ultravioleta varía con la altura debido a la disminución de la masa atmosférica. El crecimiento de las plantas a elevadas altitudes hace que la planta se exponga a elevadas concentraciones de radiación ultravioleta, de un 8 a un 10% más

cada 1000 m de altura, y de esta manera la síntesis y almacén de los fenoles como compuestos de defensa en la planta, aumentaría (Körner, 1999). Esto concuerda con anteriores estudios en *C. ladanifer* donde se ha demostrado que la radiación ultravioleta induce la síntesis de flavonoides en las hojas (Chaves, 1994). También existen trabajos con otras especies que corroboran esta relación (Lois, 1994; Cuadra y col., 1997).

Para los diterpenos se observa también que la síntesis de estos compuestos presenta una correlación positiva con la altura, aunque no es significativa. Teniendo en cuenta que a mayor altitud menor temperatura (6,5 °C menos cada 1000 m), estos resultados concordarían con los obtenidos en anteriores estudios de *C. ladanifer* en los cuales se demostró que la secreción de diterpenos está potenciada por las bajas temperaturas (Alías, 2006).

En relación al análisis de las Componentes de la Varianza realizado, nuestros resultados ponen de manifiesto que los compuestos totales en *C. ladanifer* tienen una componente interpoblacional mayor que la intrapoblacional, es decir, existe mayor variabilidad en la síntesis de metabolitos secundarios entre poblaciones que dentro de una misma población. Estos resultados se obtienen en los muestreos realizados tanto en Octubre como en Abril. Esta diferencia sugiere que además de variabilidad genética existiría otro aporte de variabilidad que sería debido a la plasticidad fenotípica y/o a la interacción genotipo-ambiente.

En todo caso, se observa una elevada variación inter e intrapoblacional en la secreción de los compuestos del metabolismo secundario, lo que podría dar información de la capacidad adaptativa de *C. ladanifer* a ajustarse a diferentes ambientes. Los fenoles y terpenos se sintetizan en las plantas no sólo por determinación genética, sino también por la influencia de estreses medioambientales, demanda fisiológica y necesidades defensivas controladas evolutivamente (Bryant y col., 1991; Woodhead, 1981; Waterman y Mole, 1989; Lovelock y col., 1992). Si consideramos que *C. ladanifer* presenta un amplio rango de distribución, podemos apuntar que su éxito colonizador puede ser debido, por un lado, a que existen ecotipos localmente adaptados, lo que supone que cada población de la especie, una vez establecida, experimenta cambios diferenciales en sus frecuencias alélicas como

resultado de las presiones de selección locales. De este modo, la diferenciación en ecotipos especializados se acomodaría a las diferencias ambientales entre hábitats, y el rango de distribución de la especie surgiría del agregado total de estas poblaciones localmente adaptadas (Dudley y Schmitt, 1996). Por otro lado, podría ocurrir que los individuos conservan el potencial de responder plásticamente a una amplia gama de cambios ambientales. Así, el rango de distribución de la especie surgiría de la amplitud de la tolerancia ambiental (plasticidad fenotípica) de sus individuos (Novak y col., 1991; Sultan y Bazzaz, 1993). Se considera que esta alternativa entra en juego cuando existe poca variabilidad genética en las poblaciones (Williams y col., 1995). En general, estas evaluaciones sobre el mecanismo del rango de distribución de una especie han sido realizadas a lo largo de gradientes ecológicos, tanto latitudinales (Li y col., 1998; Weber y Schmid, 1998) como altitudinales (Galen y col., 1991; Williams y col., 1995). La evidencia acumulada hasta ahora no apoya la hipótesis de una relación necesariamente inversa entre plasticidad fenotípica y diferenciación ecotípica.

En nuestro estudio, para profundizar e intentar conocer el mecanismo que ha llevado a *Cistus* a estar ampliamente distribuida, se sometieron clones de diferentes genotipos a distintas condiciones ambientales, con el objetivo de conocer la plasticidad de los genotipos ante condiciones ambientales diferentes. Las experiencias realizadas con clones apoyan la hipótesis de que *C. ladanifer* presenta una respuesta plástica en la síntesis de los compuestos del metabolismo secundario ante estreses ambientales. Los resultados reafirman que la radiación ultravioleta potencia la síntesis de flavonoides y diterpenos y que en esta síntesis existen variaciones, cuantitativas y no cualitativas de estos compuestos. Este aumento en la concentración de flavonoides en las hojas en respuesta a la radiación UV también ha sido encontrado en algunas especies herbáceas (Lott, 1960; Koeppe y col., 1969; Li y col., 1993; Sheahan, 1996). En ensayos con *Betula pendula* (Lavola, 1997) se obtuvo que la secreción de los flavonoides identificados estaba también estimulada por la radiación UV, dando lugar a variaciones cuantitativas y no cualitativas. Sin embargo, en estudios con *Salix* (Tegelberg y col., 2003), la radiación ultravioleta potenciaba una síntesis elevada de fenoles en hojas, los cuales eran muy diferentes cualitativamente. Por otro lado, en trabajos con coníferas y especies de árboles de hoja caduca, Sullivan y col. (1996) no encontraron un cambio en la concentración de estos compuestos en

respuesta a la radiación UV, con dosis similares o incluso más elevadas a las realizadas en nuestro estudio. Todo esto sugiere que estas diferencias cualitativas entre especies (árboles y arbustos) acentúan las diferencias que existen entre especies en relación a la capacidad y disparidad en respuesta a la radiación UV. De cualquier manera, la radiación UV modifica la expresión de los metabolitos secundarios constitutivos e inducibles en las hojas, al igual que todos los mecanismos de resistencia. Así, la modificación en la secreción de estos compuestos dependerá de la plasticidad fenotípica en la secreción de los metabolitos secundarios, originados por las condiciones de crecimiento. En nuestro caso, los clones de los diferentes genotipos tienen una respuesta plástica similar ante la exposición de radiación ultravioleta: aumentan la síntesis de los compuestos de defensa ante la exposición a radiación ultravioleta, aunque difiere cuantitativamente entre genotipos.

Por otro lado, los resultados obtenidos muestran que las cantidades secretadas tanto de flavonoides como de diterpenos disminuyen significativamente cuando se somete los clones a estrés hídrico, siendo esta disminución tanto mayor cuanto más elevado sea el potencial hídrico aplicado. Así, la disminución de flavonoides y diterpenos respecto al control ante un potencial hídrico elevado (0.80 MPa) fue de un 32 y 29% respectivamente. Mayores reducciones en la secreción de estos compuestos encontramos cuando se le aplicaba un potencial hídrico más elevado (1.5 MPa): 48% para flavonoides y 50% para los diterpenos. Resultados similares obtuvieron Upadhyaya y col. (2008) en estudios con clones de *Camelia sinensis* en el cual el contenido de fenoles totales en hojas decrecía cuando aumentaba el estrés hídrico, siendo este decrecimiento máximo del 37%. Esta reducción del contenido de fenoles en hojas ante un estrés hídrico puede ser debida a que el agua es la materia prima para la realización de la fotosíntesis en plantas y esto puede afectar directamente a la síntesis de compuestos orgánicos tanto para el crecimiento de la propia planta como para la defensa. De esta manera, la planta ante un estrés hídrico elevado utiliza la energía para aumentar su vigorosidad, en vez de sintetizar compuestos de defensa, pudiendo así explicar la disminución de los mismos.

Tanto la disponibilidad del agua por sí sola (Levizou y Manetas, 2001) o en combinación con la radiación ultravioleta (Kyparissis y col., 2001) puede influir en la

producción de fenoles. Así, al analizar cómo responden los diferentes genotipos combinando un medio con potencial hídrico (elevado y muy elevado) y radiación ultravioleta, destacamos que al igual que con el potencial hídrico sólo, disminuye la síntesis de los metabolitos secundarios (de forma significativa) más cuanto mayor es el potencial hídrico.

Destacar que respecto a las cantidades relativas de los diferentes compuestos analizados en los diferentes clones, se cuantificaron, contrariamente a lo observado en individuos naturales, mayores cantidades de diterpenos que de flavonoides en todos los clones (en muchos casos hasta 5 veces más). Resultados parecidos obtuvieron Laitinen y col. (2005) en estudios con clones de *Betula pendula* en donde se obtenían mayores cantidades de terpenos totales que de flavonoides agliconas (casi 25 veces más). Estas diferencias en estados juveniles podrían ser debidas a las diferentes funciones que poseen estos compuestos durante el desarrollo de la plántula. En estados jóvenes algunos flavonoides pueden tener una función más estructural (Seigler, 1998) que de defensa, sin embargo, los diterpenos tendrían un papel mayoritariamente de defensa en las plántulas (Reichardt y col. 1984), explicando que aparezcan en mayor cantidad.

Del estudio de las normas de reacción de los diferentes genotipos clonados podemos concluir que el exceso de radiación ultravioleta y la disponibilidad del agua son factores importantes que influyen en la aclimatación de las plantas como respuesta al estrés. Así, en *C. ladanifer* se potencia la síntesis de los compuestos del metabolismo secundario con la radiación ultravioleta y por el contrario, disminuye con el potencial hídrico o la combinación de potencial hídrico y radiación ultravioleta. En general, las normas de reacción inclinadas y paralelas nos podría indicar la existencia de una respuesta plástica similar entre los genotipos, una variación genética aditiva en la síntesis de estos compuestos y poca interacción entre los genotipos, ya que todos reaccionan de forma similar ante el mismo estrés ambiental.

La variación entre genotipos en la respuesta a determinados estreses ambientales (elevada concentración de radiación UV, diferentes potenciales hídricos o la combinación de ambos) puede tener consecuencias evolutivas. Si los genotipos

de las especies varían en respuesta a estos estreses ambientales, y si la respuesta es heredable, entonces la selección natural podría aumentar la frecuencia de los genotipos con mayor aptitud. Así, el rango de respuestas determina el potencial evolutivo de los diferentes genotipos.

Si se demuestra que un rasgo es parcialmente heredable en una población, es posible cuantificar su grado de heredabilidad. El grado de heredabilidad se puede definir como la proporción de varianza total que se debe a la varianza genotípica. A partir del Análisis de las Componentes de la Varianza se ha estimado la heredabilidad (H^2), en sentido amplio (Falconer, 1989), en la secreción de compuestos del metabolismo secundario en *C. ladanifer*. De esta manera, se ha podido estimar el grado de determinación genética en relación a la síntesis de compuestos del metabolismo secundario, es decir, la proporción de la variación fenotípica (fenotipo) que es explicada por la variación genética (genotipo) de los genotipos analizados en esta especie.

Los resultados muestran diferencias en la heredabilidad de los distintos compuestos frente a los diferentes estreses ambientales a los que se han sometido los clones. Los flavonoides presentan mayores valores de heredabilidad que diterpenos. Estas diferencias en la heredabilidad podría ser debida al origen y bioactividad de los compuestos (Orians y col., 1996). Los mayores valores de heredabilidad en flavonoides indicarían que existe una menor presión selectiva sobre estos compuestos frente al estrés ambiental o que son compuestos que tienen un origen evolutivo más reciente.

Según los datos, se estiman valores relativamente bajos de heredabilidad (H^2) respecto a los distintos estreses. El mayor valor de heredabilidad (para flavonoides y con estrés hídrico de 1.5 MPa) es del 23% ($H^2=0.23$), esto quiere decir que el 23% de la de la variación en la secreción de metabolitos secundarios ante un estrés hídrico es debida a diferencias genéticas entre clones, el 77% restante es atribuible a diferencias no genéticas, concretamente como indican las normas de reacción, podrían ser debidas a la plasticidad fenotípica.

Un valor de heredabilidad bajo significaría que el porcentaje de la variación fenotípica que es debido a la variabilidad genotípica es bajo. Estos valores bajos de

heredabilidad pueden deberse a que la componente de la varianza genética sea cercana a 0 (Falconer y Mackay, 1996), es decir, que la variabilidad fenotípica se debe en mayor medida a factores no genéticos. Si la heredabilidad es baja, podría indicar también que hubo una elevada presión selectiva que reduciría la varianza genética durante generaciones o una gran varianza ambiental (Merilä y Sheldon, 2000). De esta manera, cambios en las condiciones ambientales (radiación UV y disponibilidad hídrica en nuestro caso) no serán tan decisivos para la supervivencia de los genotipos de esta especie. Debido a esta baja heredabilidad se podrían originar limitaciones en la evolución respecto a la secreción de compuestos. Otros estudios han analizado el aumento de la variación genética bajo estreses ambientales (Hoffmann y Parsons, 1991; Hoffmann y Merilä, 1999) indicando que el valor de la aptitud relativa de un rasgo con bajos niveles de heredabilidad es especulativo y merece un estudio adicional.

El ajuste funcional entre organismos y el medio en el que viven es el principal motor de la biodiversidad, siendo múltiples las estrategias a través de las cuales los sistemas biológicos sacan partido a los recursos disponibles (Darwin, 1859; Ackerly, 2004). Cada una de estas estrategias es, de forma aislada, el resultado de una multitud de factores, algunos difíciles de cuantificar, cuya interacción origina la aparición de fenotipos específicos. El número de fenotipos posibles es siempre inevitablemente superior al de los observables, que se limita a la manifestación en un punto en el tiempo de una cuantía determinada de genotipos en una serie de ambientes concretos. Las relaciones de casualidad son complejas, pero es razonable suponer que la variación de fenotipos observables será mayor cuanto mayor sea el número de genotipos y ambientes (Rubio, 2006). Así, la heterogeneidad espacial y temporal, inherente al entorno del ecosistema mediterráneo, posibilitan la coexistencia en espacios relativamente reducidos de características fenotípicas múltiples (Blondel y Aronson, 1999).

Hay una serie de condicionantes que son difíciles de evitar en el estudio con clones. Por una parte, las condiciones experimentales en las que se ha llevado a cabo el estudio no fueron las naturales, por ejemplo, el crecimiento y desarrollo de los clones se realizó en las cámaras de cultivo. Además, los fenotipos expresados en esas

condiciones no responden sino a un número reducido de meses de crecimiento, y pueden no ser representativos del rango fenotípico potencial.

Otra dificultad que aparece a la hora de realizar este tipo de estudios es la adecuada representación de la variabilidad genética en los experimentos. Es inapropiado afirmar que el número y la naturaleza de los genotipos incluidos en cualquier experimento son los adecuados para explicar el comportamiento evolutivo de una población, y mucho menos de una especie. Fenómenos frecuentes como la hibridación, importante en ecología y evolución de las plantas (Hegarty y Hiscock, 2005), pueden estarse obviando inadvertidamente al escoger sólo unos propágulos de naturaleza taxonómica bien definida. En nuestro caso y debido a la poca viabilidad de las plántulas se partió de 5 genotipos y finalmente se realizaron los estudios con tres de ellos. Además, la propia forma de seleccionar genotipos en la naturaleza origina una escasa representación de la variabilidad genética de las poblaciones naturales.

En cualquier caso, estudiar cuál es y ha sido el papel de la plasticidad fenotípica en la respuesta de caracteres aparentemente estáticos a condiciones ambientales cambiantes no deja de ser un reto para entender la evolución de la vegetación mediterránea (Balaguer y col., 2001; Valladares y col., 2002).

Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente, la variación de las repuestas entre los genotipos clonados sugiere que el medio ambiente puede modificar fuertemente la secreción de los compuestos de defensa produciéndose así una respuesta plástica. De esta manera, una especie como *C. ladanifer*, que es capaz de desarrollar el fenotipo óptimo en distintos ambientes, se comportaría como una especie generalista ya que los genotipos evolucionan alterando adaptativamente la expresión de los metabolitos secundarios. Puesto que las plantas no pueden elegir sus competidores, la síntesis de este tipo de compuestos podría considerarse como una estrategia adaptativa, dotando a las especies con una mayor capacidad competitiva.

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este estudio son las siguientes:

1. Al determinar la variación cuantitativa de los metabolitos secundarios en *C. ladanifer* en hojas jóvenes, maduras y tallos los resultados ponen de manifiesto que existen diferencias cuantitativas significativas entre las tres partes de la planta. La cantidad porcentual de flavonoides es parecida en hojas jóvenes y maduras, sin embargo en tallos es diferente. En diterpenos esta contribución porcentual en cada parte de la planta estudiada difiere considerablemente entre ellos.

2. Al cuantificar la variación estacional en hojas y tallos, los resultados ponen de manifiesto que existen diferencias significativas entre éstos en una misma estación, así como variación estacional en los diferentes órganos. Las diferencias encontradas no son las mismas por estaciones, siendo el verano la estación que presenta diferencias significativas en las tres partes de la planta, destacando las hojas jóvenes con una mayor presencia de compuestos. Algo importante a resaltar es que las hojas jóvenes y maduras, cuya diferencia es el estado de desarrollo, muestran cantidades diferentes en las cuatro estaciones.

3. Las diferencias interanuales en la concentración de estos compuestos cuantificados podrían ser consecuencia de la diferencia en los factores meteorológicos de los años estudiados. Esto reafirmaría la importancia de los factores ambientales en la síntesis de terpenos y fenoles.

4. Cuando se estudia la variación de fenoles y terpenos en individuos de *C. ladanifer* con diferentes edades, se aprecian variaciones dependiente de la edad. Los individuos más jóvenes (de menos de un año) segregan significativamente menos cantidad de compuestos que el resto de individuos con edades mayores.

5. Al determinar la variabilidad existente entre las diferentes partes de la planta, se pone en evidencia que el órgano que mayor variabilidad presenta es el tallo. Por estaciones, la menor variabilidad se produce durante el otoño seguido de invierno y primavera, siendo en verano donde encontramos mayor variabilidad. Si

diferenciamos por órganos y estaciones, los CV de las hojas jóvenes son similares y menores en verano, otoño e invierno; en las hojas maduras en verano, otoño y primavera; y en tallos los CV en otoño e invierno son parecidos frente a los cuantificados en primavera y verano. Se destaca que la edad que menor variabilidad registra en los dos grupos de compuestos es la comprendida entre 7 y 12 años.

6. En cuanto a la variación intrapoblacional estudiada, destacamos que la variación es cuantitativa y no cualitativa. Existe una mayor cantidad de flavonoides que de diterpenos en los individuos muestreados aunque los mayores coeficientes de variación se dan en diterpenos. Respecto a las similitudes entre los individuos muestreados se pueden distinguir 4 grupos principales que se diferencian en las cantidades secretadas de cada uno de los compuestos analizados. De la distribución espacial observada cabe destacar que el 66% de los individuos (grupo A) que forman una población de *C. ladanifer* presentan bajas cantidades de todos y cada uno de los compuestos estudiados estando ampliamente distribuidos por toda la zona ocupada por la población. Por otro lado, tanto los individuos que presentan mayores cantidades en la mayoría de los compuestos (grupo B) como los que presentan cantidades intermedias (grupo C y D) se intercalan entre los individuos de menores cantidades (grupo A). Los individuos de los grupos B y C están distribuidos de forma aleatoria y los del grupo D formando grupos. Esta variabilidad intrapoblacional muestra la capacidad de la población de *C. ladanifer* para adaptarse a variaciones bióticas y abióticas del medio.

7. Los resultados obtenidos del estudio de la variabilidad interpoblacional en la síntesis de los compuestos del metabolismo secundario secretados por *C. ladanifer* muestran que existen diferencias significativas entre las diferentes poblaciones estudiadas, pudiéndose diferenciar 4 grupos caracterizados principalmente por las diferentes cantidades secretadas de K-3, K-3,7 y Dt-1. Por tanto, cada población se ajusta, según sus características genéticas, a las condiciones ambientales donde se desarrolla. Además, se encontraron diferencias en los CV, lo que indica que cada población presenta una variabilidad genética diferente. Considerando tanto el total de

compuestos como flavonoides totales y diterpenos totales se observa una mayor componente interpoblacional que intrapoblacional, es decir, existe mayor variación en la síntesis de metabolitos secundarios entre las distintas poblaciones muestreadas que dentro de una misma población, lo que indicaría que las poblaciones de esta especie además de presentar variabilidad genética presentan plasticidad fenotípica.

8. El estudio con clones de *C. ladanifer* pone de manifiesto la plasticidad en la secreción de los compuestos del metabolismo secundario. Cabe destacar que todos los genotipos estudiados poseen normas de reacción inclinadas y paralelas lo que podría indicar la existencia de una respuesta plástica similar entre los genotipos, una baja variación genética en la síntesis de estos compuestos y poca interacción entre los genotipos y el ambiente (ya que todos reaccionan de forma paralela ante el mismo estrés ambiental), pudiendo sugerir la evolución adaptativa de esta norma de reacción. Además, en todas las condiciones a las que se han sometido los clones de *C. ladanifer* los valores estimados de heredabilidad eran bajos (menores del 23%), siendo mayor para flavonoides que para diterpenos. Que esta variabilidad genética en la población para la síntesis de flavonoides y diterpenos sea baja, indicaría que este carácter ha sufrido un proceso de adaptación y está fijado. Así, un genotipo es capaz de alterar la expresión de los metabolitos secundarios para aclimatarse a las condiciones donde se encuentra. Que los individuos de esta especie sean capaces de desarrollar el fenotipo óptimo, en distintos ambientes, la caracteriza como especie generalista.

En síntesis, con los resultados aportados en esta memoria, se puede concluir que la secreción de los metabolitos secundarios varía entre tejidos, estaciones, edad e interanualmente. Por ello, antes de estudiar la variabilidad en la síntesis de los compuestos del metabolismo secundario en *C. ladanifer*, habría que cuantificar estas diferentes variaciones. Así, se determinaría con mayor precisión la variabilidad fenotípica de una población de *C. ladanifer* en la secreción de los metabolitos secundarios. En este caso, deberíamos elegir muestras de hojas jóvenes en verano, otoño o invierno; o bien de hojas maduras en verano, otoño o primavera en individuos con una edad comprendida entre 7 a 12 años. Aplicando estos criterios se ha encontrado una gran variabilidad intra e interpoblacional en la secreción de estos compuestos siendo mayor la inter que la intrapoblacional. Además las condiciones ambientales hacen que los distintos genotipos respondan diferente ante distintos estreses ambientales, poniendo de manifiesto la plasticidad en la secreción de metabolitos secundarios de *C. ladanifer*. Esta variación puede tener consecuencias evolutivas ya que la selección natural podría aumentar la frecuencia de los genotipos con mayor aptitud. En conclusión, los individuos de esta especie serían capaces de desarrollar el fenotipo óptimo en distintos ambientes, lo que la caracterizaría como una especie generalista.

BIBLIOGRAFÍA

- ACKERLY D. D. (2004). Functional strategies of chaparral shrubs in relation to seasonal water deficit and disturbance. *Ecological Monographs* 74:25–44.
- ALÍAS J.C. (2006). Influencia de los factores climáticos en la síntesis y actividad de compuestos fitotóxicos secretados por *Cistus ladanifer* L. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura. Badajoz. España.
- ALÍAS J.C., SOSA T., ESCUDERO J.C. y CHAVES N. (2006). Autotoxicity against germination and seedling emergente in *Cistus ladanifer* L. *Plant and Soil*, 282: 327-332.
- ALONSO-AMELOT M.E., OLIVEROS A. y CALCAGNO M.P. (2006). Phenolics and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to sunlight exposure, elevation and rain regime. *Biochemical Systematics & Ecology* 35(1): 1-10 (2007).
- ANTONOVICS J. (2006). Evolution in a closely adjacent plant population X: long term persistence of pre reproductive isolation at a mine boundary. *Heredity*, 97: 33-37.
- BAAS W.J. (1989). Causes and Consequenses of variation in growth rate and productivity of higher plants, pp: 313-340. En H. Lambers, M.L. Cambridge, H. Konings y T.L. Pons (eds). *SPB Academic Publishing, The Hague*.
- BALAGUER L., MARTÍNEZ-FERRI E., VALLADARES F., PÉREZ-CORONA E., BAQUEDANO F.J., CASTILLO F.J. y MANRIQUE E. (2001). Population divergence in the plasticity of the response of *Quercus coccifera* to the light environment. *Functional Ecology* 15: 124–135.
- BARAZA E., ZAMORA R. y HODAR J. A. (2006). Conditional outcomes in plant herbivore interactions: neighbours matter. *Oikos* 113:148–156.
- BARCELÓ J. y POSCHENRIEDER C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental Exeriment Botanics*, 48: 75-92.
- BECKER P. y SMITH A. P. (1990). Spatial autocorrelation of solar radiation in tropical moist forest understory. *Agricultural Foest Meteorology*: 52, 373–379.

- BEKER R., DAFNI A., EISIKOWITCH D. y RAVID U. (1989). Volatiles of two chemotypes of *Majorana syriaca* L. (Labiatae) as olfactory cues for the honeybee. *Oecologia* 79:446–451.
- BERGSTROM G. (1978). Role of volatile chemicals in *Ophrys*–pollinator interactions, pp. 207–231, en J. B. Harborne (ed.). *Biochemical Aspects of Plant and Animal Coevolution*. Academic Press, London, United Kingdom.
- BERENBAUM M.R., ZANGERL A.R. y NITAO J.K. (1986) Constraints on chemical coevolution: Wild parsnips and the parsnip webworm. *Evolution* 40:1215–1228
- BERENBAUM M.R. y ZANGERL A.R. (1992). Genetics of physiological and behavioral resistance to host furanocoumarins in the parsnip webworm. *Evolution* 46:1373–1384.
- BEWLEY J.D. y BLACK M. (1994). *Seeds: Physiology of development and germination. Second Edition. Plenum Press. New York.*
- BLONDEL J. y ARONSON J. (1999) *Biology and wildlife of the Mediterranean Región.* Oxford University Press, Oxford.
- BLUM U. (1996). Allelopathic interactions involving phenolic acids. *Journal Nematology*, 28: 259–267.
- BOLAÑOS M.M. y GUINEA E. (1949). *Jarales y jaras. Ares, Madrid.*
- BOHM B.A. (1987). Intraspecific flavonoid variation. *Botanical Review*, 53: 197–279.
- BRAMLEY M. (1997). Isoprenoid metabolism. *Plant Biochemistry*, pp. 417–437.
- BRAUN-BLANQUET, MOLINIER R. y WARNER, H. (1941). Prodrome des groupements vegetaux. *Montpellier, Francia.*
- BRENNAN R. M., ROBERTSON G. W., MCNICOL J. W., FYFEE L. y HALL J. E. (1992). The use of metabolic profiling in the identification of gall mite (*Cecidophyopsis ribis* Westw.)–resistant blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) genotypes. *Annals of Applied Biology* 121:503–509.
- BRIGNOLAS F., LIEUTIER F., SAUVARD D., CHRISTIANSEN E. y BERRYMAN A.A. (1998). Phenolic predictors for Norway spruce resistance to the bark beetle *Ips*

- typographus* (Coleoptera: Scolytidae) and an associated fungus, *Ceratocystis polonica*. *Canadian Journal of Forest Research*, 28: 720–728.
- BRYANT J. y JULKUNEN-TIITTO R. (1995). Ontogenetic development of chemical defense by seedling resin birch: Energy cost of defense production. *Journal of Chemical Ecology*, 21: 883–896.
- BRYANT J.P., PROVENZA F.D., PASTOR J, REICHARDT P.B, CLAUSEN T.P y DU TOIT J. (1991). Interactions between woody plants and browsing mammals mediated by secondary metabolites. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 22:431-446.
- BRYANT J. P., CHAPIN F. S. III, REICHARDT P. B., y CLAUSEN T. P. (1987). Response of winter chemical defense in Alaska paper birch and green alder to manipulation of plant carbon/nutrient balance. *Oecologia*, 72: 510-514.
- CABEZAS J. y ESCUDERO J.C. (1989). Estudio termométrico de la provincia de Badajoz. Ed: Dirección general de investigación, extensión y capacitación agrarias. Badajoz, España.
- CABEZAS J., NÚÑEZ E., MARROQUIN A. y ESCUDERO J.C. (1986). Distribución espacial y temporal de las precipitaciones en la provincia de Badajoz y cuantificación de los volúmenes de agua precipitada por planimetría. Conserjería de Agricultura y Comercio, Junta de Extremadura. Badajoz.
- CAHILL J.F., KEMBEL S. W. y GUSTAFSON D. J. (2005). Differential genetic influences on competitive effect and response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Ecology*, 93: 958–967.
- CARIVEAU D, IRWIN R.E. , BRODY A.K., GARCIA-MAYEYA L.S. y VON DER OHE A. (2004). Direct and indirect effects of pollinators and seed predators to selection on plant and floral traits. *Oikos* 104:15-26.
- CARROLL M.J., ZANGERL A.R y BERENBAUM M.R. (2000). Heritability estimates for octyl acetate and octyl butyrate in the mature fruit of the wild parsnip. *Journal of Heredity* 91: 68–71.

- CHAVES N., ESCUDERO J.C., y GUTIERREZ-MERINO C. (1993). Seasonal variation of exudate of *Cistus ladanifer*. *Journal of Chemical Ecology*, 19(11): 2577-2591.
- CHAVES N. (1994). Variación cualitativa y cuantitativa de los flavonoides del exudado de *Cistus ladanifer* L. como respuesta a diferentes factores ecológicos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura, Badajoz, España.
- CHAVES N. y ESCUDERO J.C. (1997). Allelopathic effect of *Cistus ladanifer* on seed germination. *Functional Ecology*, 11: 432-440.
- CHAVES N., ESCUDERO J.C. y GUTIÉRREZ-MERINO C. (1997). Role of ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exudate. *Journal of Chemical Ecology*, 23(3): 579-603.
- CHAVES N., RÍOS J.L., GUTIÉRREZ C., ESCUDERO J.C., y OLÍAS J.M. (1998). Analysis of secreted flavonoids of *Cistus ladanifer* L. by high-performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 799: 111-115.
- CHAVES N. y ESCUDERO J.C. (1999). Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors, pp: 267-285. In Inderjit, K.M.N. Dakshini and F.L. Chester (eds.). *Principles and Practices in Plant Ecology. Allelochemicals Interactions* CRC Press. Boca Raton, Florida.
- CHAVES N., SOSA T. y ESCUDERO J.C. (2001a) Plant growth inhibiting flavonoids in exudate of *Cistus ladanifer* and in associated soils. *Journal of Chemical Ecology*, 27: 623-631.
- CHAVES N., SOSA T., ALÍAS J.C. y ESCUDERO J.C. (2001b). Identification and effects of the interaction of phytotoxic compounds from exudate of *Cistus ladanifer* leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 27: 611-621.
- CHAVES N., ALÍAS J.C., SOSA T. y ESCUDERO J.C. (2002). Allelopathic potential of *Cistus ladanifer* chemicals in response to variations of light and temperature. *Chemoecology*, 12: 139-145.
- CHAVES N., SOSA T., ALÍAS J.C. y ESCUDERO J.C. (2003). Germination inhibition of herbs in *Cistus ladanifer* L. soil: Possible involvement of allelochemicals. *Allelopathy*

- Journal*, 11(1): 31-42.
- CHOU C.H. y KUO Y.L. (1986). Allelopathic research of subtropical vegetation in Taiwan. Allelopathic exclusion of understorey by *Leucaena leucophylla* (Lam) de Wit. *Journal of Chemical Ecology*, 12: 1431-1448.
- COLEMAN J. S. (1986) Leaf development and leaf stress: increased susceptibility associated with sink-source transition. *Tree Physiol.* 2, 289-299.
- COLEMAN J. S., y JONES C. G. (1991). A phytocentric perspective of phytochemical induction by herbivores. In *Phytochemical Induction by Herbivores* eds D. W. Tallamy and M. J. Raupp. pp. 3-46. Wiley, New York.
- CONNOLLY J.D. y HILL R.A. (2001). *Dictionary of Terpenoids*. 3 vols. Vol.1: Mono- and sesquiterpenoids. Vol.2: Di- and higher Terpenoids. Vol.3: Indexes.
- COVELO F. y GALLARDO A. (2004). Green and senescent leaf phenolics showed spatial autocorrelation in a *Quercus robur* population in northwestern Spain. *Plant and Soil*, 259: 267– 276.
- CRAWLEY M.J. (1983). *Herbivory: dynamics of plant-animal interactions*. University of California Press, Berkeley, Calif.
- CRONQUIST A. (1977). On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms. *Plant Systematics and Evolution*, 1: 179-189.
- CUADRA J., HARBORNE J.B y WATERMAN P.G (1997). Increase in surface flavonols and photosintetics pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV radiation. *Phytochemistry*, 45: 1377.
- DARWIN C. (1859). *The Origin of Species*. London, John Murray.
- DAUBENMIRE R.F. (1988). *Ecología vegetal: tratado de autoecología de plantas*. Editorial Limusa. Mexico, p. 496.
- DELGADO D.M. (2008). Presencia de flavonoides y metales pesados en el suelo, aplicando residuos agroindustriales biotransformados de la caña de azúcar “*saccharum officinarum*” y el plátano “*musa spp.*” Trabajo de grado. Escuela de postgrados. Palmira Valle (Colombia).

- DIXON R. A. y PAIVA N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1085–1097.
- DOLCH R. y TSCHARNTKE T. (2000). Defoliation of alders (*Alnus glutinosa*) affects herbivory by leaf beetles on undamaged neighbours. *Oecologia* 125, 504–511.
- DUDLEY S.A. y SCHMITT J. (1996). Testing the adaptive plasticity hypothesis: density-dependent selection on manipulated stem length in *Impatiens capensis*. *American Naturalist* 147: 445-465.
- DUDT J. F. y SHURE D. J. (1994). The influence of light and nutrients on foliar phenolics and insect herbivory. *Ecology* 75, 86-98.
- ESSEMBERG M. (2001). Prospects for strengthening plant defense through phytoalexin engineering. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59: 71-81.
- FALCONER D.S. (1989). Introducción a la genética cuantitativa. Compañía editorial continental, S.A. Calz. De Tlalpan Núm. 4620, México 22, D.F.
- FALCONER D.S. y MACKAY T.F.C. (1996) Introduction to quantitative genetics. 4th edn. Longman, New York, 464 pp.
- FERNÁNDEZ F. y LABRADOR J. (2003). Del Suelo que nos nace. ADENEX: Extremadura, la tierra que amanece, 1:20-55. Diputación Provincial, Área Técnica de Comunicación. Cáceres.
- FRANCISCO-ORTEGA J., ELLIS R.H., GONZÁLEZ-FERIA E. y SANTOS- GUERRA A. (1994). Overcoming seed dormancy in ex situ plant germplasm conservation programmes: an example in the endemic *Argyranthemum* (Astereaceae: Anthemideae) species from the Canary Islands. *Biodiversity and Conservation*, 3: 341-353.
- FRANCO J.A. (1971). Flora de Portugal (Continente e Açores) Vol I y II. Umbeliferae. Lisboa.
- FRANCH R., JANDA M. y AHLQUIST P. (1986). Bacterial Gene Inserted in an Engineered RNA Virus: Efficient Expression in Monocotyledonous Plant Cells. *Science.*, 14; 231(4743):1294–1297.

- GALLET C., NILSSON M.C. Y ZACKRISSON O. (1999). Phenolic metabolites of ecological significance in *Empetrum hermaphroditum* leaves and associated humus. *Plant and Soil*, 210: 1–9.
- GAMBLE L. R. y BERGIN T. M. (1996). Western kingbird (*Tyrannus verticalis*). The birds of North America, number 227. The American Ornithologists' Union, Washington D.C., USA, y The Academy of Natural Sciences, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- GALEN C., SHORE J.S. y DEYOE H. (1991). Ecotypic divergence in alpine *Polemonium viscosum*: genetic structure, quantitative variation, and local adaptation. *Evolution* 45:1218-1228.
- GARCÍA-MARQUEZ E. y ESCUDERO J.C. (1991). Influencia de diferentes temperaturas sobre la germinación de *Cistus ladanifer*. III Jornadas de Ecología Terrestre. León, España.
- GARCIA-MARTIN D. y GARCIA-VALLEJO C. (1969). Contribution a la connaissance de l'huile essentielle de *Cistus ladanifer* var *maculatus* Dun (Ciste commun-jara d'Espagne). *Parf. Cosm. e Savon*, 12: 283-290.
- GERSHENZON J. (1984): Changes in the production of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. Plenum Press, New York.
- GIANOLI E. (2004). Plasticidad fenotípica adaptativa en plantas, pp: 13-25, en H. Marino (ed.). Fisiología Ecológica en Plantas. Mecanismos y respuestas a estrés en los ecosistemas. EUV Valparaíso (Chile).
- GOES E.S.R. (1968). Um estudo em montado de sobro. Relações entre o solo e a vegetação no Plioceno a sul do Tejo. Publ. da D.G.S.F.A. XXIX a XXXII: 62-105.
- GRAYNER R.J. y HARBORNE J.B. (1994). A survey of antifungal compound from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*, 37: 19-31
- GRIFFITHS A. J. F., WESSLER SR, LEWONTIN RC, CARROLL S.B. (2008). Genética 9ª.ed Madrid, ES. McGraw-Hill. ISBN: 8448160916.
- GRIME J.P., CORNELISSEN J.H.H.C., THOMPSON, K. y HODGSON J.G. (1996). Evidence of a causal connection between anti-herbivore defence and the decomposition rate of leaves, *Oikos*, 77: 489–494.

- GROSS G.G. (1981). En E.E. Conn (e^od) *The Biochemistry of Plants, Secondary Plant Products*, 7 pp: 301-316. *Academic Press*, New York.
- GUTTERMAN Y. (1994a). Strategies of seed dispersal and germination in plants inhabiting deserts. *Botanical Review*, 60: 373-425.
- GUTTERMAN Y. (1994b). Seed dispersal and germination strategies of *Spergularia diandra* compared with some other desert annual plants inhabiting the Negev desert of Israel. *Israel Journal of Plant Science*, 42: 261-274.
- GUTTERMAN Y. (1994c). Long-term seed position influences on seed germinability of the desert annual, *Mesembryanthemum nodiflorum* L. *Israel Journal of Plant Science*. 42: 197–205.
- HARBORNE J.B., (1967). *Comparative biochemistry of the flavonoids*. Academic press, New York.
- HARBORNE JB (1980). Plant phenolics. *Plant Physiology*. Pp:329-395.
- HARBORNE J.B. y TURNER B.L. (1984). *Plant Chemosystematics*. London: *Academic Press*.
- HARBORNE J.B. (1988). *Introduction to Ecological Biochemistry*. *Academic Press. London*.
- HARBORNE J.B (1991). Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. . Pp. 399-426.
- HARBORNE J.B (1997). Biochemical plant ecology. *Plant Biochemistry*. Pp. 503–516.
- HARTLEY S. E. y JONES C. G. (1997). Plant chemistry and herbivory, or why the world is green, pp. 284-324, in M. J. Crawley (ed.). *Plant Ecology*. Blackwell Science, Oxford.
- HAUKIOJA E., OSSIPOV V., KORICHEVA J., HONKANEN T., LARSSON S. y LEMPA K. (1998). Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: Cause of variable responses of woody plants to fertilization? *Chemoecology* 8, 133–139.
- HEGARTY M.J., HISCOCK S.J. (2005). Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *New Phytologist* 165: 411–423.
- HERMS D. A y MATTSON W. J. (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology* 67, 283–335.

- HERRERA C.M. (1984). Tipos morfológicos y funcionales en plantas del matorral mediterráneo del sur de España. *Studia Oecologica*, pp 7-34.
- HOFFMANN A.A. y MERILA J. (1999). Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 96–101.
- HOFFMANN A.A. y PARSONS P.A. (1991). *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*, Oxford University Press: Oxford.
- JARVIS B. (2000) The role of nature products in evolution. Recent Advances in Phytochemistry. Elsevier Science, 1-24.
- JONES C.G. y HARTLEY S.E. (1999). A protein competition model of phenolic allocation, *Oikos* 86: 27–44.
- JULKUNEN-TIITTO R., ROUSI M., BRYANT J., SORSA S., KEINÄNEN M. y SIKANEN H. (1996). Chemical diversity of Betulaceae species: Comparison of phenolics and terpenoids in northern birch stems. *Trees* 11: 16-22.
- KARBAN R., AGRAWAL AA. y MANGEL M. (1997). The benefits of induced defenses against herbivores. *Ecology* 78, 1351–1355.
- KEINÄNEN M., JULKUNEN-TIITTO R., MUTIKAINEN P., WALLS M., OVASKA J. y VAPAAVUORI E. (1999). Trade-offs in phenolic metabolism of silver birch: effects of fertilization, defoliation, and genotype. *Ecology* 80, 1970–1986.
- KLINKHAMER P. G. L., DE JONG T. J. y LINNEBANK L.A. (2001). Small-scale spatial patterns determine ecological relationships: an experimental example using nectar production rates. *Ecology Letters* 4:559–567.
- KOBAYASHI K. (2004). Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biol. Management.*, 4: 1-7.
- KOEPPE D.E., ROHRBAUGH L.M. y WENDER S.H.. (1969). The effect of varying U.V. intensities on the concentration of scopolin and caffeoylquinic acids in tobacco and sunflower. *Phytochemistry* 8:889-- 896.
- KOES R.E., QUATTROCCHIO F. y MOL J.N.M. (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 16: 123–132.

- KORICHEVA J., LARSSON S., HAUKIOJA E. y KEINÄNEN M. (1998). Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: Hypothesis testing by means of metanalysis. *Oikos* 83, 212–226.
- KÖRNER C. (1999). *Alpine Plant Life. Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems*. Springer, Berlin.
- KRISCHIK V. A y DENNO R. F. (1983). Individual population and geographic patterns in plant defense. In: Denno, R. F., M. McClure (eds.), *Variable plants and herbivores in natural and managed systems*. Academic Press. N. Y. 463-512.
- KYPARISSIS A., DRILIAS P., PETROPOULOU Y., GRAMMATIKOPOULOS G. y MANETAS Y. (2001). Effects of UV-B radiation and additional irrigation on the Mediterranean evergreen sclerophyll *Ceratonia siliqua* L. under field conditions, *Plant Ecology* **154**, pp. 189–193.
- LAITINEN M.-L., JULKUNEN-TIITTO R., TAHVANAINEN J., HEINONEN J., y ROUSI M. (2005). Variation in birch (*Betula pendula*) shoot secondary chemistry due to genotype, environment and ontogeny. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 697-717.
- LAITINEN M.-L., JULKUNEN-TIITTO R. y ROUSI M. (2000). Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. *Journal of Chemical Ecology*, 26 (7): 1609-1622.
- LATTANZIO V., ARPAIA S., CARDINALI A., DI VENERE D. y LINSALATA V. (2000). Role of endogenous flavonoids in resistance mechanism of *Vigna* to aphids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5316–5320.
- LATTANZIO V., CARDINALI A., DI VENERE D., LINSALATA V. y PALMIERI, S. (1994). Browning phenomena in stored artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads: Enzymatic or chemical reactions? *Food Chemistry*, 50: 1–7.
- LAVOLA A. (1997). Accumulation of flavonoids and related compounds in birch (*Betulaceae*) induced by UV-B irradiance. *Tree Physiology*: 8,53-58.
- LEVIN D.A. (1976). The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 7: 121-159.

- LEVIN D.A. (2009). Flowering-time plasticity facilitates niche shifts in adjacent populations. *New Phytologist* 183: 661-666.
- LEVIZOU E. y MANETAS Y. (2001). Combined effects of enhanced UV-B radiation and additional nutrients on growth of two Mediterranean plant species, *Plant Ecology* 154, pp. 181–186.
- LI B., SUZUKI J.I. y HARA T. (1998). Latitudinal variation in plant size and relative growth rate in *Arabidopsis thaliana*. *Oecologia* 115:293-301
- LI J., OU-LEE T.M, AMUNDSON R.G y LAST R.L. (1993). *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5:171--179
- LINDROTH R.L. y BATZLI G.O. (1984). Plant phenolics as chemical defenses: effects of natural phenolics on survival and growth of prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Journal of Chemical Ecology*, 10: 229-244.
- LOIS R. (1994). Accumulation of UV - absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. *Planta* 194:498-503.
- LOTT H.V. (1960). Über den Einfluss der kurzwelligen Strahlung auf die Biosynthese der pflanzlichen Polyphenole. *Planta* 55:480--495.
- LOVELOCK C.E., CLOUGH B.F. y WOODROW I.E. (1992). Distribution and accumulation of ultraviolet-radiation-absorbing compounds in leaves of tropical mangroves. *Planta* 188: 143–154
- MAL T.K. y LOVETT-DOUST J. (2005). Phenotypic plasticity in vegetative and reproductive traits in an invasive weed, *Lythrum salicaria* (Lythraceae), in response to soil moisture. *American Journal of Botany* 92:819-825.
- MCGARVEY y CROTEAU (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell.*, pp. 1015–1026.
- MERILÄ J. y SHELDON B.C. (2000). Lifetime reproductive success and heritability in nature. *American Naturalist* 155:301-310.
- MIHALIAK C. A. y LINCOLN D. E. (1989). Plant biomass partitioning and chemical defense: Response to defoliation and nitrate limitation. *Oecologia* 80, 122-126.

- MOLE S. y. JOERN A. (1993). Foliar Phenolics of Nebraska Sandhills Prairie Graminoids: Between-years, Seasonal and Interspecific Variation. *Journal Chemical Ecology*, 19: 1861-1874.
- MOORE B. D., y FOLEY W. J. (2005). Tree use by koalas in a chemically complex landscape. *Nature*, 435: 488–490.
- MOREL G. y WETMORE H. (1951). Tissue culture of monocotyledons. *American Journal of Botany*. 38:138-140.
- MURASHIGE T. y SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*. 15:437-497.
- MUZIKA R. M., PREGITZER K. S. y HANOVER J. W. (1989). Changes in terpene production following nitrógeno fertilization of grand fir (*Abies grandis* (Dougl.) Lindl.) seedlings. *Oecologia* 80, 485-489.
- NICOTRA A. B., CHAZDON R L. y IRIARTE S. V. B. (1999). Spatial heterogeneity of light and woody seedling regeneration in tropical wet forests. *Ecology* 80, 1908–1926.
- NIKOLOVA M. y IVANCHEVA S.T.(2005). Quantitative flavonoid variations of *Artemisia vulgaris* L. and *Veronica chamaedrys* L. in relation to altitude and polluted environment. *Acta Biol. Szeg.*, 49(3-4):29-32 .
- NILSSON M.C, GALLET C. y WALLSTEDT A. (1998). Temporal variability of phenolics and batatasin-III in *Empetrum hermaphroditum* leaves over an eight-year period: interpretations of ecological function. *Oikos*, 81: 6–16.
- NOVAK S.J., MACK R.N. y SOLTIS D.E. (1991). Genetic variation in *Bromus tectorum* (Poaceae): population differentiation in its North American range. *American Journal of Botany* 78:1150-1161.
- NUÑEZ E. (1989). Ecología del jaral de *Cistus ladanifer* L. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz, España.
- OLIVA A., LAHOZ E., CONTILLO R. y ALIOTA G. (1999). Fungistatic activity of *Ruta graveolens* extract and its allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 25: 519-526.

- ORIAN S. C. M., LOWER R., FRITZ S. y ROCHE B.M. (2003). The effects of plant genetic variation and soil nutrients on secondary chemistry and growth in a shrubby willow, *Salix sericea*: patterns and constraints on the evolution of resistance traits. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 233–247.
- ORIAN S. C.M., ROCHE B.M., FRITZ R.S. (1996). The genetic basis for variation in the concentrations of phenolic glycosides in *Salix sericea*: An analysis of heritability. *Biochemical Systematics and Ecology*. 24, 719–724.
- PALO R. T., SUNNERHEIM K., y THEANDER O. (1985). Seasonal variation of phenols, crude protein and cell wall content of birch (*Betula pendula* Roth) in relation to ruminant in vitro digestibility. *Oecologia*, 65: 314-318.
- PASCUAL T., URONES J.G. y BASABE P. (1974). Flavonoides del *Cistus ladanifer* L. *Anales de Química*, 70: 155-157.
- PASCUAL T., URONES J.G. y GONZALEZ M. (1977) Terpenoides monohidroxilados de la gomorresina de *Cistus ladaniferus* L. *Anales Química*, 73: 1024-1028.
- PEREIRA-MOUTINHO A.X. (1939). Flora de Portugal. Bertrand (Irmaos). Lisboa.
- PÉREZ-GARCÍA F. (1997). Germination of *Cistus ladanifer* seed in relation to parent material. *Plant Ecology*, 133: 57-62.
- PETERS N.K. y VERMA D.P.S. (1990). Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Molecular Plant Microbe Interaction* 3: 4-8
- PILSON D. (1992). *Aphid* distribution and the evolution of goldenrod resistance. *Evolution*, 46: 1358-1372.
- PIGLIUCCI M. y SCHLICHTING C.D. (1996). Reaction norms of *Arabidopsis*. IV. Relationships between plasticity and fitness. *Heredity* 76: 427-436.
- PRAMANIK M.H.R., NAGAI M., ASAO T. y MATSUI Y. (2000). Effects of temperature and photoperiod on phytotoxic root exudates of cucumber in hydroponic culture. *Journal of Chemical Ecology* 26:1953–1967.
- PROKSCH P. y GÜLZ P.G. (1984). Methylated flavonoids from *Cistus ladanifer* and *Cistus palhinhae* and their taxonomic implications. *Phytochemistry*, 23(2): 470-471.

- RANGER C. M., SINGH A. P., JOHNSON-CICALESE J., POLAVARAPU S., y VORSA N. (2007). Intraspecific variation in aphid resistance and constitutive phenolics exhibited by the wild blueberry *Vaccinium darrowi*. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 711–729.
- REICHARDT P. B., BRYANT J. P., CLAUSEN T. P., y WIELAND G. D. (1984). Defense of winterdormant Alaska paper birch against snowshoe hares. *Oecologia*, 65: 58–69.
- RHODES M.J.C. (1994). Physiological roles for secondary metabolites in plants: Some progress many outstanding problems. *Plant Molecular Biology*, 24: 1–20.
- RICE E.L. (1984). Allelopathic. *Academic Press, Orlando, Florida*.
- RIIPI M., HAUKIOJA E., LEMPA K., OSSIPOV V., OSSIPOVA S y PIHLAJA K. (2004). Ranking of individual mountain birch trees in terms of leaf chemistry: seasonal and annual variation. *Chemoecology*, 14:31– 43.
- RIVAS-GODOY y RIVAS-MARTINEZ, P. (1967). Matorrales y tomillares de la Península Ibérica comprendidos en la clase Ononodo-Rosmarineta. *Madrid*.
- ROOT R. B. (1967). The niche exploitation pattern of the blue-grey gnatcatcher. *Ecological Monographs*, 37: 317–350.
- RUBIO R. (2006). “Microevolution in Mediterranean sclerophylls: Genetic and phenotypic differentiation in *Quercus coccifera* L. and *Olea europaea* L.” Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- SANDERMANN H. JR., ERNST D., HELLER W. y LANGEBARTELS C. (1998). Ozone: an abiotic elicitor of plant defense reactions. *Trends in Plants Science*, 3: 47– 50.
- SCHLICHTING C. D. y PIGLIUCCI M. (1998). Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- SEIGLER D.S. (1998). Plant Secondary Metabolism. *Kluwer academic Publishers, Norwel (USA)*.
- SEUFERT G., BERTIN N., DÜRR M., HANSEN U. y STAUDT M., A (1995). Report on the first BEMA field campaign at Castelporziano. En: *EUR Report 16293 EN*, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg (1995), pp. 173–197.

- SHEAHAN J.J. (1996). Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 83:679--686.
- SHELTON A. L. (2000). Variable chemical defences in plants and their effects on herbivore behaviour. *Evolutionary Ecology Research* 2: 231–249.
- SIEGELMAN H.W., (1964). Physiological studies on phenolic compounds. En: Harborne, J.B. (Ed.), *Biochemistry of Phenolic Compounds*. Academic Press, New York, pp. 437–456.
- SIGEO, Sistema de Información geológico-minero de Extremadura. Consejería de Industria, Energía y Medio Ambiente. Dirección General de Ordenación Industrial, Energía y Minera, (2003). Mapa geológico escala 1:50000.
- SIMMS E. L. (1992). Costs of plant resistance to herbivory. In *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens: Ecology, Evolution, and Genetics*, eds R. S. Fritz and E. L. Simms, pp. 392-425. University of Chicago Press, Chicago.
- SMITH M. (2005). *Plant Resistance to Arthropods: Molecular and Conventional Approaches*. Berlin: Springer. ISBN 1-4020-3701-5.
- SOSA, T. (2003) Contribución al estudio de las funciones ecológicas que pueden desempeñar los compuestos derivados del metabolismo secundario en *Cistus ladanifer* L. PhD Thesis. Universidad de Extremadura.
- SOSA T., CHAVES N., ALÍAS J.C., ESCUDERO J.C., HENAO F. y GUTIÉRREZ-MERINO C. (2004). Inhibition of mouth skeletal muscle relaxation by flavonoids of *Cistus ladanifer* L.: a plant defense mechanism against herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 30: 1087-1101.
- SOSA T., ALÍAS J.C., ESCUDERO J.C. y CHAVES N. (2005). Interpopulational variation in flavonoid composition of *Cistus ladanifer* L. exudate. *Biochemical systematics and ecology*, 33: 353 - 364.
- SOSA T., VALARES C., ALÍAS J.C Y CHAVES N. (2010). Persistence of flavonoids in *Cistus ladanifer* soils. *Plant and Soil*, 337:51–63.
- STAFFORD H.A. (1991). Flavonoid evolution: An enzymic approach. *Plant Physiology*, 96: 680 – 685.

- STAMP N.E., YANG Y. y OSIER T.P. (1997). Respose of an insect predator to prey fed multiple allelochemicals under representative thermal regimes. *Ecology*, 78: 203-214.
- STEBBINS G.L. (1950). Variation and evolution in plants. Pp 658 New York: *Columbia Univ Press*.
- STRACK D. (1997). Phenolic Metabolism. *Plant biochemistry*, pp. 388–416.
- SULLIVAN J.H., HOWELLS B.W., RUHLAND C.T. y DAY T.A. (1996). Changes in leaf expansion and epidermal screening effectiveness in *Liquidambar styraciflua* and *Pinus taeda* in response to UV-B radiation. *Plant Physiology*. 98:349–357.
- SULTAN S.E. y BAZZAZ F.A. (1993) Phenotypic plasticity in *Polygonum persicaria*. I. Diversity and uniformity in genotypic norms of reaction to light. *Evolution* 47:1009-1031.
- SWAIN, T. (1973). Chemistry in evolution and systematics. Butterworth, Londres.
- TAHVANAINEN J., NIEMELÄ P. Y HENTTONEN H. (1991). Chemical aspects of herbivory in boreal forest-feeding by small rodents, hares and crevids Plant Defenses against Mammalian Herbivory, CRC Press, Boca Raton, Florida (1991), pp. 115–131.
- TAIZ I., LINCOLN L. y GEIGER E. (2006). Secondary Metabolites and Plant Defense. *Plant Physiology, Fourth Edition* (Capítulo 13).
- TEGELBERG R, VETELI T., APHALO P.J. y JULKUNEN-TIITTO R. (2003). Clonal differences in growth and phenolics of willows exposed to elevated ultraviolet-B radiation. *Basic and Applied Ecology* 4: 219–228.
- TIARKS A.E., BRIDGES J.R., HEMINGWAY R.W. y SHOULDERS E. (1989). Condensed tannins in southern pines and their interactions with the ecosystem. En: Hemingway, R.W., Karchesy, J.J. Eds., *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*. Plenum, New York, pp. 369–390.
- UPADHYAYA H., PANDA S.K. y DUTTA B.K. (2008). Variation of physiological and antioxidative responses in tea cultivars subjected to elevated water stress followed by rehydration recovery. *Acta Physiol Plant* 30:457–468

- VALLADARES F. (2006). ¿Por qué las plantas difieren en su plasticidad fenotípica? Una perspectiva ecofisiológica sobre la canalización. 2º Congreso Ibérico de Ecología. Lisboa, 2006.
- VALLADARES F., CHICO J.M., ARANDA I., BALAGUER L., DIZENGREMEL P., MANRIQUE E. y DREYER E. (2002). Greater high light seedling tolerance of *Quercus robur* over *Fagus sylvatica* is linked to a greater physiological plasticity. *Trees, Structure and Function* 16: 395–403.
- VAN DER MEIJDEN E. (1996). Plant defence, an evolutionary dilemma: Contrasting effects of (specialist and generalist) herbivores and natural enemies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80: 307–310.
- VOGTH T. y GÜLZ P.G. (1991). Isocratic column liquid chromatographic separation of a complex mixture of epicuticular flavonoid aglycones and intracellular flavonol glycosides from *Cistus laurifolius* L. *Journal of Chromatography*, 537: 453-459.
- VOKOU D. y MARGARIS N.S. (1984). Effects of volatile oils from aromatic shrubs on soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 6: 509–513.
- VOURC'H G., VILA B., GILLON D., ESCARRÉ J., GUIBAL F., FRITZ H., CLAUSEN T. P. y MARTIN J. L. (2002). Disentangling the causes of damage variation by deer browsing on young *Thuja alicata*. *Oikos* 98, 271–283.
- WATERMAN P. G. (1992). Roles for secondary metabolites in plants, pp. 255–269, en D. J. Chadwick and J. Whelan (eds.). *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*. John Wiley y Sons, New York.
- WATERMAN P. G. y MOLE S. (1989). Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plants, pp. 107-134, en E. A. Bernays (ed.). *Insect y Plant Interactions*, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL.
- WATERMAN P. G., ROSS J. A. M. y MCKEY, D. B. (1985). Factors affecting levels of some phenolic compounds, digestibility and nitrogen content of the mature leaves of *Barteria fistulosa* (Passifloraceae). *Journal of Chemical Ecology*: 10, 387.
- WEBER E. y SCHMID B. (1998). Latitudinal population differentiation in two species of *Solidago* (Asteraceae) introduced into Europe. *American Journal of Botany* 85:1110-1121.

- WHITTAKER R. H., LEVIN S. A. y ROOT R. B. (1973). Niche, habitat, and ecotope. *The American Naturalist*, 107: 321–338.
- WILKENS R. T., SPOERKE J. M. y STAMP N. E. (1996). Differential responses of growth and two soluble phenolics of tomato to resource availability. *Ecology* 77, 247-258.
- WILLIAMS D.G., MACK R.N. y BLACK R.A (1995). Ecophysiology of introduced *Pennisetum setaceum* on Hawaii: the role of phenotypic plasticity. *Ecology* 76:1569- 1580.
- WITTSTOCK U. y GERSHENZON J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Currenty opinion in plant biology*. 5: 300-307.
- WOLFSON J. L. (1982) Developmental responses of *Pieris rapae* and *Spodoptera eridania* to environmentally induced variation in *Brassica nigra*. *Environmental Entomology* 11,207-211.
- WOLLENWEBER E. y DIEZ V.H. (1981). Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry*, 20: 869-932.
- WOODHEAD S. (1981) Environmental and biotic factors affecting the phenolic content of different cultivars of *Sorghum bicolor*. *Journal of Chemical Ecology*: 7, 1357.
- ZANGERL A. R. y BAZZAZ F. A. (1992) Theory and pattern in plant defense allocation. In *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens: Ecology, Evolution, and Genetics*. eds R. S. Fritz and E. L. Simms, pp. 363-391. University of Chicago Press, Chicago.
- ZHANG G., ZHANG W., LIAN B. y GU L. (1999). Insecticidal effects of extracts from two rice varieties to brown plant hopper *Nilaparvata lugens*. *Journal of Chemical Ecology*, 25: 1843-1853.
- ZIDORN C, SCHUBERT B y STUPPNER H (2005). Altitudinal differences in the contents of phenolics in flowering heads of three members of the tribe Lactuceae (Asteraceae) occurring as introduced species in New Zealand. *Biochemical Systematics and Ecology* 33:855–872.
- ZOBEL A.M. y LYNCH J.M. (1997). Extrusion of UV-A absorbing phenolics in *Hacer* spp. in response to UV and freezing temperature. *Allelopathy Journal*, 4: 269-276.

ZOBEL A.M., CLARKE P.A. y LYNCH J.M. (1999). Production of phenolics in response to UV irradiation and heavy metals in seedling of *Acer spp.* *Recent Advances in Allelopathy*. Servicio de publicaciones UCA, pp: 231-243.

ANEXO I

Tabla 1. Cantidad de flavonoides y diterpenos (mg/g PS) secretada en cada uno de los 100 individuos muestreados en una población de *C. ladanifer*. Cantidad media total, desviación típica total y CV total.

	Ap	Ap-4	Ap-7	K-3	K-3.7	Dt-1	Dt-2	Dt-3	Compuestos totales	Flavonoides totales	Diterpenos totales
1	0.15	0.96	2.17	3.09	25.92	1.23	0.07	0.18	33.78	32.29	1.48
2	0.19	0.91	2.69	3.65	23.72	1.22	0.07	0.16	32.62	31.17	1.45
3	0.11	1.09	1.68	1.94	23.01	0.93	0.07	0.11	28.95	27.84	1.11
4	0.11	0.86	1.85	2.00	20.79	1.32	0.09	0.09	27.10	25.61	1.50
5	0.17	1.45	2.58	2.27	18.69	1.25	0.08	0.08	26.57	25.15	1.42
6	0.09	0.91	1.59	0.64	8.55	1.07	0.05	0.03	12.93	11.78	1.14
7	0.17	1.35	2.82	2.19	18.20	1.38	0.07	0.06	26.24	24.73	1.51
8	0.27	1.25	1.99	4.64	19.52	1.11	0.07	0.05	28.91	27.67	1.24
9	0.18	1.12	1.83	3.00	14.76	1.25	0.06	0.05	22.26	20.90	1.36
10	0.27	1.03	3.56	4.18	25.14	1.32	0.08	0.09	35.68	34.19	1.50
11	0.32	1.83	2.46	3.55	18.20	1.10	0.06	0.05	27.57	26.36	1.21
12	0.17	0.98	4.28	4.49	28.81	1.35	0.07	0.09	40.25	38.74	1.51
13	0.19	0.89	3.48	2.98	16.93	0.72	0.06	0.08	25.33	24.47	0.86
14	0.11	0.82	1.75	2.87	15.59	0.65	0.04	0.05	21.89	21.15	0.74
15	0.11	1.41	1.15	3.41	10.46	0.53	0.02	0.04	17.14	16.55	0.59
16	0.13	0.73	1.35	3.92	13.18	0.64	0.03	0.03	20.00	19.30	0.70
17	0.09	0.52	1.39	3.18	16.00	0.51	0.03	0.05	21.77	21.18	0.59
18	0.13	0.86	1.41	3.71	11.25	0.61	0.02	0.04	18.03	17.36	0.67
19	0.19	0.81	3.13	3.31	14.30	0.60	0.05	0.06	22.44	21.74	0.71
20	0.05	0.51	0.69	1.13	4.41	0.33	0.02	0.01	7.15	6.79	0.36
21	0.14	0.96	1.61	2.70	9.65	0.49	0.03	0.03	15.61	15.06	0.55
22	0.08	0.83	0.92	1.94	6.34	0.39	0.02	0.02	10.55	10.11	0.44
23	0.11	0.95	1.68	2.54	8.28	0.57	0.03	0.04	14.19	13.55	0.64
24	0.07	0.63	1.18	2.35	7.51	0.41	0.02	0.03	12.20	11.74	0.46
25	0.11	0.74	1.30	3.54	8.07	0.51	0.02	0.05	14.34	13.76	0.58
26	0.07	0.98	1.22	2.50	8.99	0.66	0.02	0.02	14.46	13.75	0.70
27	0.15	1.01	2.02	5.00	16.30	0.66	0.03	0.03	25.20	24.48	0.72
28	0.12	0.81	1.36	2.82	6.44	0.42	0.10	0.02	12.09	11.55	0.54
29	0.06	0.80	0.89	1.72	5.33	0.42	0.06	0.04	9.32	8.80	0.52
30	0.12	0.93	0.97	3.89	5.64	0.41	0.02	0.04	12.04	11.56	0.48
31	0.28	2.15	3.21	4.43	12.83	2.17	0.05	0.09	25.23	22.91	2.32
32	0.31	1.98	4.63	7.42	28.47	1.80	0.07	0.14	44.82	42.81	2.01
33	0.30	2.07	3.01	6.14	13.80	1.06	0.07	0.05	26.51	25.33	1.17
34	0.18	1.92	3.17	6.10	25.82	1.07	0.05	0.07	38.37	37.18	1.19
35	0.13	1.39	2.04	4.58	14.30	0.82	0.04	0.03	23.33	22.44	0.89
36	0.15	2.32	2.81	3.84	11.15	1.76	0.06	0.04	22.13	20.27	1.86
37	0.20	2.38	3.00	4.60	13.72	2.94	0.06	0.12	27.03	23.91	3.12
38	0.16	1.93	2.52	3.31	22.65	0.54	0.05	0.11	31.27	30.57	0.69

39	0.27	2.93	2.98	3.85	12.72	1.69	0.07	0.08	24.59	22.75	1.84
40	0.28	1.73	2.61	7.35	16.91	1.92	0.03	0.09	30.92	28.89	2.03
41	0.38	2.76	3.57	8.66	26.85	1.16	0.07	0.08	43.52	42.21	1.31
42	0.42	2.52	4.58	11.34	39.49	1.62	0.06	0.14	60.17	58.35	1.82
43	0.32	2.10	4.62	7.56	31.27	2.11	0.08	0.09	48.15	45.87	2.28
44	0.34	2.42	4.52	4.75	23.82	1.93	0.06	0.11	37.94	35.85	2.09
45	0.28	2.81	4.07	4.34	24.39	2.03	0.10	0.09	38.11	35.89	2.22
46	0.38	3.09	4.54	4.76	23.59	2.23	0.11	0.13	38.81	36.35	2.46
47	0.18	2.02	2.98	3.44	21.01	1.47	0.09	0.11	31.30	29.63	1.67
48	0.21	2.10	3.72	5.65	27.08	1.24	0.06	0.10	40.16	38.76	1.40
49	0.17	1.98	2.61	4.77	16.88	1.18	0.06	0.03	27.67	26.41	1.26
50	0.29	2.91	3.93	2.84	20.66	2.36	0.11	0.07	33.17	30.64	2.53
51	0.23	1.72	3.46	3.88	22.16	1.07	0.05	0.08	32.66	31.45	1.20
52	0.49	2.71	5.44	8.93	29.88	1.42	0.12	0.03	49.03	47.45	1.58
53	0.30	2.97	3.60	7.47	26.85	2.65	0.13	0.07	44.04	41.19	2.85
54	0.28	3.39	3.77	3.79	13.04	2.07	0.12	0.06	26.52	24.28	2.25
55	0.40	3.65	4.39	11.07	19.74	2.00	0.08	0.15	41.47	39.25	2.23
56	0.16	2.83	3.24	2.78	13.95	1.79	0.10	0.05	24.89	22.95	1.93
57	0.21	3.23	3.21	2.01	12.83	1.69	0.09	0.09	23.36	21.49	1.87
58	0.27	2.98	3.37	3.29	17.70	2.50	0.10	0.05	30.27	27.61	2.65
59	0.13	1.86	2.62	1.16	8.81	1.28	0.05	0.02	15.95	14.59	1.36
60	0.19	2.01	2.57	2.67	13.43	0.98	0.04	0.02	21.91	20.87	1.04
61	0.21	2.39	2.80	2.99	12.02	1.40	0.07	0.03	21.92	20.42	1.50
62	0.26	2.69	3.52	3.87	11.68	1.79	0.07	0.06	23.93	22.01	1.92
63	0.28	3.63	4.01	4.18	13.37	1.82	0.08	0.13	27.51	25.48	2.03
64	0.34	3.46	4.31	4.92	18.83	1.20	0.10	0.09	33.25	31.86	1.38
65	0.20	2.76	3.37	1.69	9.89	1.78	0.08	0.10	19.87	17.91	1.96
66	0.22	3.32	3.71	2.13	10.63	1.18	0.08	0.10	21.37	20.01	1.36
67	0.27	3.38	4.16	2.75	11.09	1.34	0.05	0.06	23.11	21.66	1.45
68	0.30	3.61	4.10	3.90	14.00	1.16	0.05	0.08	27.21	25.92	1.29
69	0.36	3.23	3.92	6.17	18.35	1.42	0.07	0.13	33.65	32.03	1.62
70	0.18	2.01	2.67	3.59	12.43	1.23	0.07	0.04	22.22	20.88	1.33
71	0.18	1.93	2.86	3.08	14.95	1.17	0.04	0.10	24.30	22.99	1.31
72	0.21	2.67	3.19	4.80	17.55	1.89	0.10	0.11	30.52	28.42	2.10
73	0.31	2.13	3.79	11.04	37.40	0.96	0.11	0.04	55.78	54.67	1.11
74	0.23	2.40	2.27	5.98	12.48	0.98	0.05	0.06	24.44	23.35	1.09
75	0.50	3.26	5.41	14.57	30.56	1.46	0.07	0.08	55.91	54.30	1.62
76	0.49	2.98	4.42	8.21	20.13	1.51	0.08	0.11	37.92	36.22	1.69
77	0.36	2.98	3.80	6.04	21.00	1.35	0.08	0.08	35.68	34.17	1.50
78	0.25	2.10	2.72	5.75	15.45	1.08	0.09	0.08	27.50	26.26	1.24
79	0.61	3.75	5.01	12.44	45.64	1.61	0.10	0.09	69.25	67.45	1.80
80	0.30	2.73	3.79	7.66	20.27	1.49	0.08	0.11	36.44	34.75	1.68

81	0.20	1.60	2.66	6.34	21.18	1.42	0.08	0.07	33.55	31.99	1.56
82	0.16	1.91	2.67	3.32	12.82	1.59	0.08	0.04	22.58	20.88	1.70
83	0.49	2.87	5.48	10.13	30.32	2.06	0.07	0.08	51.51	49.29	2.22
84	0.30	2.06	3.45	5.87	25.87	1.80	0.09	0.19	39.63	37.55	2.08
85	0.27	2.35	2.85	4.39	19.35	1.61	0.06	0.05	30.91	29.19	1.72
86	0.27	3.00	3.75	4.08	25.76	2.33	0.08	0.18	39.44	36.85	2.58
87	0.39	2.45	4.86	9.77	30.73	1.17	0.05	0.11	49.52	48.19	1.34
88	0.31	2.37	3.08	7.68	20.15	1.69	0.06	0.03	35.37	33.60	1.78
89	0.18	1.90	2.47	7.09	12.48	0.90	0.05	0.11	25.17	24.12	1.06
90	0.29	2.46	3.24	7.18	38.43	1.82	0.09	0.19	53.70	51.59	2.11
91	0.31	1.89	5.05	2.46	24.52	1.19	0.05	0.16	35.64	34.24	1.40
92	0.24	2.89	3.28	3.40	22.70	0.77	0.04	0.23	33.55	32.51	1.03
93	0.17	1.75	2.56	4.41	20.52	0.66	0.04	0.09	30.19	29.40	0.78
94	0.19	1.96	3.70	4.32	29.97	1.06	0.04	0.07	41.31	40.14	1.17
95	0.36	3.35	4.40	7.55	35.26	2.07	0.12	0.09	53.19	50.92	2.27
96	0.19	1.97	2.88	2.14	8.30	0.95	0.05	0.11	16.60	15.48	1.11
97	0.13	1.64	2.70	2.42	22.01	0.85	0.04	0.06	29.85	28.91	0.94
98	0.22	1.75	3.27	4.54	28.70	0.85	0.05	0.18	39.56	38.48	1.08
99	0.24	1.88	2.61	2.52	14.74	2.03	0.07	0.07	24.15	21.98	2.17
100	0.24	2.17	2.94	5.52	19.01	0.89	0.03	0.08	30.89	29.89	1.01
x	0.23	2.03	3.04	4.67	18.66	1.30	0.06	0.08	30.08	28.63	1.45
S²	0.11	0.88	1.12	2.62	8.26	0.57	0.03	0.04	11.86	11.56	0.60
CV	46.02	43.05	37.00	56.16	44.28	43.77	40.74	56.43	39.43	40.37	41.82

x: valor medio poblacional, s²: desviación típica poblacional, CV: coeficiente de variación poblacional.

ANEXO II

Tabla 1. Cantidad media de compuestos totales, flavonoides totales y diterpenos totales (mg/g PS) en hojas maduras de las distintas poblaciones muestreadas en abril de 2010. DS: desviación estándar (mg/g PS). CV: coeficiente de variación (%).

	Compuestos totales			Flavonoides totales			Diterpenos totales		
	Media	DS	CV	Media	DS	CV	Media	DS	CV
Alburquerque	20.80	2.24	10.78	18.16	2.01	11.05	2.64	0.89	33.70
Azuaga	10.75	1.95	18.16	9.06	1.86	20.49	1.68	0.30	17.54
Cazalla	8.42	1.34	15.86	7.07	1.16	16.34	1.34	0.35	25.96
Destriana	28.16	3.72	13.20	26.14	3.30	12.61	2.02	0.63	31.41
El Cubo	17.72	5.48	30.93	15.90	4.98	31.32	1.82	0.50	27.56
Hervás	30.43	4.67	15.35	27.78	4.54	16.36	2.66	0.16	6.16
Hornachos	9.76	1.71	17.55	8.68	1.63	18.73	1.08	0.20	18.80
Huelva	12.94	6.44	49.81	10.55	6.15	58.25	2.67	0.54	20.05
La Nava	12.60	0.43	3.44	10.72	0.93	8.68	1.88	0.23	12.49
Monesterio	19.40	5.29	27.25	14.50	3.38	23.30	4.90	1.28	26.14
Ponferrada	15.88	7.23	45.54	14.39	6.44	44.76	1.49	0.38	25.38
Ricobayo	26.72	5.47	20.49	21.00	5.89	28.07	5.72	1.01	17.67
Robledillo	11.87	2.25	18.99	10.82	1.82	16.84	1.75	0.77	43.71

Tabla 2. Diferencias significativas (*, $p < 0.05$) en la cantidad total (mg/g PS) de flavonoides y diterpenos en las distintas poblaciones muestreadas en abril de 2010 de *C.ladanifer* (ANOVA)

	Hue	Alb	Ric	Caz	Nav	Azu	Rob	Mon	Her	Des	Hor	Pon	Cub
Hue													
Alb													
Ric				*									
Caz									*	*			
Nav													
Azu									*	*			
Rob									*	*			
Mon													
Her											*		
Des											*		
Hor													
Pon													
Cub													

Hue: Huelva; Alb: Alburquerque; Ric: Pantano de Ricobayo; Caz: Cazalla de la Sierra; Nav: Nava de la Concepción; Azu: Azuaga; Rob: Robledillo; Mon: Monesterio; Her: Hervás; Des: Destriana; Hor: Hornachos; Pon: Ponferrada; Cub: El Cubo de la Tierra del Vin

Tabla 3. Diferencias significativas (*, $p < 0.05$) en la cantidad (mg/g PS) total de flavonoides en las distintas poblaciones muestreadas en Abril de 2010 de *C.ladanifer* (ANOVA).

	Hue	Alb	Ric	Caz	Nav	Azu	Rob	Mon	Her	Des	Hor	Pon	Cub
Hue													
Alb													
Ric													
Caz									*	*			
Nav													
Azu									*	*			
Rob									*	*			
Mon													
Her											*		
Des											*		
Hor													
Pon													
Cub													

Hue: Huelva; Alb: Albuquerque; Ric: Pantano de Ricobayo; Caz: Cazalla de la Sierra; Nav: Nava de la Concepción; Azu: Azuaga; Rob: Robledillo; Mon: Monesterio; Her: Hervás; Des: Destriana; Hor: Hornachos; Pon: Ponferrada; Cub: El Cubo de la Tierra del Vin

Tabla 4. Diferencias significativas (*, $p < 0.05$) en la cantidad (mg/g ps) total de diterpenos en las distintas poblaciones muestreadas en Abril de 2010 de *C.ladanifer* (ANOVA)

	Hue	Alb	Ric	Caz	Nav	Azu	Rob	Mon	Her	Des	Hor	Pon	Cub
Hue			*										
Alb			*										
Ric				*	*	*	*		*	*	*	*	*
Caz								*					
Nav													
Azu								*					
Rob								*					
Mon										*	*	*	*
Her													
Des													
Hor													
Pon													
Cub													

Hue: Huelva; Alb: Alburquerque; Ric: Pantano de Ricobayo; Caz: Cazalla de la Sierra; Nav: Nava de la Concepción; Azu: Azuaga; Rob: Robledillo; Mon: Monesterio; Her: Hervás; Des: Destriana; Hor: Hornachos; Pon: Ponferrada; Cub: El Cubo de la Tierra del Vin