

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

Área de Ecología



INFLUENCIA DE LOS FACTORES CLIMÁTICOS EN LA
SÍNTESIS Y ACTIVIDAD DE COMPUESTOS FITOTÓXICOS
SECRETADOS POR *Cistus ladanifer*.L

Memoria presentada por **D. Juan Carlos Alías Gallego** para optar al grado de Doctor.

Badajoz, Septiembre de 2006

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

Caldereros 2. Planta 3^a
Cáceres 10071
Correo e.: publicac@unex.es
<http://www.unex.es/publicaciones>

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

CERTIFICAN:

Que la memoria con el título: “**Influencia de los factores climáticos en la síntesis y actividad de compuestos fitotóxicos secretados por *Cistus ladanifer* L.**”, ha sido realizada bajo su dirección por **Juan Carlos Alías Gallego**, en el Dpto. de Física (Área de Ecología) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura, y que, salvo mejor criterio del tribunal que ha de juzgarlo, reúne todas las condiciones para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste, firman la presente a 11 de Septiembre de 2006.

Fdo.: Natividad Chaves Lobón

Fdo.: José Carlos Escudero García

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, en mayor o menor medida, han contribuido a la realización de este trabajo.

A mis directores de tesis, los Dres. D. José Carlos Escudero García y Dña. Natividad Chaves Lobón. El primero por haberme permitido incorporarme en su equipo de investigación con total libertad y autonomía; y a Nati, por su trato cercano y sincero que me hizo sentir desde el primer momento como en casa.

A todos los compañeros y profesores del Área de Ecología, Dr. Teresa Buyolo, Dr. Daniel Patón y Dr. Encarnación García, por prestarse gentilmente a resolver cuantos problemas o dudas me surgieron en este tiempo. Una especial mención a los profesores, Dr. José Cabezas Fernández y Dr. José Martín Gallardo, por su ayuda inestimable en el manejo informático y elaboración final de este trabajo.

Un especial agradecimiento a mi querida compañera, la profesora Dr. Teresa Sosa Díaz, por soportarme todos los días y ayudarme siempre que lo necesité.

Agradecer a Dr. Francisco Antonio Macías, del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Cádiz, y a todo su equipo de investigación, el trato recibido y la colaboración prestada para la consecución de esta tesis.

A la Consejería de Infraestructuras y Desarrollo Tecnológico de la Junta de Extremadura, por concederme una beca de investigación para la Formación de Personal Investigador: FIC01A051.

Agradecer a todos los compañeros y amigos que, sin saber muy bien lo que he estado haciendo estos últimos años, me han ayudado y animado en los momentos difíciles.

Muy cariñosamente, a toda mi familia, pero en especial a mis padres por darme la vida y enseñarme que el amor es la única solución posible; a mi hermano, por ser mi referente ayudándome con su ejemplo a ser cada día mejor, y darme junto a Rosi el mejor sobrino del mundo.

Por último, a la "niña" que más quiero y más me quiere. Gracias Lourdes por compartir conmigo el último y mejor año de mi vida...y todos los que vendrán.

*"La ciencia se compone de errores,
que a su vez, son los pasos hacia la verdad."*

Julio Verne

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN..... 1

I.1.- Aspectos generales del metabolismo secundario en plantas..... 3

I.2.- Funciones ecológicas de metabolitos secundarios de plantas..... 11

I.3.- Alelopatía y compuestos del metabolismo secundario..... 13

 I.3.1.- Aspectos conceptuales..... 13

 I.3.2.- Aspectos metodológicos..... 19

 I.3.3.- Efectos en la planta receptora..... 22

 I.3.4.-Interacción de factores. 23

I.4.- Descripción general de *Cistus ladanifer* L. 27

 I.4.1.- Descripción morfológica. 27

 I.4.2.- Descripción ecológica. 28

 I.4.3.- Descripción fenológica..... 32

 I.4.4.- Exudado de *C. ladanifer* L.: antecedentes bibliográficos..... 33

II.- OBJETIVOS 35

II.1.- Justificación del trabajo..... 37

II.2.- Objetivos 41

III.- MATERIALES Y MÉTODOS..... 43

III.1.- Efecto de los parámetros físicos luz y temperatura en la actividad de compuestos fitotóxicos..... 45

III.1.1.- Selección de compuestos y preparación de las soluciones. 45

III.1.2.- Condiciones de los ensayos. 48

III.1.3.- Ensayos de germinación. 49

III.1.3.1.- Selección de semillas. 49

III.1.3.2.- Ensayos..... 49

III.1.3.3.- Parámetros medidos para cuantificar la fitotoxicidad de los compuestos. 49

III.2.- Identificación, comprobación de actividad potencial y cuantificación de diterpenos en *Cistus ladanifer* L. 51

III.2.1.- Identificación de compuestos..... 51

III.2.1.1.- Extracción del exudado. 51

III.2.1.2.- Aislamiento y pre-purificación de los compuestos. Técnicas preparativas.....	51
III.2.1.3.- Purificación de los compuestos. Técnicas analíticas.....	54
III.2.2.- Comprobación de la actividad.	56
III.2.2.1.- Bioensayo con coleoptilos etiolados de trigo.	56
III.2.2.2.- Bioensayos STS (Standard Target Species)	58
III.2.3.- Cuantificación de diterpenos en condiciones naturales	59
III.2.3.1.- Selección de los puntos de muestreo y recogida de muestras.	59
III.2.3.2.- Extracción de exudado	60
III.2.3.3.- Análisis del exudado. Cuantificación por HPLC. Recta patrón. ..	61
III.2.4.- Cuantificación bajo condiciones controladas: Experimentos en cámara de cultivo.	63
III.2.4.1.- Recolección de las plantas.....	63
III.2.4.2.- Condiciones de los ensayos.....	63
III.2.4.3.- Extracción de exudado	65
III.2.4.4.- Análisis del exudado. Cuantificación por HPLC.	65
III.3.- cuantificación de diterpenos y estudio de la actividad alelopática de <i>Cistus ladanifer</i> L. en un medio natural con condiciones climáticas diversas.....	67
III.3.1.- Selección de los puntos de muestreo.	67
III.3.2.- Recogida de muestras.	76
III.3.3.- Extracción del exudado y preparación de muestras.....	76

III.3.3.1.- Extracción del exudado	76
III.3.3.2.- Preparación de soluciones acuosas.....	78
III.3.3.3.- Preparación de sustratos	77
III.3.4.- Análisis de las muestras.....	77
III.3.5.- Ensayos de germinación.	78
III.3.5.1.- Ensayos de germinación en papel.	78
III.3.5.2.- Ensayos de germinación en suelos.	78
III.3.5.2.1.- Estudio del potencial alelopático de suelos asociados a <i>C. ladanifer</i>	78
III.3.5.2.2.- Estudio de la actividad alelopática de los extractos acuosos de hoja, hojarasca y suelo	79
III.4.- Parámetros medidos para cuantificar el efecto alelopático.	81
III.5.- Análisis de los datos.....	83
III.5.1.- Análisis estadístico en la cuantificación de diterpenos.....	83
III.5.2.- Análisis estadístico de los ensayos de germinación.....	83
IV.- RESULTADOS.....	85

IV.1.- Estudio del efecto individual y de interacción, de 11 compuestos fitotóxicos presentes en el exudado de <i>Cistus ladanifer</i> L., sobre la germinación y desarrollo de plántulas de <i>Rumex crispus</i> , bajo diferentes condiciones de luz y temperatura.	87
--	----

IV.1.1.- Actividad de compuestos fitotóxicos presentes en el exudado de <i>Cistus ladanifer</i> L., bajo diferentes condiciones de luz y temperatura	89
IV.1.1.1.- Efecto de los aleloquímicos en la germinación.....	89
IV.1.1.2.- Efecto de los aleloquímicos sobre el nacimiento de cotiledones. .	92
IV.1.1.3.- Efecto de los aleloquímicos sobre el tamaño de las raíces.....	94
IV.1.1.4.- Efecto de los aleloquímicos sobre el tamaño de los cotiledones..	96
IV.1.2.- Actividad derivada de la interacción de compuestos fitotóxicos presentes en el exudado de <i>Cistus ladanifer</i> L., bajo diferentes condiciones de luz y temperatura.....	99
IV.1.2.1.- Efecto de la interacción de los aleloquímicos sobre la germinación.	99
IV.1.2.2.- Efecto de la interacción de los aleloquímicos sobre el nacimiento de cotiledones	101
IV.1.2.3.- Efecto de la interacción de los aleloquímicos sobre la longitud de las raíces.	102
IV.1.2.4.- Efecto de la interacción de los aleloquímicos sobre la longitud de los cotiledones.	104
IV.2.- Identificación, comprobación de actividad potencial y cuantificación de diterpenos en <i>C. ladanifer</i> L.....	107
IV.2.1- Identificación de diterpenos en el exudado de <i>C. ladanifer</i> L.....	109
IV.2.2.- Actividad de los diterpenos identificados en el exudado de <i>C. ladanifer</i> L.	115
IV.2.2.1.- Actividad de diterpenos sobre coleoptilos etiolados de trigo.....	115
IV.2.2.2.- Actividad de diterpenos en bioensayos STS.	119
IV.2.2.2.1.- Efecto sobre la germinación	119

IV.2.2.2.2.- Efecto sobre la longitud de las raíces.....	125
IV.2.2.2.3- Efecto sobre la longitud de los cotiledones	131
IV.2.3.- Cuantificación de diterpenos en hojas, hojarasca y suelos de <i>C. ladanifer</i> L., a lo largo del año.....	137
IV.2.3.1.- Cuantificación de diterpenos en la estación de primavera.	137
IV.2.3.2.- Cuantificación de diterpenos en la estación de verano.....	139
IV.2.3.3.- Cuantificación de diterpenos en la estación de otoño.	141
IV.2.3.4.- Cuantificación de diterpenos en la estación de invierno.	143
IV.2.3.5.- Análisis estacional en muestras de hojas de jara.....	145
IV.2.3.6.- Análisis estacional en muestras de hojarasca de jara.	145
IV.2.3.7.- Análisis estacional en muestras de suelos de jara.	146
IV.2.4.- Cuantificación de diterpenos del exudado de <i>C. ladanifer</i> L. bajo condiciones controladas. Efecto de la temperatura y estrés hídrico.....	149
IV.3.- Estudio del comportamiento alelopático, dependiente de las condiciones climáticas, de ocho poblaciones de <i>C. ladanifer</i> L., distribuidas en la provincia de Badajoz.	155
IV.3.1.- Actividad alelopática de suelos de jarales procedentes de ocho poblaciones con características climáticas diferentes.	157
IV.3.1.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de <i>R. crispus</i> en la estación de otoño.....	157
IV.3.1.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de <i>R. crispus</i> en la estación de invierno.	158
IV.3.1.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de <i>R. crispus</i> en la estación de primavera.....	159

IV.3.2.- Actividad alelopática de las soluciones acuosas de hoja, hojarasca y suelo procedentes de ocho poblaciones con características climáticas diferentes.....	161
IV.3.2.1.- Efecto alelopático de soluciones acuosas de hojas de <i>C. ladanifer</i> en semillas de <i>R. crispus</i>	161
IV.3.2.1.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de <i>R. crispus</i> en la estación de otoño.....	161
IV.3.2.1.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de <i>R. crispus</i> en la estación de invierno.	162
IV.3.2.1.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de <i>R. crispus</i> en la estación de primavera.....	163
IV.3.2.2.- Efecto alelopático de soluciones acuosas de hojarasca de <i>C. ladanifer</i> en semillas de <i>R. crispus</i>	165
IV.3.2.2.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de <i>R. crispus</i> en la estación de otoño.....	165
IV.3.2.2.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de <i>R. crispus</i> en la estación de invierno.	166
IV.3.2.2.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de <i>R. crispus</i> en la estación de primavera.....	167
IV.3.2.3.- Efecto alelopático de soluciones acuosas de suelos de <i>C. ladanifer</i> en semillas de <i>R. crispus</i>	168

IV.3.2.3.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de <i>R. crispus</i> en la estación de otoño.....	168
IV.3.2.3.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de <i>R. crispus</i> en la estación de invierno.....	169
IV.3.2.3.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de <i>R. crispus</i> en la estación de primavera.....	170
IV.4.-Estudio del comportamiento alelopático, dependiente de las condiciones climáticas de doce poblaciones de <i>C. ladanifer</i> , distribuidas norte-sur de la Península Ibérica.	173
IV.4.1.- Cuantificación de los diterpenos presentes en las muestras de hoja y hojarasca procedentes de las doce poblaciones.....	175
IV.4.1.1.- Cuantificación de compuestos en la estación de primavera.	175
IV.4.1.2.- Cuantificación de compuestos en la estación de verano.	178
IV.4.1.3.- Cuantificación de compuestos en la estación de otoño.	180
IV.4.1.4.- Cuantificación de compuestos en la estación de invierno.....	183
IV.4.1.5.- Cuantificación anual de compuestos por localidades.....	185
IV.4.1.6.- Análisis estacional en muestras de hojas de jara.....	187
IV.4.1.7.- Análisis estacional en muestras de hojarasca de jara.	188
IV.4.2.- Análisis de la actividad alelopática de los suelos de jarales procedentes de las doce poblaciones.	191
IV.4.2.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de primavera.	191

IV.4.2.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de verano. ..	193
IV.4.2.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de otoño.	194
IV.4.2.4.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de invierno.	195
IV.4.2.5.- Análisis estacional de la actividad alelopática de los suelos de jarales procedentes de doce poblaciones con características climáticas diferentes.	196
IV.4.3.- Actividad alelopática de soluciones acuosas de hojas y hojarasca procedentes de doce poblaciones.	199
IV.4.3.1- Efecto alelopático de soluciones acuosas de hojas de <i>C. ladanifer</i> en semillas de <i>R. crispus</i> sembradas en papel.	199
IV.4.3.1.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de primavera.	199
IV.4.3.1.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de verano.	201
IV.4.3.1.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de otoño.	203
IV.4.3.1.4.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de invierno.	204

IV.4.3.1.5.- Efecto alelopático estacional de soluciones acuosas de hoja de <i>C. ladanifer</i> en semillas de <i>R. crispus</i> sembradas en papel .	205
IV.4.3.2.- Efecto alelopático de soluciones acuosas de hojarasca de <i>C. ladanifer</i> en semillas de <i>R. crispus</i> sembradas sobre papel.....	208
IV.4.3.2.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de primavera.....	208
IV.4.3.2.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de verano.	209
IV.4.3.2.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de otoño.....	211
IV.4.3.2.4.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de invierno.....	212
IV.4.3.2.5- Efecto alelopático estacional de soluciones acuosas de hojarasca de <i>C. ladanifer</i> en semillas de <i>R. crispus</i> sembradas en papel.....	214
IV.4.3.3.- Efecto alelopático de soluciones acuosas de hoja de <i>C. ladanifer</i> en semillas de <i>R. crispus</i> sembradas en suelos.....	216
IV.4.3.3.1- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de primavera.....	217

IV.4.3.3.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de verano.	218
IV.4.3.3.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de otoño.	219
IV.4.3.3.4.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de invierno.	220
IV.4.3.3.5.- Efecto alelopático estacional de soluciones acuosas de hoja de <i>C. ladanifer</i> en semillas de <i>R. crispus</i> sembradas sobre suelo control.	221
IV.4.3.4.- Efecto alelopático de soluciones acuosas de hojarasca de <i>C. ladanifer</i> en semillas de <i>R. crispus</i>	223
IV.4.3.4.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de primavera.	223
IV.4.3.4.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de verano.	224
IV.4.3.4.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de otoño.	226
IV.4.3.4.4.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de <i>R. crispus</i> en la estación de invierno.	227

IV.4.3.4.5.- Efecto alelopático estacional de soluciones acuosas de hojarasca de <i>C. ladanifer</i> en semillas de <i>R. crispus</i> sembradas sobre suelo control.	228
V.- DISCUSIÓN	231
VI.- CONCLUSIONES	257
VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	263

I.- Introducción

I.1.- ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN PLANTAS.

Los metabolitos primarios son compuestos esenciales para la vida como intermediarios de las rutas bioquímicas, compuestos estructurales de membranas, pigmentos captadores de luz, etc. Además, son identificados en todos los organismos y difieren poco estructuralmente entre unos organismos y otros, presentando funciones universales de tipo enzimático, estructural y de transmisión del material hereditario.

Además de estos compuestos, las plantas producen una amplia variedad de metabolitos secundarios. El término de “metabolismo secundario” fue introducido en 1891 por Kossel (citado en Baas, 1989): “Mientras que los metabolitos primarios están presentes en cada célula de la planta que es capaz de reproducirse, los metabolitos secundarios están presentes sólo accidentalmente y no son imprescindibles para la vida”.

En la práctica, no está clara la diferencia entre metabolitos primarios y secundarios, ya que los primeros se considera que se sintetizan en procesos metabólicos primarios como son la respiración (glicolisis del ciclo de krebs o en el ciclo del ácido cítrico) y la fotosíntesis con sus rutas derivadas; y los metabolitos secundarios son sintetizados en rutas biosintéticas claramente derivadas del metabolismo primario. Muchas de las hormonas vegetales como son las giberelinas, auxinas, etileno, kinetinas, ác. ascórbico, y compuestos estructurales de las paredes celulares como el ácido cinámico, ligninas o derivados poliméricos, son intermediarios entre el metabolismo primario y el secundario (Haslam, 1986).

Muchos de estos compuestos pueden acumularse en gran cantidad, encontrándose normalmente asociados con metabolitos primarios. Por tanto, la cantidad de compuestos

secundarios encontrados en las plantas es el resultado de un equilibrio entre síntesis-almacenamiento-degradación. De los considerados metabolitos secundarios, se conocían más de 20.000 en los años ochenta, describiéndose cada año cerca de 1000 nuevos compuestos (Hartmann, 1985). Otros investigadores van más allá, y sólo en el grupo de los terpenos consideran más de 14.000 moléculas diferentes (Gershenzo y Croteau, 1992). Además, la regulación del metabolismo secundario es compleja ya que está estrechamente relacionada con el estado de desarrollo del organismo, con cambios morfológicos y citológicos del mismo, y con otros factores derivados del entorno (Haslam, 1986; Esseberg, 2001).

El origen evolutivo de los compuestos secundarios de todos los organismos está basado en cambios o mutaciones del material genético originalmente asociado a rutas del metabolismo primario. Aunque el proceso probablemente no es completamente aleatorio, los cambios producidos en el ADN-ARN responsables de la formación de compuestos secundarios particulares son accidentales. La mayoría de los productos de estas rutas alteradas son eliminados, y los genes que los producen son rápidamente corregidos por la selección natural, aunque los cambios en las rutas metabólicas secundarias y los compuestos resultantes, generalmente son más tolerados que los producidos en las rutas primarias.

En los organismos procariotas, los cuales tienen un metabolismo bastante básico (respiración y síntesis) basado en una única copia de genes, la mayoría de las mutaciones son probablemente letales, pero si se produce alguna ventaja selectiva son mantenidas. En contraste, existe una gran cantidad de material genético en plantas y otros eucariotas. Esto hace que se organice este material en cromosomas, existiendo generalmente dos copias (diploide) del mismo dependiendo del estado del organismo. La acumulación de caracteres recesivos es posible, y en muchos casos no son expresados inmediatamente, acumulándose variaciones genéticas (alelos). Si un metabolito particular es tolerado y confiere una ventaja positiva para el organismo bajo ciertas circunstancias, éste se sintetizará y se acumulará (Theis y Lerchau, 2003). Aunque los mecanismos implicados en esta selección natural son muchos y mal entendidos, dos elementos deben estar presentes; un material inicial preexistente y la influencia sobre estos de algún evento estocástico (Seigler, 1998).

Existen varias hipótesis que argumentan el origen y la acumulación de estos compuestos:

“Productos de desecho”

Mothes (1966) define a los metabolitos secundarios como “productos de desecho”. Compuestos del metabolismo primario producidos por “error”, que no son esenciales para la existencia de las planta y que su síntesis y su presencia es individual y por tanto, no confieren una característica taxonómica inherente.

Investigaciones posteriores (Tukey, 1970; Haslam, 1986; Williams y Stones, 1989; Hrazdina y Jensen, 1992) sugieren que esta teoría no explica el origen de los metabolitos secundarios ya que la síntesis de estos compuestos requiere muchas kilobases de ADN, y por tanto, es un proceso altamente ordenado que requiere de energía. Si los metabolitos fueran productos de desecho, las plantas que los tuvieran tendrían una desventaja considerable respecto a las que no, y por tanto serían eliminados por el proceso de selección natural.

Otros, sugieren que los metabolitos secundarios juegan un papel metabólico muy importante en los organismos que los producen. De tal manera que muchos de estos compuestos son intermediarios entre el metabolismo primario y el secundario, estando a menudo asociados al desarrollo de las plantas como en el caso de las hormonas vegetales. También pueden actuar como reserva de energía, precursores de compuestos orgánicos o fuentes de N (Rosenthal, 1982).

Los metabolitos secundarios presentarían diferente solubilidad y propiedades físicas que sus precursores primarios, de tal manera que también podrían estar implicados en mecanismos de transporte y acumulación en plantas (Wink, 1987,1999).

“Balance carbono-energía”

El carbono generalmente no es limitante en la biosíntesis de las plantas, y la formación de compuestos basados en el carbono podría jugar un papel beneficioso en plantas bajo altas condiciones lumínicas, ayudando así a dispersar el exceso de energía asociada a la fotosíntesis (Selmar, 1992). Pero existen otros elementos que si son limitantes como el nitrógeno y que implican un alto coste en la producción de metabolitos. Existen teorías que relacionan este coste en la producción de compuestos secundarios con funciones de defensa de la planta, ya que muchos de estos compuestos con características cualitativas o de movilidad presentan nitrógeno, mientras que la mayoría de las moléculas cuantitativas o inmóviles no lo presentan (Feeny, 1990).

Sin embargo, en la práctica, las plantas están sujetas a una variedad de restricciones fisiológicas que varían con la disponibilidad de recursos y el coste relativo de los diferentes tipos de compuestos. De tal manera que las plantas adaptadas a condiciones de alta intensidad lumínica y habitats pobres en nutrientes, tienen un excedente relativo de carbono y utilizan moléculas basadas en este elemento.

Del mismo modo, las plantas que ocupan habitats desfavorables y son limitantes en su productividad, no pueden crecer rápidamente, por tanto deben adquirir estrategias de defensa frente a sus competidores y herbívoros.

Hipótesis del “Fitness”

La hipótesis del “fitness”, sugerida principalmente por ecólogos, descansa en la idea de que los metabolitos secundarios aumentan la “buena forma” de los individuos que los poseen, siendo estos individuos favorecidos por la selección natural (Harborne, 1986).

De la gran cantidad de compuestos existentes en las plantas, no todos serían en un principio beneficiosos, aunque se ha sugerido que la retención de compuestos inactivos es una manera de incrementar la diversidad química y la probabilidad de producir compuestos activos contra otros organismos. Por tanto, estos productos aumentarían las probabilidades de supervivencia en ausencia de un sistema inmune (Jones y Firn, 1991). Para que estos metabolitos sean seleccionados evolutivamente deben tener un coste de producción suficientemente bajo para que sea rentable su síntesis.

En este sentido, el coste en la producción de metabolitos secundarios es difícil de estimar, como pone de manifiesto la variación encontrada en las publicaciones que existen al respecto; hay autores que lo estiman entre un 8-10% del coste energético total (Robinson, 1980), y otros consideran el coste cero (Simms y Rausher, 1987).

Hipótesis del “rebosadero”

Otra hipótesis es la denominada del “rebosadero” o exceso de metabolitos primarios. Cuando se produce un desequilibrio en el crecimiento, una de las maneras de evitar un aumento anormal en la concentración de constituyentes celulares sería sintetizar enzimas designadas a llevar a cabo el metabolismo secundario.

Se permitiría a las enzimas del metabolismo primario continuar la función una vez las circunstancias vuelvan a ser propicias para reanudar la actividad metabólica de crecimiento.

*La confirmación de este balance carbono/nutrientes, ha sido encontrada en especies que se desarrollan en medios con baja disponibilidad de nutrientes y agua, produciéndose un aumento en la concentración de taninos, lignina y fenoles (Bryant y col., 1983; Gershenzon, 1984; Waring y col., 1985; Nicolai, 1988). Por contra, investigaciones recientes muestran que estos metabolitos secundarios se encuentran incluso en plantas acuáticas como *Ceratophyllum demersum*, donde se han encontrado flavonoides glicósidos (Bankova y col., 1995).*

En algunas plantas, cerca del 38% del carbono fijado por la fotosíntesis es luego eliminado en forma de CO₂ mediante la fotorespiración, siendo este un claro mecanismo de liberación o “rebosadero” de C (Waterman y Mole, 1989). Aunque esta teoría pueda ser válida en algunas circunstancias, no explicaría la gran cantidad de compuestos conocidos (Williams y Stone, 1989).

En resumen, ninguna hipótesis de las comentadas anteriormente explica completamente el origen de los metabolitos secundarios, y por el contrario, encontramos casos que pueden ser explicados por más de una teoría, lo que convierte a este asunto en un verdadero enigma.

Un número considerable de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas están involucrados en la interacción con otros organismos, desempeñando una gran variedad de funciones. En presencia de la presión selectiva que ejercen otros organismos y el medio ambiente en general sobre las plantas, la ausencia de diferentes fenotipos implicaría una posible reducción de la población. Si la presión fuera suficiente y se mantuviera en el tiempo, esa población podría desaparecer. Gracias a la variabilidad fenotípica de las plantas, este hecho raramente se da de forma natural entre organismos, no así ante la presión física. Si una planta con un cierto fenotipo es evitada en el caso de un herbívoro, se producirá un cambio hacia ese fenotipo en la población, y a su vez, en la población de herbívoros se seleccionaría el fenotipo que sea capaz de utilizar mejor a la planta. A este fenómeno se le conoce como coevolución (Berenbaum, 1983; Futuyma y Keese, 1992). Este tipo de interacción probablemente ha sido muy común en el curso de la evolución, ya que todos los organismos han evolucionado en presencia de otros. Por tanto, la presencia de gran cantidad de metabolitos secundarios en las plantas podría ser respuesta a la presión de otros organismos y a la presión del medio ambiente en general (Theis y Lerdau, 2003).

En este escenario, cambios o modificaciones en las rutas biosintéticas básicas de los metabolitos son frecuentes, produciéndose nuevos metabolitos secundarios. Un organismo evolutivamente más avanzado presentará unos metabolitos secundarios más complejos y más alterados respecto a la estructura de los precursores. El análisis de estas relaciones químicas ayuda a los científicos a establecer relaciones evolutivas, y es una herramienta muy potente en los estudios taxonómicos y filogenéticos entre las plantas (Sumner y col., 2003).

Independientemente de las hipótesis que se plantean, los metabolitos secundarios no son producidos al azar, ya que han sido modelados y optimizados durante la evolución (Jarvis, 2000). Muchos son utilizados por el hombre como fármacos, especias, fragancias,

pesticidas, venenos, alucinógenos, estimulantes, colorantes, etc. Además su estudio ha implicado a ramas de la ciencia tan dispares como la ecología, química orgánica, bioquímica, zoología, botánica, sistemática, micología, fisiología, ciencia evolutiva, agronomía, antropología e incluso arqueología (Seigler, 1998).

I.2.- FUNCIONES ECOLÓGICAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS.

Los compuestos del metabolismo secundario pueden desempeñar una amplia variedad de funciones ecológicas, tales como: alelopatía, disuasorio de herbívoros, atracción de polinizadores (Chou y Kou, 1986; Harborne, 1988; Baas, 1989), o proteger a la planta de 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).

Muchas de estas moléculas se ha demostrado que pueden inhibir el desarrollo de insectos (Stamp y col., 1997; Zhang y col., 1999), nemátodos (Blum, 1996), e incluso hongos (Oliva y col., 1999). También pueden estar involucrados 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., 1991). Y también encontramos flavonoides con capacidad antibacteriana (Grayer y Harborne, 1994).

Muchos pueden ser secretados dentro de las células, en vacuolas, o excretados extracelularmente como resinas o material de la pared celular. 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).

Todos estos estudios demuestran que los compuestos derivados del metabolismo secundario de plantas pueden ser de gran importancia para proteger a la planta del ataque de microorganismos, animales, o para aumentar la capacidad de una especie para competir con otras en un hábitat dado (Bell, 1980)

En *Cistus ladanifer* L., una de las funciones que pueden desempeñar concretamente los flavonoides del exudado en la hoja, es la de actuar como filtro de luz ultravioleta para evitar los daños celulares que causa esta radiación. También puede actuar como agentes tóxicos para la protección contra herbívoros, evitan ataques de patógenos y como agente antioxidante (Wittstock y Gershenzon, 2002; Sosa y col., 2004).

Por otra parte, al igual que otros constituyentes del exudado de *C. ladanifer*, los flavonoides pueden actuar como agentes alelopáticos, inhibiendo la germinación y desarrollo de las plántulas herbáceas que compiten con ella 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; Chaves y col., 2001 a y b). Cuando la especie donadora y receptora de los compuestos fitotóxicos es la misma, estamos ante un caso especial de alelopatía llamado “Autotoxicidad”. Una de las posibles funciones o implicaciones de este fenómeno es el control poblacional de la propia especie. Se ha observado en campo, que la colonización del espacio contiguo a un jaral es rápida, debido posiblemente al gran número de semillas que produce esta especie a pesar de la baja capacidad de germinación de las mismas en condiciones naturales. Sin embargo, en el núcleo de un jaral desarrollado, el establecimiento de nuevas plantas es nulo. Ante este hecho, cabría pensar la posibilidad de que, entre otros fenómenos (competencia), exista un mecanismo autotóxico de autocontrol poblacional que impida la germinación y desarrollo de nuevos individuos dentro del jaral. Se ha demostrado que el exudado de *C. ladanifer* inhibe su propia germinación y desarrollo, pudiendo esta especie controlar su propia regeneración en el medio natural (Alfás y col., 2006).

I.3.- ALELOPATÍA Y COMPUESTOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO.

I.3.1.- Aspectos Conceptuales.

El término alelopatía proviene del griego *allon* = uno al otro, *pathos* = sufrir; efecto injurioso de uno sobre otro. Desde muy antiguo se han observado y citado casos de efectos perjudiciales de unas plantas sobre otras. Ya Plinio, en el año 1 a.D., observó que...

“El garbanzo y la cebada abrasan la tierra de pan llevar”.

También escribió sobre la sombra del nogal que...

“La sombra del nogal es densa y causa dolor de cabeza en el hombre y daño a cualquier cosa plantada en su vecindad”.

Ya en aquella época, Plinio era consciente de la liberación de sustancias por plantas al escribir:

“La naturaleza de algunas plantas, a pesar de no ser exactamente mortal, es nociva debido a su mezcla de fragancias o a sus jugos...por ejemplo, el laurel es dañino para la vid; puede inferirse que la vid posee un sentido del olfato y es afectada por las fragancias en un sentido prodigioso...”.

Pero fue en los inicios del siglo XX cuando se comienza a estudiar este fenómeno y a realizarse experimentos científicos en esta materia. No sería hasta 1937 cuando el fisiólogo austriaco Hans Molisch diera el nombre formal de **Alelopatía** a los efectos perjudiciales o beneficiosos que de forma directa o indirecta producen ciertos compuestos químicos liberados por una planta sobre otra (Molisch, 1937).

Una definición clásica de alelopatía es la dada por Rice, 1984:

“Es la interacción química planta-planta, incluyendo dentro del término planta a los microorganismos y dentro del término interacción tanto efecto estimulador como inhibidor”.

Con la intención de unificar criterios, la Sociedad Internacional de Alelopatía (IAS), en su primer congreso celebrado en Cádiz en 1996, la define como:

“La ciencia que estudia cualquier proceso que implique metabolitos, principalmente secundarios y producidos por plantas, algas, bacterias y hongos que influyan en el crecimiento y desarrollo de sistemas cultivados y biológicos”.

Pero la definición de la alelopatía ha creado y crea una gran controversia debido a la dificultad de establecer sus límites dentro de la complejidad de las interacciones naturales. Por tanto, el desafío es separar el efecto alelopático de otros procesos en condiciones naturales. En este sentido, la interacción entre los organismos, y concretamente entre las plantas, es bastante compleja y juega un papel central en la evolución y distribución de las mismas (Callaway, 1995; Gniazdowska y Bogatek, 2005).

Uno de estos mecanismos difíciles de separar de la alelopatía es la competencia, aunque son términos conceptualmente diferentes. La competencia se podría definir como la interacción negativa entre individuos producida por la necesidad de compartir un recurso limitado. Esto conduciría a la reducción del número de individuos supervivientes o a la limitación del crecimiento (Begon y col., 1990). Por tanto, si los recursos fuesen ilimitados,

no existiría competencia. Sin embargo, la alelopatía está basada en la interacción entre individuos mediante la secreción de compuestos químicos. En la competencia, el mediador en la interacción es un recurso limitado, mientras que en la alelopatía el mediador es un compuesto químico producido por una planta donadora a una receptora. Por tanto, la competencia como tal, es un fenómeno independiente de la alelopatía, aunque difícil de diferenciar en condiciones naturales ya que sus efectos son similares (cuando hablamos de un efecto alelopático pernicioso para una de ellas).

Sucede en muchos casos que en el medio natural, los dos fenómenos están estrechamente relacionados debido a los factores de estrés que sufre la planta, entre ellos la competencia (Mallik, 2002), y que desencadena la síntesis de aleloquímicos. Dado que es el estrés el factor determinante en la síntesis de estos compuestos, sería conveniente hacer la siguiente reflexión respecto a este concepto.

En general, las plantas viven dentro de unas condiciones óptimas para desarrollarse (de forma continua o durante algunas partes de su ciclo de vida). Por tanto, tradicionalmente se ha dicho que una planta está estresada cuando se produce alguna reducción en alguna función fisiológica, ya sea absorción de agua o nutrientes, fotosíntesis, respiración, crecimiento, desarrollo, reproducción, etc., por debajo del rango máximo posible atendiendo a las condiciones óptimas y no al potencial genotípico (Lambers y col., 1998). Existen factores ambientales que pueden limitar el crecimiento o desarrollo y por tanto producen estrés en la planta. Levitt (1980) propuso una clasificación de estos factores entre bióticos y abióticos (Tabla 1), pero otros autores han encontrado ciertos errores y gran controversia en estos términos (Salisbury y Ross, 1994).

Tabla 1. Factores de origen natural y relacionados con la actividad humana que pueden producir estrés en plantas terrestres. Lichtenthaler (1996) y Reigosa y col. (1999)

Factores de Estrés		
Factores Medioambientales		Factores de Origen Humano
Factores Abióticos	Factores Bióticos	
<p>Temperatura Baja temperatura Alta temperatura Duración extrema</p> <p>Agua Déficit hídrico Exceso de humedad</p> <p>Radiación Infrarojo Visible (fotoinhibición, fotooxidación) UV-A, UV-B Iónica</p> <p>Química Iones Sales Exceso/deficit mineral pH inadecuado Ozono, exceso de oxígeno</p> <p>Otros Viento Presion Sonido Campo magnético Campo eléctrico Etc.</p>	<p>Patógenos Virus Hongos Bacterias</p> <p>Animales Fitofagia Efecto de insectos Efecto mecánico</p> <p>Otras Plantas Parasitismo Alelopatía Competencia</p>	<p>Herbicidas Fungicidas Pesticidas Contaminación Ozono Lluvia ácida Suelos ácidos Déficit mineral causado por pérdida de suelo o lluvia ácida Metales pesados Exceso de nitrógeno Eutrofización Incremento en la salinidad del suelo Cambio climático global Compactación del suelo Ruidos Fuegos Etc.</p>

Con el fin de unificar criterios en torno a este concepto, se han descrito dos objetivos. El primero sería distinguir entre acomodación de las plantas a pequeñas fluctuaciones del medio y las respuestas de plasticidad o adaptación al estrés. Y el segundo sería establecer una clara distinción entre factores de estrés y la respuesta a ese estrés (entre los efectos y las restricciones inducidas por las condiciones de estrés de la planta).

Se podría definir al estrés como un estado en el cual las demandas de crecimiento desestabilizan el correcto funcionamiento de la planta, seguido por una fase de normalización y de resistencia. Si la planta es forzada a vivir fuera de estos límites de tolerancia, y su capacidad de aclimatación es sobrepasada, el resultado es una demanda crónica e incluso la muerte.

Por lo tanto, el fenómeno del estrés es un proceso dinámico que se desarrolla en distintas fases (Figura 1). La primera es previa al factor estresante e incluye las variaciones medioambientales, las cuales no se consideraría estrés como tal. Cuando se produce el estrés como tal existe una respuesta más o menos rápida. Después de esto, si el estrés continúa activo, se produce el proceso de aclimatación, el cual tiene una base genética ya que implica a varios posibles fenotipos en los procesos fisiológicos, algunos de los cuales solamente son funcionales bajo situaciones de estrés. Si los factores de estrés siguen activos, el proceso de aclimatación pasa a ser de adaptación, favoreciéndose el cambio en la composición genética de las poblaciones (Lambers y col., 1998).

El efecto ante los factores de estrés no sólo depende de la intensidad y del tiempo de exposición del mismo, sino también de la especie, variedad e incluso del individuo, así como de las condiciones de vida previas (Lichthenthaler, 1996).

Agentes estresantes diferentes producen respuestas similares en las plantas. Este fenómeno viene definiéndose como co-estrés o síndrome de adaptación general (GAS). De tal manera que la resistencia a algunos tipos de estrés significaría una co-resistencia a otros factores de estrés (Lichthenthaler, 1998; Prasad y Rengel, 1998; Leshem y col., 1998). En este sentido, el impacto de un estrés combinado es muy difícil de predecir (Chapin y col.,

1997), ya que la acción de un tipo de estrés puede hacer a la planta más sensible a otros tipos o en otros casos aumentar la tolerancia a diferentes factores.

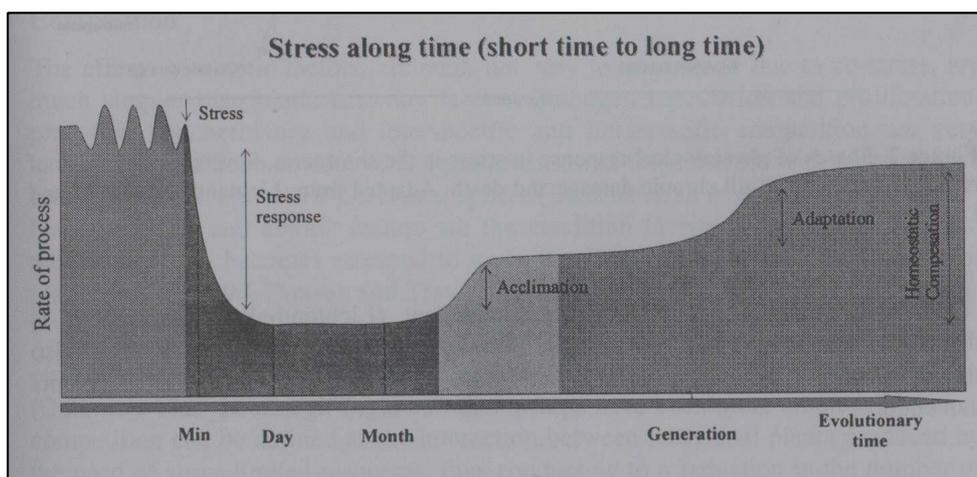


Figura 1: Fases de la respuesta a factores de estrés en un periodo de tiempo largo. (Lambers y col., 1998)

Existen varias respuestas ante el estrés consideradas comunes en las plantas, como pueden ser: efecto antioxidante para prevenir daños inducidos por reactivos oxigenados, síntesis de jasmonato, síntesis de proteínas de estrés, síntesis de fenoles y flavonoides en defensa a ataques, contra competidores o para proteger a la planta de condiciones ambientales extremas, etc.

Los metabolitos implicados en alelopatía pueden ser sintetizados por la planta desde el inicio de su crecimiento y desarrollo (constitutivos) o por una estimulación exógena (inducidos) (Agrawal y col., 1999). Todos estos compuestos incrementan su concentración cuando la planta está sometida a estrés. Por ejemplo, daños físicos en la planta normalmente inducen la producción de compuestos volátiles que provocan la respuesta de defensa (Takabayashi y Dicke, 1996). Otros factores citados que producen estrés en la planta son los

metales pesados (Sutfeld y col., 1996), la radiación UV (Zobel y col., 1999), incluso la aplicación de herbicidas (Inderjit y Mallik, 1996), o el mismo estrés medioambiental, pudiendo producir diferentes efectos en la producción de aleloquímicos (Thomas y Schafellner, 1999; Barazani y Friezman, 2000; Kobayashi, 2004).

I.3.2.- Aspectos Metodológicos.

A lo largo de la historia del conocimiento de la alelopatía, este fenómeno siempre se ha considerado del tipo “donador-receptor”, en el que una planta producía compuestos químicos que afectaban al crecimiento de una planta vecina. Este hecho ha sido considerado principalmente en agricultura. La idea de la alelopatía como un fenómeno ecológico que puede determinar la estructura de las comunidades vegetales es bastante reciente. Hasta los años 60-70 no se encuentran estudios que muestran la influencia de plantas sobre comunidades vecinas ya sea de forma directa, o indirectamente afectando a la rizosfera (Muller, 1969; Rice, 1965; Whittaker y Feeny, 1970). Se creó una corriente escéptica entorno a este fenómeno encabezada por J.L. Harper el cual, no negando el fenómeno, concluía en la imposibilidad de probarlo (Harper, 1975). En las últimas cuatro décadas, estas consideraciones han sido superadas y archivadas gracias a la experimentación creativa y al uso de técnicas analíticas avanzadas (Bais y col., 2003; Vivanco y col., 2004).

En un principio, los trabajos estaban dirigidos a la detección y el estudio de los aleloquímicos liberados por la planta donadora y el efecto en la receptora. Se ha demostrado que los extractos acuosos obtenidos de plantas como *Polygonum orientale*, *Erica vagans*, *Calluna vulgaris*, *Daboecia cantabrica*, *Vaccinium myrtillus*, *Pinus densiflora*, *Pilocarpus goudotianus* y *Echinacea angustifolia*, ricos en compuestos fenólicos, producen inhibición en la germinación de semillas y de cotiledones de diferentes especies de plantas ensayadas

(Datta y Chatterjee, 1980; Ballester y col., 1982; Jäderlund y col., 1996; Viles y Reese, 1996).

Estos compuestos son secretados por una planta y liberados al medio mediante volatilización, descomposición de residuos o secreción por diferentes partes de la planta como hojas, tallos, raíces y flores, pudiendo interactuar con otra planta o microorganismo y/o con los componentes bióticos y abióticos del sustrato, produciendo un efecto positivo o negativo sobre ella (Putnam y Tang, 1986; Inderjit y Dakshini, 1996). Metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, terpenoides, alcaloides, poliacetilenos y esteroides pueden actuar como aleloquímicos (Rice, 1984; Waller, 1987; Inderjit y Dakshini, 1995), sin embargo, su mera presencia no establece comportamiento alelopático (Putnam y Tang, 1986; Heisey, 1990).

El fenómeno en su conjunto es mucho más complejo, quedando muchos aspectos en el aire. Para demostrar el grado de participación de estos compuestos, no sólo es importante establecer la relación directa o indirecta entre la planta y los compuestos derivados que encontramos en el medio (Ryan y col., 2001; Belz y Hurle, 2005), sino también conocer las cantidades presentes, el tiempo de persistencia en el suelo necesarios para afectar a otros organismos (Putnam y Tang, 1986), las transformaciones que se producen en los compuestos durante su camino hacia la planta receptora y la influencia de las condiciones ambientales en todo el proceso (An, 2001).

Otro aspecto importante dentro del fenómeno global es el estudio de la actividad de los compuestos en relación a su estructura molecular (Macías y col., 2005). En este sentido, se han optimizado en los últimos años metodologías que permiten hacer esa relación con garantías (Navarez y Olofsdotter, 1996; Wu y col., 2001; Rimando y col., 2001), e incluso su extrapolación al medio natural aunque con reservas (Inderjit y Weston, 2000; Inderjit y Weiner, 2001).

Si analizamos las tendencias metodológicas de los trabajos relacionados con la investigación alelopática en los últimos años, nos encontramos con que el 76% de estos trabajos son ensayos en sistemas de cultivo, mientras que la dinámica de ecosistemas se conforma con el resto (18% estudio de especies terrestres; 5% especies acuáticas) Desde otro punto de vista, el 70% del total de trabajos describen únicamente ensayos de laboratorio que intentan demostrar un hipotético efecto alelopático, y sólo el 17% conjugan ensayos de laboratorio con experiencias en campo (Carral, 2002).

Aun hoy, la mayoría de los trabajos se siguen centrando en el aislamiento de compuestos y comprobación de su actividad biológica, dejando a un lado el estudio de la esencia del fenómeno alelopático debido a la complejidad de separarlo de otros procesos ecológicos.

A esto hay que sumarle la dificultad intrínseca en la verificación de la alelopatía partiendo de sus tres rasgos definitorios:

- Liberación de compuestos al medio.
- Absorción por parte del organismo receptor.
- Alteración en el desarrollo del organismo.

La existencia de los tres requisitos ha podido ser demostrada en el laboratorio (Oliveros, 2006) y también en el medio natural, mediante la comprobación de la modificación en la estructura de las comunidades (Bais y col., 2003), consolidando así el establecimiento de la disciplina.

No hay que olvidar que el éxito proviene y vendrá de la cautela en el diseño metodológico e interpretación de los resultados (Inderjit y Callaway, 2003) y en la colaboración estrecha por parte de biólogos moleculares, bioquímicos, ecofisiólogos, microbiólogos, agrónomos, ecólogos, etc. (Mallik, 2002).

I.3.3.- Efectos en la planta receptora.

Los compuestos aleloquímicos producen multitud de efectos en las plantas y muchos de estos fenómenos han sido estudiados: germinación de semillas y crecimiento (Elakovich y Yang, 1996; Chiapusio y col., 1997), fotosíntesis (Achnine y col., 1998; Roschina, 2001), respiración (Calera y col., 1995; Abraham y col., 2000), inhibición en el flujo de electrones (González y col., 1997), abscisión y senescencia (Miyamoto y col., 1997), ciclo celular (Romagni y col., 2000), permeabilidad de la membrana (Politika, 1997; Roschina, 2001), función ATPasa (Friebe y col., 1997; Sosa y col., 2004), efecto en el material genético (Baziramakenga y col., 1997), transpiración (Jose y Gillespie, 1998), actividad enzimática (Politika, 1998) y disponibilidad iónica (Inderjit y Nishimura, 1999).

Se ha demostrado que los flavonoides pueden interferir en la formación de adenosín trifosfato (ATP) en la mitocondria (Stenlid, 1970, 1976) y pueden inhibir o interaccionar con el modo de acción de las hormonas de otras plantas como las auxinas (Jacobs y Rubery, 1988; Brunn y col., 1992). Por otra parte, los compuestos fenólicos tienen potencial para crear condiciones pobres de nutrientes bajando la disponibilidad de los mismos y pudiendo influir en las características del suelo como pH, materia orgánica y nutrientes (Rice, 1984; Appel, 1993; Inderjit, 1996; Kalburtji y col., 2001). La adición de ciertos compuestos fenólicos al suelo provoca la reducción del contenido de nitrógeno, fosfatos y materia orgánica. Esto podría deberse a mecanismos de absorción y/o alteración microbiana de compuestos fenólicos y mineralización microbiana (Inderjit y Mallik, 1997). Como consecuencia, estas condiciones alteradas de los suelos podrían afectar negativamente al desarrollo de las plántulas (Black, 1973).

Muchas veces, el efecto individual de las moléculas estudiadas no puede explicar el efecto global encontrado en la planta, encontrándonos con frecuencia efectos sinérgicos y antagónicos (Inderjit y Mallik, 1997), o compuestos potencialmente activos a altas concentraciones en algunas plantas y en otras especies únicamente a bajas concentraciones (Pandey, 1996).

Por su parte, el grupo de los terpenos está presente en una gran cantidad de productos naturales. Sólo en el *Helianthus annuus* L. se encuentran representados moléculas tanto de mono-, sesqui-, di-, tri- y tetraterpenos (Macías y col., 1999). A pesar de su extensa representación y estudio de su actividad biológica, aún son pocos los trabajos que relacionan estas moléculas, y concretamente a los diterpenos, con la alelopatía y su mecanismo de acción (Seigler, 1998; Einhellig, 2002).

I.3.4.- Interacción de factores.

En la naturaleza, las plantas están sometidas a factores ambientales entre los que se producen diferentes interacciones. La presencia de compuestos alelopáticos en respuesta a estos factores va a ser dependiente de cómo interactúen entre ellos. Por ejemplo, compuestos fenólicos como los flavonoides, estimulan su síntesis ante diferentes condiciones ambientales tales como estrés hídrico, temperatura o radiación ultravioleta (Cen y Bornman, 1993).

En esta línea, las plantas pueden experimentar de manera simultánea diferentes tipos de estrés, pudiendo responder de una forma aditiva, sinérgica o antagónica. Los resultados revelan que la respuesta de las plantas a condiciones de estrés múltiple es diferente a la que se observa cuando el estrés es impuesto por separado. Por ejemplo, el contenido de fenoles aumenta un 19, 58 y 63 % en plantas con estrés hídrico, radiación ultravioleta y combinación de los dos respectivamente (Balakumar y col., 1993).

En *C. ladanifer*, los ocho flavonoides agliconas identificados por Chaves (1994) muestran variaciones cuantitativas dependientes de la estación, estando la síntesis inducida por factores externos, especialmente durante la estación estival. Este aumento 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 total (Chaves, 1994; Chaves y col., 1997).

También pueden influir conjuntamente temperatura y fotoperiodo produciendo profundos efectos en la cantidad y la calidad de los exudados en general, ya que estos parámetros afectan al proceso de fotosíntesis, translocación y respiración de las plantas (Hale, 1978; Hale y Moore, 1989). Estudios han demostrado que las altas temperaturas producen un aumento en la secreción de exudado de algunas especies (Rovira, 1969; Vancura, 1967; Hale, 1978; Kato-Noguchi, 1999). Pramanik (2000) demuestra la influencia tanto cualitativa como cuantitativa de la temperatura y el fotoperiodo sobre el exudado de raíz de *Cucumis sativus*. El número de ácidos orgánicos y su cantidad aumenta bajo condiciones de temperaturas altas (luz-30°/oscuridad-25°) y fotoperiodo largo (14h luz-10h oscuridad) causando mayor autotoxicidad que a bajas temperaturas (luz-25°/oscuridad-20°) y fotoperiodo corto (10 h luz- 14 h oscuridad).

Los cambios estacionales de luz, temperatura y humedad, juegan un papel importante no sólo en la cantidad y composición del exudado en muchas especies, también en la disponibilidad y efectividad de los compuestos fenólicos como agentes alelopáticos (Rice, 1984; Hale y Moore, 1989). Son escasos los trabajos sobre como afectan estos factores a la actividad de los aleloquímicos, pero algunas investigaciones muestran que ambientes con altas temperaturas y alta intensidad lumínica potencian la inhibición de ciertos ácidos fenólicos (Glass, 1976; Hauson y col., 1983; Bhowmik y Doll, 1983; Einhellig y Eckrich, 1984).

Las características edafológicas es otro factor que influye en la síntesis y actividad de estos compuestos. La síntesis de aceites esenciales por parte de especies del género *Cistus*, tales como *Cistus monspeliensis* y *Cistus albidus* presenta dependencia por el sustrato. Estudios realizados por Robles y Garzino (1999, 2000) sugieren que existen diferencias significativas, tanto cuantitativas como cualitativas, en la síntesis de aceites esenciales, principalmente sesquiterpenos, dependiendo si las plantas crecen en sustrato calcáreo (básico) o silíceo (ácido). Además, en ensayos de germinación realizados por estos

investigadores con soluciones de estos aceites y semillas de lechuga, comprobaron que la actividad alelopática de las soluciones provenientes de plantas de origen calcáreo era mayor que las que provenían de sustrato silíceo.

Otro aspecto relacionado es la influencia de los aleloquímicos en la dinámica de los nutrientes en el suelo y principalmente del nitrógeno disponible. En este sentido, existen trabajos que aseguran que compuestos fenólicos como es el ácido ferúlico, taninos o terpenoides, inhiben la nitrificación bloqueando la oxidación de NH_4^+ a NO_2^- por las *Nitrosomonas* (Rice, 1984; White, 1994).

Por otra parte, la adición de aleloquímicos al suelo produce un aumento tanto de la biomasa microbiana como de su actividad. Esta actividad produciría una disminución temporal en el nitrógeno y fósforo disponible para la planta y por tanto, un efecto en su crecimiento (Michelsen y col., 1995).

Kuiters (1989) sugiere, en estudios realizados en Belgrado (Servia), que durante el otoño la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el suelo es mayor que en primavera. Argumenta que el descenso de ácidos fenólicos en primavera es el resultado del aumento de la actividad microbiana debida al incremento de la temperatura del suelo y a la adsorción de materia orgánica durante la humificación. Por su parte, los aleloquímicos pueden influir sobre los componentes bióticos y abióticos del suelo, y éstos a su vez son los responsables de su degradación y transformación en el suelo.

Dalton y col. (1983), e Inderjit y Daskshini (1994) muestran que los minerales del suelo y otros factores pueden influir, cuantitativa y cualitativamente, en la disponibilidad de aleloquímicos. En suelos asociados a *Pluchea lanceolata*, se han aislado e identificado tres potentes agentes aleloquímicos: formononetin-7-O-glucósido, hesperitin-7-rutinoside y taxifolin-3-arabinosa. Estos suelos son salinos-alcálicos y el formononetin-7-O-glucósido en estas condiciones no se degrada (Inderjit y Dakshini, 1991). Sin embargo, en suelos asociados con presencia predominante de trebol (*Trifolium polyphyllum*), el cual también secreta este aleloquímico, sólo se observaban varios ácidos fenólicos que son productos de

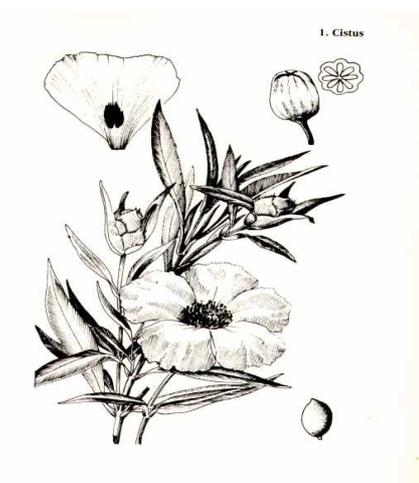
degradación de este flavonoide (Dewick, 1988). A pesar de estos trabajos, el papel de estos compuestos en la dinámica de los nutrientes del suelo no está claro.

Por tanto, el hábitat de la especie, las propiedades fisiológicas y biológicas del sustrato (Inderjit, 2005), las condiciones edáficas y medioambientales, y los factores abióticos y bióticos determinan la síntesis de estos compuestos, pudiendo repercutir en la disponibilidad cuantitativa y cualitativa de los mismos en la planta y en el suelo (Inderjit, 1996; Inderjit y Weiner, 2001; Kobayashi, 2004).

Hoy nadie niega la existencia de la alelopatía, pero es extremadamente difícil demostrar este fenómeno en situaciones naturales debido a que influyen varios componentes tanto abióticos como bióticos del ecosistema y diferentes mecanismos de interferencia podrían operar en paralelo (Inderjit y Asakawa, 2001). Esto hace muy difícil abordar el fenómeno alelopático en el campo. Además, ocurre que no siempre altas cantidades de aleloquímicos están correlacionadas con inhibición del crecimiento y la concentración de estos compuestos dentro de la planta no define exclusivamente su potencial alelopático, ya que estos compuestos pueden sufrir una rápida transformación que los hagan más o menos bioactivos (Macías y col., 2005). Todas estas interacciones hacen difícil definir con claridad el proceso alelopático y algunos autores sugieren conceptualizar la investigación alelopática en términos de ecología química del suelo (Inderjit y Mallik, 2001).

En resumen, las condiciones ambientales influyen en la síntesis de los compuestos con actividad alelopática potencial, pero esta potencialidad (no real) vuelve a sufrir las consecuencias de la interacción con el ambiente al ejercer su actividad, pudiendo ser ésta modificada por las distintas condiciones ambientales (Kobayashi, 2004). En este sentido, los factores climáticos, además de influir en la síntesis de los aleloquímicos (Chaves y Escudero, 1999) pueden también afectar a su actividad.

I.4.- DESCRIPCIÓN GENERAL DE *Cistus ladanifer* L.



I.4.1.- Descripción Morfológica.

Cistus ladanifer es un arbusto de 1 a 2,5 m de altura, erecto y muy aromático (Bolaños y Guinea, 1949) perteneciente a la familia de las Cistáceas. Presenta hojas coriáceas, glabras en la parte superior y tomentosas en la inferior, sub-sésiles y con tres nervaduras en el tercio proximal. De flores grandes y vistosas (5 a 8 cm de diámetro), se distinguen dos variedades según el tipo de flor, la variedad *albiflorus* (Franco, 1971) cuyos pétalos son totalmente blancos, y la variedad *maculatus* (Franco, 1971), la cual presenta una mancha oscura sobre la uña de cada pétalo.

Presenta fruto en cápsula oval-oblonga o suboblonga escamosa-vellosa, con valvas en número básico de 10. La dehiscencia es loculicida valvar, dejando al descubierto numerosas semillas (250 por carpelo), diminutas (en torno a 0,5-1 mm.), poliédricas, lisas o ligeramente rugosas (Krollmann y Gülz, 1983).

I.4.2.- Descripción Ecológica

Según Braun-Blanquet y col. (1941), *C. ladanifer* es una especie originaria de la Península Ibérica y zona septentrional de Marruecos. Andalucía Occidental, Extremadura y las zonas occidentales de Madrid, Castilla la Mancha y Castilla León, es donde mayor abundancia presenta, tornándose más rara en el norte de Galicia, Asturias, País Vasco, Aragón, Murcia, Valencia y Cataluña. En la Península se encuentran distribuidas desde el nivel del mar hasta los 1000-1200 m de altitud, poniendo en evidencia una gran capacidad de adaptación (Bolaños y Guinea, 1949; Núñez, 1989).

La jara es una especie invasora, típicamente xerófila, sin especificidad por tipo alguno de suelos (Rivas-Goday y Rivas-Martínez, 1967; Goes, 1968), aunque prefiere implantarse sobre cuarcita, pizarra y arenisca (Figura 2). En general suelos ácidos con valores de pH comprendidos entre 3,5-6, correspondientes a suelos pobres en nutrientes y con una baja mineralización.



Figura 2: Detalle del sustrato pizarroso en el que se asienta con frecuencia *C. ladanifer*.

Dentro de los síndromes de vegetación descritos por Herrera (1984), el análisis morfológico sitúa a la jara como una planta típica del grupo I. Es pues, una especie pionera, colonizadora de suelos generalmente muy degradados asociados a etapas tempranas de la sucesión, y que se adapta con gran eficacia a condiciones de baja fertilidad de suelos y estrés periódico (Núñez, 1989).

Puede desarrollarse en ambientes climáticos muy diversos y extremos, siendo capaz de soportar desde estrés de frío, hasta sequedad y altas temperaturas, durante periodos de tiempo más o menos largos. Estas condiciones, en sus 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 en dormancia y germinación de las semillas de una población (Gutterman 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-Marquez 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 semillas de *C. ladanifer* presentan las siguientes características comunes al resto de miembros de su género:

- Son de pequeño tamaño, lo que facilita su penetración y acumulación en el suelo formando bancos de semillas persistentes. Además, contienen pocas reservas nutritivas por lo que las plántulas tienen que comenzar a fotosintetizar lo más rápidamente posible; así, las jaras germinan preferentemente en espacios abiertos desprovistos de vegetación en los que no existe una limitación a la disponibilidad de luz.

- No presentan estructuras ni mecanismos especializados de dispersión. Los frutos de las jaras (cápsulas) no se desprenden de la planta al madurar, sino que permanecen unidos a ella y, al abrirse, van liberando las semillas de forma paulatina. Esto hace que la diseminación sea a corta distancia y durante un largo período de tiempo.
- La mayor parte de las semillas presentan una cubierta dura e impermeable al agua, en mayor o menor grado, y como consecuencia de la eficaz protección ofrecida por esta cubierta, suelen tener una longevidad bastante elevada.

En resumen, las semillas de la jara presentan dormición (imposibilidad de germinar en condiciones óptimas para la germinación), impuesta por la dureza de la cubierta seminal, que implica un mayor o menor grado de impermeabilidad al agua. Este hecho determina que el agua no llegue al embrión de la semilla y, por tanto, que la germinación no tenga lugar.

En condiciones naturales, el deterioro o desgaste de la cubierta seminal por diversas causas, combinado con las temperaturas relativamente bajas, serían los factores principales que promoverían la germinación de las jaras. Pero el deterioro de esta cubierta puede alcanzarse de forma drástica, por ejemplo con las altas temperaturas de los incendios. En este caso, las altas temperaturas que se producen durante los incendios provocan daños y pequeñas fracturas en la cubierta seminal posibilitando la absorción de agua por el embrión.

Tras el fuego, la mayor parte de las semillas germinarán cuando haya la suficiente cantidad de agua disponible en el suelo y las temperaturas sean las adecuadas, dando lugar así a germinaciones masivas y sincronizadas. Las jóvenes plántulas se desarrollan entonces en suelos ricos en elementos minerales activos y sin una cubierta vegetal que compita con ellas por la luz, el agua o los nutrientes. En áreas arrasadas por los incendios se ha comprobado, de forma experimental, que las jaras llegan a producir entre 10 y 20 veces más plántulas que en zonas no alteradas (Valbuena y col., 1992; Delgado y Serrano, 2001).

No obstante, esto no siempre es así. Existen numerosas evidencias de la germinación de jaras sin que haya habido previamente un incendio. Así, es un hecho comprobado que las jaras son capaces de colonizar áreas fuertemente alteradas por el hombre, tales como pastos y terrenos de cultivo abandonados y zonas boscosas deforestadas. Hay que tener en cuenta que las jaras producen enormes cantidades de semillas. Se calcula que una sola planta de *C. ladanifer* puede llegar a producir 250.000 semillas por año (datos observados y en publicación). Basta con que sólo una pequeña fracción de las semillas producidas por una población sean capaces de germinar (semillas "blandas"), para mantener y perpetuar dicha población. Su forma de crecimiento: rápida germinación y desarrollo de las plántulas tras una perturbación fuerte, la hacen ser una típica especie estratega de la "r". En un solo año es capaz de ocupar el 75% de la cobertura del suelo, a pesar de presentar solamente un 4-5% de capacidad germinativa en condiciones normales.

Tras la germinación, las plántulas 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 perdurar el sistema (Nuñez, 1989).

Dado que después de un incendio sus semillas germinan de forma masiva las especies de jaras se han encuadrado, tradicionalmente, dentro de la categoría de plantas pirófitas, no obstante, la tendencia actual es a clasificarlas simplemente como oportunistas, capaces de invadir terrenos alterados en ausencia de plantas competidoras (Pérez García y Pita Villamil, 1999).

I.4.3.- Descripción Fenológica.

El estudio del ciclo vegetativo y reproductivo a lo largo del año, o sea la fenología, aporta una importante información acerca de la duración de las diversas fases del desarrollo vegetativo frente a la variación de los factores ambientales (Larcher, 1977). El complejo de condiciones edafo-climáticas de la vegetación está sujeto principalmente a la temperatura, siendo éste el principal factor influyente en la distribución de las plantas en la tierra (Baker y O'dowd, 1982). La acción de este factor es tan evidente que se puede comprobar observando una misma especie en diferentes altitudes o latitudes, pudiendo adoptar los individuos aspectos diferentes e incluso existir diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en la composición del exudado de las plantas (Chaves, 1994; Sosa y col., 2005). La cantidad de luz también es un parámetro importante, situándose preferentemente en lugares que reciben intensidades lumínicas superiores a $360 \text{ cal/cm}^2 \text{ día}$ (Matías, 1990).

Los distintos estados fenológicos de *C. ladanifer* son los siguientes:

- La producción foliar se inicia cuando empiezan las primeras lluvias, reduciéndose durante el periodo de sequía. La formación de yemas auxiliares tiene su inicio de modo general en la segunda quincena da Enero hasta Mayo, periodo que coincide con la mayor abundancia de agua en el suelo (Lopes-Borges, 1988).
- La floración ocurre entre mediados de Febrero y Mayo, dependiendo de las localidades (Lopes-Borges, 1988). En Extremadura se produce hasta Junio y esporádicamente se encuentran individuos floridos en Noviembre.
- La caída de la hoja tiene lugar dos veces al año, la primera y más abundante ocurre durante la segunda quincena de Mayo y la primera quincena de Junio, y la segunda entre Agosto y Octubre. Este periodo debe estar controlado por mecanismos fisiológicos, que a su vez están condicionados por diversos factores ambientales como temperatura, humedad, etc. (Núñez, 1989). Además, que la caída sea justo antes del verano, favorece la retención del

agua, puesto que se reduce la evapotranspiración de la planta, ya que la superficie foliar de las nuevas hojas resulta bastante inferior a la de las viejas (Núñez, 1989).

Las características genéticas de cada individuo así como las variables del medio en que se desarrollan son determinantes en las dimensiones del aparato vegetativo de la planta, de tal manera que la variabilidad intrapoblacional refleja la influencia del genotipo, mientras que la interpoblacional manifiesta la importancia del medio.

I.4.4.- Exudado de *Cistus ladanifer* L.: antecedentes bibliográficos.

Cistus ladanifer L. es vulgarmente 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), por ser específico de cada especie.

García Martín y García Vallejo (1969), fueron de los primeros investigadores que analizaron la gomorresina de *Cistus ladanifer*, identificando una serie de compuestos. Según estos autores, el mayoritario es el α -pineno, seguido de una serie de compuestos que constituyen un alto porcentaje en la composición, como son: fendrona, linalol, canfeno, p-cimeno, bornilo, borneol, acetato de linalilo, neral y geraniol. Los ácidos libres, fenoles y aldehídos, constituyen un porcentaje inferior, como son: timol, carvanol, felandreno, furfural, benzaldehído y metilheptilacetona.

Con posterioridad, Pascual y col. (1972, 1974, 1977, 1979 y 1982) identificaron los siguientes diterpenos: ácido labdanólico, ácido ladánico y ácido oxocátivico. Aislaron e identificaron los siguientes flavonoides: apigenina 7 (O) metil, kaemferol 3,7,4' tri(O) metil, apigenina 7,4' di(O) metil y kaemfero 3,7 di(O) metil; y los terpenos monohidroxiados: 15-nor-8-labdanol, viridiflorol, ledol, ladenol y oxocativol.

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

Proksch y Gülz (1984), caracterizaron tres flavonoides agliconas: kaemferol 3 (O) metil, apigenina 4' (O) metil y kaemferol 3,4' di(O) metil.

Chaves y col. (2001b) aislaron e identificaron los siguientes compuestos fenólicos: Ácido ferúlico, Ácido cinámico, Ácido hidrocínámico, Ácido 4-hidroxi benzoico, Ácido metilpropionato, Ácido oxálico, Ácido metilmalónico, Ácido p-anísico, Ácido butírico, Ácido hidroxibutírico y Azuleno.

II.- Objetivos

II.1.- JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DESARROLLADO.

Hace aproximadamente 10 años, en el área de Ecología de la UEX, se inició una línea de investigación sobre el comportamiento alelopático de una especie ampliamente distribuida en la Península Ibérica y emblema de la región extremeña, como es *Cistus ladanifer* L.

Los esfuerzos en estudiar el efecto alelopático entre plantas puede ayudar a comprender las complejas interacciones que se producen entre ellas, revirtiendo en la comprensión de la dinámica de los ecosistemas (Smith y Martin, 1994) y pudiendo aportar explicaciones de la dificultad encontrada en la regeneración de algunos bosques.

Se eligió esta especie porque se ha demostrado (Malato-Belíz y col., 1992) que interviene en la disminución de la riqueza y diversidad de herbáceas y arbustos que se encuentra en las comunidades donde ella aparece, Figura 1 y 2.

La causa de esta disminución puede ser como respuesta a varios factores: competencia por nutrientes, interferencia química, acumulación de hojarasca, penetración de la luz, etc. (Kuuluvaine, 1994). Pero trabajos previos (Chaves y Escudero, 1997) han demostrado el potencial alelopático que presenta el exudado de las hojas de *C. ladanifer*, pudiendo ser ésta la causa principal de la disminución de las herbáceas próximas a esta especie.



Figura 1: Imagen en la que se observa la disminución de abundancia de vegetación en la zona de influencia de *C. ladanifer*.



Figura 2: Imagen de un jaral típico sin especies acompañantes, ni arbustivas ni arbóreas.

Una vez demostrado su potencial alelopático, nos planteamos seguir profundizando en este estudio. Lo primero fue comprobar la actividad de los ocho flavonoides que se habían identificado en el exudado de *C. ladanifer* (Chaves y col., 1998), además de identificar y comprobar la actividad del resto de compuestos.

Los primeros resultados obtenidos pusieron de manifiesto que dos flavonoles (kaemferol 3(O) metil y kaemferol 3,4' di(O) metil) y la flavona apigenina 4'(O) metil son los tres flavonoides agliconas, de los ocho identificados en el exudado de *C. ladanifer* que presentan actividad alelopática (Chaves y col., 2001a). Su actividad no está relacionada directamente con la inhibición en la germinación, pero sí afectan al tamaño de la raíz, de cotiledones y retrasan el nacimiento de cotiledones. El retraso en la velocidad de germinación y crecimiento de radícula es importante para el establecimiento de todas las especies en condiciones naturales, afectando a la oportunidad de la planta para establecerse, pues no aprovecha bien las condiciones favorables, como pueden ser las primeras lluvias, y pudiendo verse también dificultada la penetración de la raíz en el suelo.

Posteriormente se determinó la naturaleza química de otros 11 compuestos pertenecientes al exudado (Chaves y col., 2001b) (Ac. ferúlico, Ac. cinámico, Ac. hydroxicinámico, Ac. hydroxibenzoico, Metilpropinato, Ac. oxálico, Ac. metilmalólico, Ac. anísico, Ac. butírico, Ac. hydroxibutírico y Azuleno) y se demostró que poseían actividad alelopática (Chaves y col., 2001b). Usualmente, los compuestos que presentan actividad alelopática derivan de varias fuentes y determinar su origen es bastante complejo. Pero sí es cierto que el efecto alelopático está determinado por la acción conjunta de todos ellos. Como se demostró en este estudio, la acción conjunta de todos o parte de ellos es más activa que cuando actúan por sí solos, poniéndose en evidencia que la mezcla de estos compuestos, incluso de aquellos que tienen un efecto negativo muy débil sobre el desarrollo de las plántulas, sinergizan el comportamiento alelopático.

Actualmente se está profundizando en el conocimiento de la biodisponibilidad de estos compuestos en el medio natural, poniéndose de manifiesto la necesidad de estudios que nos acerquen más a la realidad el efecto alelopático de cualquier tipo de especie (Einhelling,

1995; Inderjit y col., 1999) y con este fin, para acercarnos más a las condiciones naturales, nos planteamos el siguiente objetivo:

- Conocer la existencia, la persistencia y la degradación de los compuestos con actividad alelopática en el suelo, y determinar los factores ambientales responsables de su síntesis.

Se demostró la presencia de algunos de estos compuestos en suelos asociados a *C. ladanifer* (Chaves y col., 2003), inhibiéndose la germinación de herbáceas en los ensayos realizados en los suelos de jarales. Pero los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que existe heterogeneidad en el comportamiento alelopático anual de los suelos derivados de *C. ladanifer*, comprobándose un claro efecto estacional en la inhibición de la germinación y desarrollo de plántulas.

Así mismo, la composición de compuestos hasta ahora identificados con actividad alelopática en hojas y hojarasca, es diferente cuantitativa y/o cualitativamente tanto a nivel estacional, interpoblacional, como entre estos dos tipos de hojas (Sosa y col., 2005); y la síntesis de estos compuestos es inducida por factores físicos como la temperatura, la luz y el estrés hídrico (Sosa y col., 2005). Esto implicaría que las diferentes características climáticas que se producen entre estaciones pueden estar influyendo en el comportamiento alelopático de esta especie. Es necesario añadir que el estudio de la incorporación y degradación de estos compuestos en el suelo se está realizando actualmente.

II.2.- OBJETIVOS.

Considerando los resultados obtenidos hasta ahora, y con el fin de delimitar la actividad alelopática de esta especie, los resultados presentados en esta tesis derivan del siguiente objetivo principal:

· Determinar si el comportamiento alelopático de una especie, en este caso Cistus ladanifer, es dependiente de las condiciones climáticas en las que se encuentre.

Para desarrollar este objetivo general es necesario realizar la siguiente secuencia de objetivos particulares:

1.- Determinar, en el laboratorio, el efecto de los factores ambientales luz (fotoperiodo) y temperatura sobre la actividad alelopática tanto de los compuestos identificados en *C. ladanifer* como de sus mezclas.

2.- Determinar la actividad alelopática de los compuestos presentes en el exudado y suelo de *C. ladanifer* aún sin identificar. Lo cual requiere:

2.1.- Caracterizar estos compuestos.

2.2.- Cuantificar, ensayando con cada uno de ellos, su posible actividad alelopática.

2.3.- Estudiar los factores ambientales responsables de la síntesis y secreción de estos compuestos en condiciones naturales y controladas.

2.3.1.- Cuantificar la variación cuantitativa y cualitativa de estos compuestos en las hojas, hojarasca y suelo de jarales a lo largo del año.

2.3.2.- En invernadero, bajo condiciones controladas, estudiar la respuesta de la secreción de estos compuestos a:

2.3.2.1.- La temperatura.

2.3.2.2.- Estrés hídrico.

3.- Cuantificar la actividad alelopática de una especie dependiente de las características climáticas a las que está sometida, realizando el estudio en diferentes poblaciones con características climáticas distintas.

3.1.- Cuantificar el efecto derivado de las hojas.

3.2.- Cuantificar el efecto derivado de la hojarasca.

3.3.- Cuantificar el efecto derivado del suelo.

III.- Materiales y Métodos

III.1.- EFECTO DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS LUZ Y TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD DE COMPUESTOS FITOTÓXICOS.

III.1.1.- Selección de compuestos y preparación de las soluciones.

Los compuestos utilizados fueron identificados del exudado de *C. ladanifer* (Chaves y col., 2001b) mediante técnicas cromatográficas de gases y espectrofotometría de masas. Los compuestos se obtuvieron comercialmente de la empresa Aldrich-Chemical.

Se prepararon diferentes soluciones a distintas concentraciones con agua Milli-Q, tanto de los compuestos por separado como de diferentes mezclas de ellos. Para la obtención de las mezclas se tuvo en cuenta la acción que ejercían por separado cada uno de ellos, estudiando la interacción de los que afectan negativamente a la germinación, por otro lado de los que afectan al nacimiento de los cotiledones, y de los que influyen en el tamaño de la raíz y cotiledones, así como la mezcla de todos los compuestos (Chaves y col., 2001b).

Las concentraciones utilizadas en los ensayos, para los compuestos por separado, fueron desde 10^{-3} M, concentración máxima recomendada para los bioensayos alelopáticos (Rice, 1984; Macías y col., 1993), hasta la concentración en la que no aparece efecto negativo en ninguno de los parámetros medidos (Chaves y col., 2001b):

- 1 -Ácido Ferúlico (ácido fenólico): 10^{-3}M y $0,5 \cdot 10^{-3}\text{M}$
- 2 -Ácido Cinámico (ácido fenólico): 10^{-3}M y 10^{-4}M
- 3 -Ácido 4-Hidroxibenzoico (ácido fenólico): 10^{-3}M y 10^{-4}M
- 4 -Ácido Hidrocinámico (ácido fenólico) : 10^{-3}M y 10^{-4}M
- 5 -Metilpropionato (ácido graso): 10^{-3}M , 10^{-5}M y 10^{-7}M
- 6 -Ácido Oxálico (ácido orgánico): 10^{-3}M y $0,5 \cdot 10^{-3}\text{M}$
- 7 -Ácido Metilmalónico (ácido orgánico): 10^{-3}M y $0,5 \cdot 10^{-3}\text{M}$
- 8 -Ácido p-Anísico (ácido fenólico): 10^{-3}M y $0,5 \cdot 10^{-3}\text{M}$
- 9 -Ácido Butírico (ácido graso): 10^{-3}M , 10^{-5}M y 10^{-7}M
- 10 -Ácido 3-Hidroxibutírico (ácido graso): 10^{-3}M y $0,5 \cdot 10^{-3}\text{M}$
- 11 -Azuleno (hidrocarburo): 10^{-3}M y 10^{-4}M

En los bioensayos realizados con las mezclas, se ensayaron dos concentraciones; 10^{-3}M y $0,5 \cdot 10^{-3}\text{M}$. La selección de compuestos que conforman cada mezcla se ha realizado considerando la acción que ejercían cada uno por separado en los ensayos realizados previamente (Chaves y col., 2001b). La composición de las mezclas fueron las siguientes:

- Mezcla 1: Mezcla de compuestos que inhiben la longitud de las raíces cuando se ensaya con cada uno de ellos por separado (ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-anísico y azuleno).

- Mezcla 2: Compuestos de la mezcla 1 más ácido hidrocinámico, compuestos con un efecto muy negativo en el nacimiento de cotiledones.
- Mezcla 3: Compuestos de la mezcla 1 más ácido cinámico, otro de los compuestos con mayor efecto negativo sobre el nacimiento de cotiledones.
- Mezcla 4: Compuestos de la mezcla 1 más ácido hidrocinámico y ácido cinámico.
- Mezcla 5: Mezcla de compuestos que inhiben la longitud de los cotiledones cuando se ensaya con cada uno de ellos aisladamente (ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico y ácido 3-hidroxibutírico).
- Mezcla 6: Compuestos de la mezcla 5 más ácido hidrocinámico.
- Mezcla 7: Compuestos de la mezcla 5 más ácido cinámico.
- Mezcla 8: Compuestos de la mezcla 5 más ácido hidrocinámico y cinámico.
- Mezcla 9: Mezcla de compuestos que inhiben el nacimiento de cotiledones y débilmente la germinación cuando se ensaya con cada uno de ellos por separado (ácido hidrocinámico y ácido cinámico).
- Mezcla 10: Mezcla de todos los compuestos (ácido ferúlico, ácido hidrocinámico, ácido cinámico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico y ácido 3-hidroxibutírico).

III.1.2.- Condiciones de los ensayos.

Para determinar el efecto de la luz y temperatura en la actividad de los compuestos con fitotoxicidad identificadas en el exudado de *C. ladanifer*, se diseñaron 4 experiencias, las cuales alternaban condiciones de fotoperiodo corto (9 horas de luz-15 horas de oscuridad) y fotoperiodo largo (15 horas de luz-9 horas de oscuridad) con temperaturas altas (20°C en oscuridad-35°C con luz) y temperaturas constantes (25°C). Tanto los compuestos por separado como las mezclas fueron sometidos a cuatro tratamientos diferentes:

Tratamiento A: Temperatura constante (25°C) – Fotoperiodo largo (15 horas de luz - 9 horas de oscuridad); **TC-FL**.

Tratamiento B: Temperatura constante (25°C) – Fotoperiodo corto (9 horas de luz - 15 horas de oscuridad); **TC-FC**.

Tratamiento C: Temperatura altas (20°C en oscuridad - 35°C con luz) – Fotoperiodo largo (15 horas de luz - 9 horas de oscuridad); **TA-FL**.

Tratamiento D: Temperatura altas (20°C en oscuridad - 35°C con luz) – Fotoperiodo corto (9 horas de luz - 15 horas de oscuridad); **TA-FC**.

III.1.3.- Ensayos de germinación.

III.1.3.1.- Selección de semillas.

Las semillas seleccionadas para la realización de los ensayos de germinación fueron de la especie *Rumex crispus*. Esta especie fue elegida tras haber realizado diferentes tipos de ensayos, tanto con el exudado de *Cistus ladanifer* (Chaves y Escudero, 1997) como con los compuestos elegidos (Chaves y col., 2001a), siendo una de las especies que se mostraba más afectada negativamente tanto en la germinación como en el desarrollo de las plántulas. La recogida de semillas se realizó en su hábitat natural dada la imposibilidad de encontrarlas en el mercado, y en la estación de verano cuando están maduras.

III.1.3.2.- Ensayos.

Se sembraron 25 semillas de *R. crispus* en placas Petri con papel Whatman nº118. Cada dos días se regaron con las diferentes concentraciones seleccionadas para los compuestos y las mezclas (4 réplicas de cada una de ellas) y con agua Milli-Q las placas control. Todas ellas se mantuvieron durante 10 días en una cámara de cultivo bajo las condiciones anteriormente citadas.

III.1.3.3.- Parámetros medidos para cuantificar la fitotoxicidad de los compuestos.

Los procedimientos más comunes para determinar la actividad biológica de sustancias alelopáticas usadas en ensayos de inhibición/actividad son (Wardle y col., 1991):

- Medida de la actividad biológica específica (inhibición de fotosíntesis).
- Medida de aspectos referentes al crecimiento de las plantas afectadas (germinación, nacimiento de cotiledones, tamaño de la raíz, tamaño de cotiledones o biomasa).

En este caso, al final de cada experiencia se contabilizaron:

- Número de semillas germinadas.
- Número de cotiledones emergidos.

Y se midieron de 10 plántulas, elegidas al azar y por placa:

- Longitud de las raíces.
- Longitud de los cotiledones.

III.2.- IDENTIFICACIÓN, COMPROBACIÓN DE ACTIVIDAD POTENCIAL Y CUANTIFICACIÓN DE DITERPENOS EN *Cistus ladanifer* L.

III.2.1.- Identificación de compuestos.

En este apartado se describen los distintos pasos y las técnicas utilizadas, desde la extracción del ládano, hasta la purificación e identificación final de cuatro compuestos detectados en el exudado de *C. ladanifer*.

III.2.1.1.- Extracción del exudado.

Hojas frescas de *C. ladanifer* eran sumergidas en cloroformo para extraer el exudado. Evaporado el cloroformo, el residuo se resuspende en metanol y es guardado en el congelador a -20°C durante 12 horas para producir así la precipitación de las ceras. Una vez precipitadas, se recoge el sobrenadante y se almacena hasta su posterior análisis.

III.2.1.2.- Aislamiento y pre-purificación de los compuestos. Técnicas preparativas.

Antes de la purificación de los compuestos, el exudado era separado en varias fracciones por cromatografía en columna usando como relleno Sephadex LH-20 (Vogt y Gülz, 1991) y como eluyente metanol.

La fracción con mayor presencia de estos compuestos era nuevamente cromatografiada, en HPLC (Waters: Bombas: 515 HPLC Pump; Inyector: 717plus Autosampler; Detector: 996 Photodiode Array Detector;) (Figura 1) con columna semipreparativa de fase reversa: Spherisorb S10 ODS2 10x250 mm y usando como eluyente agua/acetonitrilo bajo las siguientes condiciones de gradiente:

0 – 5 min: 100% Agua (1ml /min)

5 – 30 min: 70% Agua-30% Acetonitrilo (1ml /min)

30 – 40 min: 45% Agua-55% Acetonitrilo (1ml /min)

40 – 60 min: 40% Agua-60% Acetonitrilo (0,5ml /min)

60 – 65 min: 45% Agua-55% Acetonitrilo (0,5ml /min)

65 – 75 min: 100% Acetonitrilo (1ml /min)

75 – 85 min: 100% Agua (1ml /min).



Figura 1: Cromatógrafo líquido de alta presión, HPLC, usado para la separación y análisis de las distintas muestras.

Con estas condiciones se obtuvo el siguiente cromatograma (Figura 2):

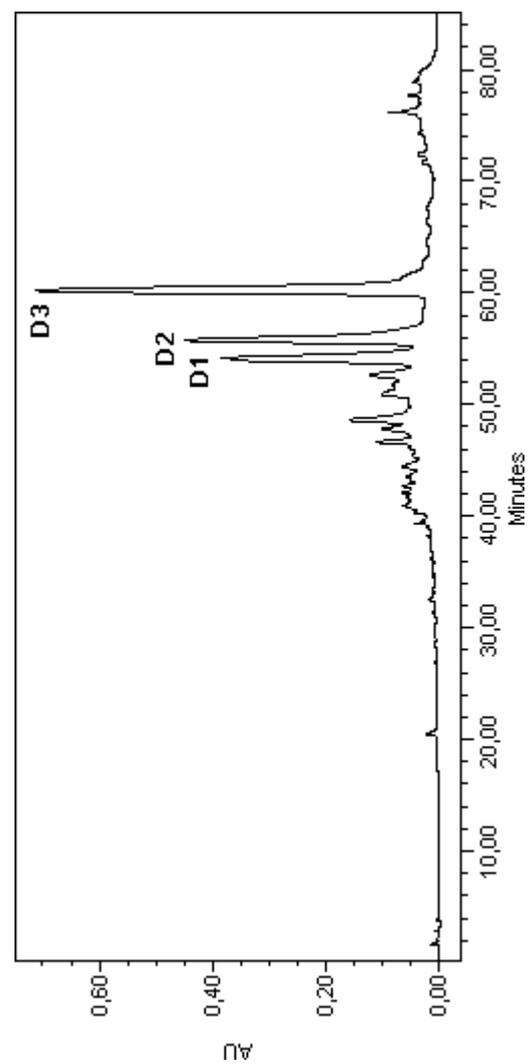


Figura 2: Cromatograma obtenido del exudado de *C. ladanifer* en el cual se señalan los picos correspondientes a los compuestos por identificar.

De este perfil se seleccionaron y recogieron los tres picos mayoritarios: D1, D2 y D3.

Paralelamente, con el objeto de obtener más cantidad de estos compuestos, además de lo obtenido por HPLC, se realizaron experiencias de separación basadas en técnicas preparativas de cromatografía en placa de sílica. En estas placas fue colocado el exudado puro, el cual se dejó correr con eluyente 25% hexano-acetona.

III.2.1.3.- Purificación de los compuestos. Técnicas analíticas.

En las fracciones pre-purificadas se comprobó, mediante los espectros de RMN, que los compuestos analizados aún no estaban puros. Por tanto, se realizaron pruebas cromatográficas en pequeñas placas de sílica con distintos eluyentes (diclorometano-acetato de etilo; hexano-acetato de etilo; hexano-acetona; diclorometano-acetona) y a distintas concentraciones, para seleccionar las mejores condiciones de separación.

Las condiciones óptimas de separación fueron: 5% DCM(diclorometano)-Acetona, aunque dependiendo de las características de la columna y el compuesto a analizar, se utilizaron también otros solventes y otras concentraciones (15% hexano-acetona, etc.) (Figura 3).

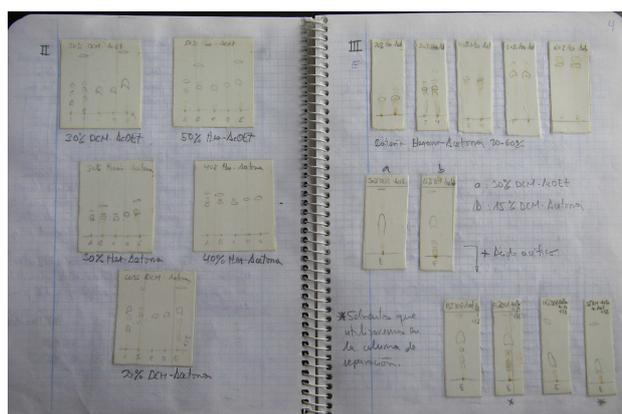


Figura 3: Cuaderno de trabajo donde se recogen algunas de las placas-prueba realizadas en la selección del solvente.

Se procedió a la realización de distintas técnicas de separación tanto semipreparativas como analíticas con el fin de aislar los compuestos:

Cromatografía en columna de sílica en fase normal y eluyente al 5% de DCM-Acetona. Se pasaron cada una de las muestras y se dividieron cada una en 25 fracciones (Figura 4). De cada una se fue comprobando su contenido mediante cromatografía en capa fina de sílica en fase normal y eluyente al 5% de DCM-Acetona, juntándose aquellas que contenían el compuesto puro.

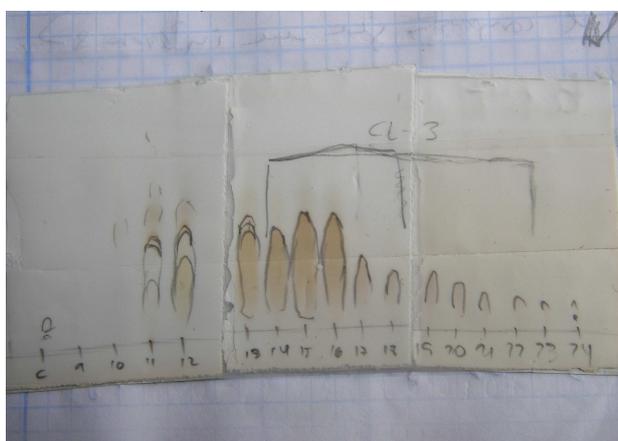


Figura 4: Cuaderno de trabajo donde se muestran las placas-prueba de sílica que recogen el contenido de cada fracción una vez ha pasado toda la muestra por la columna cromatográfica.

Tras juntarlas y evaporar en el rotavapor el solvente, se obtiene cierta cantidad de compuesto que nuevamente fue ultrapurificado en el HPLC con columna analítica Spherisorb 5 μ m ODS2 4,6x150 mm con eluyente de hexano-Acetona al 25% a un flujo de 1ml/min. Los picos se recogen y se comprueba su pureza por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

III.2.2.- Comprobación de la actividad.

En este apartado, se pretende comprobar la fitotoxicidad de los diterpenos identificados. Para ello se realizaron dos tipos de bioensayos, uno denominado de actividad general y otro de fitotoxicidad. En el primero se cuantifica el efecto de cada compuesto sobre la capacidad de elongación de coleoptilos etiolados de trigo. Por su parte, en los bioensayos de fitotoxicidad se evalúa el efecto de los compuestos ensayados sobre la germinación y el desarrollo de cinco especies receptoras estándares (STS).

III.2.2.1.- Bioensayo con coleoptilos etiolados de trigo.

Semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) eran puestas a germinar en placas Petri (15 cm de diámetro), en agua destilada y en total oscuridad a 22°C (Figura 5).



Figura 5: Resumen de las condiciones de cultivo para la obtención de coleoptilos etiolados de trigo.

Después de cuatro días, los coleoptilos eran seccionados. Se descartan los meristemas apicales de 2mm y se usan para el bioensayo los siguientes 4mm de la sección del coleoptilo. Todas las manipulaciones se llevan a cabo bajo luz verde (Hancuck, 1964).

Se introducen en tubos de ensayo con una disolución tampón a pH 5 de sacarosa (20g/l), ácido cítrico (1,02g/l), y fosfato potásico dibásico (2,9g/l). El medio usado para disolver los compuestos y preparar las diferentes concentraciones (10^{-3} - 10^{-6} M) fue DMSO, en una proporción de 5µl/ml de tampón.

Cinco coleoptilos en 5ml de solución, a diferente concentración, se pusieron en cada uno de los tubos, y estos a su vez se colocaron en un rotor para mantener el cultivo en continuo movimiento dentro de la cámara de cultivo, en total oscuridad y a 22°C durante 72 horas (Macías y col., 1999) (Figura 6). Tras este tiempo, los fragmentos de coleoptilos fueron medidos automáticamente mediante procesamiento de imágenes digitales en un equipo Photomed Equipment Software (Castellano, 2002).

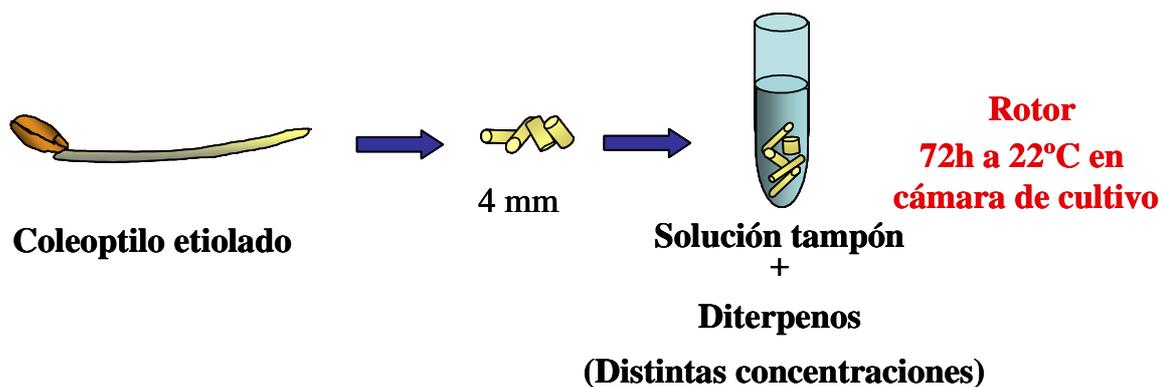


Figura 6: Resumen esquemático de las condiciones del bioensayo con coleoptilos etiolados de trigo.

III.2.2.2.- Bioensayos STS (Standard Target Species).

El bioensayo STS o de actividad fitotóxica se lleva a cabo en placas Petri de 90 mm de diámetro sobre papel Whatman nº 1 donde se depositan las semillas. De forma general, para semillas menores de 8 mm se utilizan 25 semillas por cada placa. Para semillas grandes se emplean 10. La utilización de 4 réplicas para las primeras y 10 en las segundas, asegura 100 semillas por disolución para cada uno de los compuestos a ensayar.

Las disoluciones utilizadas (5ml/placa) se preparan a partir de una solución tampón de ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico (MES) 10mM, a la que se le añade el compuesto a evaluar a la concentración deseada. La disolución de ácido 2[N-morfoliono]jetanosulfónico (MES) 10mM se ajusta a pH 6 con NaOH 1M. El producto se disuelve previamente en DMSO de forma que la concentración final sea de 0,5% v/v. Las concentraciones siguientes se obtienen por dilución de la solución madre.

Las semillas se incuban en condiciones de oscuridad en una cámara de germinación a 22 °C. El tiempo de incubación depende de la semilla. Así, para el tomate (*Lepidium sativum* L.) es de 3 días; para la lechuga (*Lactuca sativa* L.), el berro (*Lycopersicum esculentum* L.) y el trigo (*Triticum aestivum* L.) 5 días, y para la cebolla (*Allium cepa* L.) 7 días (Macías y col., 2003)

Una vez concluido el ensayo, las placas se congelan a -10°C durante 24 horas para evitar el crecimiento de las plántulas durante el proceso de medida. El proceso de congelación favorece la manipulación de las plántulas, evitando así errores en la medición.

Una vez descongeladas y estiradas sobre una plantilla, se utiliza el dispositivo FITOMED (“Sistema automatizado para la adquisición simultánea y gestión informatizada de medidas de longitud variable. FITOMED®” P9901565. 2155034B1. Boletín Oficial de la Propiedad Industrial, 1/11/01. 2001), para su medida y tratamiento estadístico.

III.2.3.- Cuantificación de diterpenos en condiciones naturales.

III.2.3.1.- Selección de los puntos de muestreo y recogida de muestras.

Para la cuantificación de los diterpenos, se han recogido muestras de jaras en cuatro puntos, correspondientes a cuatro localidades distribuidas por la provincia de Badajoz: Quintana de la Serena, Hornachos, Jerez de los Caballeros y Cabeza la Vaca.

En cada población se seleccionó un jaral con características estructurales similares (densidad, superficie, edad, etc.). Se recogieron muestras a lo largo del año (final de cada estación) de hojas, hojarasca y suelos.

Las hojas seleccionadas eran hojas nacidas durante ese mismo año y la hojarasca eran hojas desprendidas, recogidas de la parte más superficial de la capa que forman las mismas en el suelo. Tanto las hojas como la hojarasca se recogieron de diferentes individuos elegidos al azar.

Del suelo del jaral y suelo contiguo al mismo (suelo control) se recogieron muestras de la parte más superficial (10cm), en una cantidad aproximada de 1kg. Las muestras de suelo pertenecen a diferentes jaras elegidas al azar. Por su parte, el suelo utilizado como control fue recogido en zonas contiguas a los jarales, pero sin presencia de *C. ladanifer*.

Todas las muestras se marcan, se enumeran y se transportan en bolsas hasta el laboratorio para su posterior análisis.

III.2.3.2.- Extracción de exudado.

Para poder determinar y cuantificar los compuestos presentes en las muestras de hoja, hojarasca y suelo, se procedió a extraerlos con solventes orgánicos: cloroformo para hojas y hojarasca y metanol para el suelo.

- Extracción del exudado de hojas y hojarasca: unos 0,5g de hojas (2-3 hojas) y 2g de hojarasca (5 réplicas de cada uno de ellas) se sumergen en 2ml de cloroformo, de tal manera que arrastre el exudado de las mismas (Chaves y col., 1993). Estas muestras se congelan 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 Güzl, 1991).

- Extracción de los compuestos presentes en el suelo: Se han descrito diferentes métodos de extracción de los componentes del suelo. Bajo condiciones controladas, Dalton y col. (1987, 1989) y Dalton (1989, 1999), comparan algunos de los procesos de extracción de suelos usados para recoger aleloquímicos de sistemas naturales y cultivados. De los extrayentes ensayados, la eficacia de los mismos fue generalmente en este orden: agua=metanol<acetato sódico<EDTA=DTPA<hidróxido sódico.

Gallet (1994), para extraer estos compuestos, agita 30g de muestras de suelo con 250ml de agua destilada durante 20 horas bajo N y a temperatura ambiente. Inderjit y Dakshini (1992) también realizan la extracción mediante agua destilada (5:1,volumen:peso).

Estos autores consideran que los resultados obtenidos con este método, mediante extracción con agua, son significativos por razones ecológicas. Por esta razón, y puesto que según Dalton (1989), el metanol presenta el mismo poder de extracción que el agua, en este estudio se utilizó metanol para facilitar la evaporación que hay que realizar con posterioridad a la extracción.

Se procedió del siguiente modo: 25g de suelo se extraen con 40ml de metanol, agitándose durante 2 horas. El extracto resultante se filtra y se evapora hasta un volumen final de 1ml (5 réplicas por cada punto de muestra), almacenándose a 4°C para su posterior análisis.

III.2.3.3.- Análisis del exudado. Cuantificación por HPLC. Recta patrón.

Los solventes orgánicos almacenados de muestras de hojas, hojarasca y suelo fueron analizadas por HPLC (Waters; Bombas: 515 HPLC Pump. Inyector: 717plus Autosampler. Detector: 996 Photodiode Array Detector) (Figura 1). 25µl de extracto de solvente orgánico eran inyectados en una columna analítica de fase reversa Spherisorb 5µ C-18 4,6x250mm. La fase móvil utilizada fue agua/acetonitrilo, utilizándose el gradiente descrito en el apartado ***III.2.1.2.***

Una vez obtenido el cromatograma, se cuantificó la cantidad de cada diterpeno presente en las muestras utilizando la ecuación de la recta de calibrado correspondiente. A continuación se representa la recta patrón de cada uno de los diterpenos identificados (Figura 7).

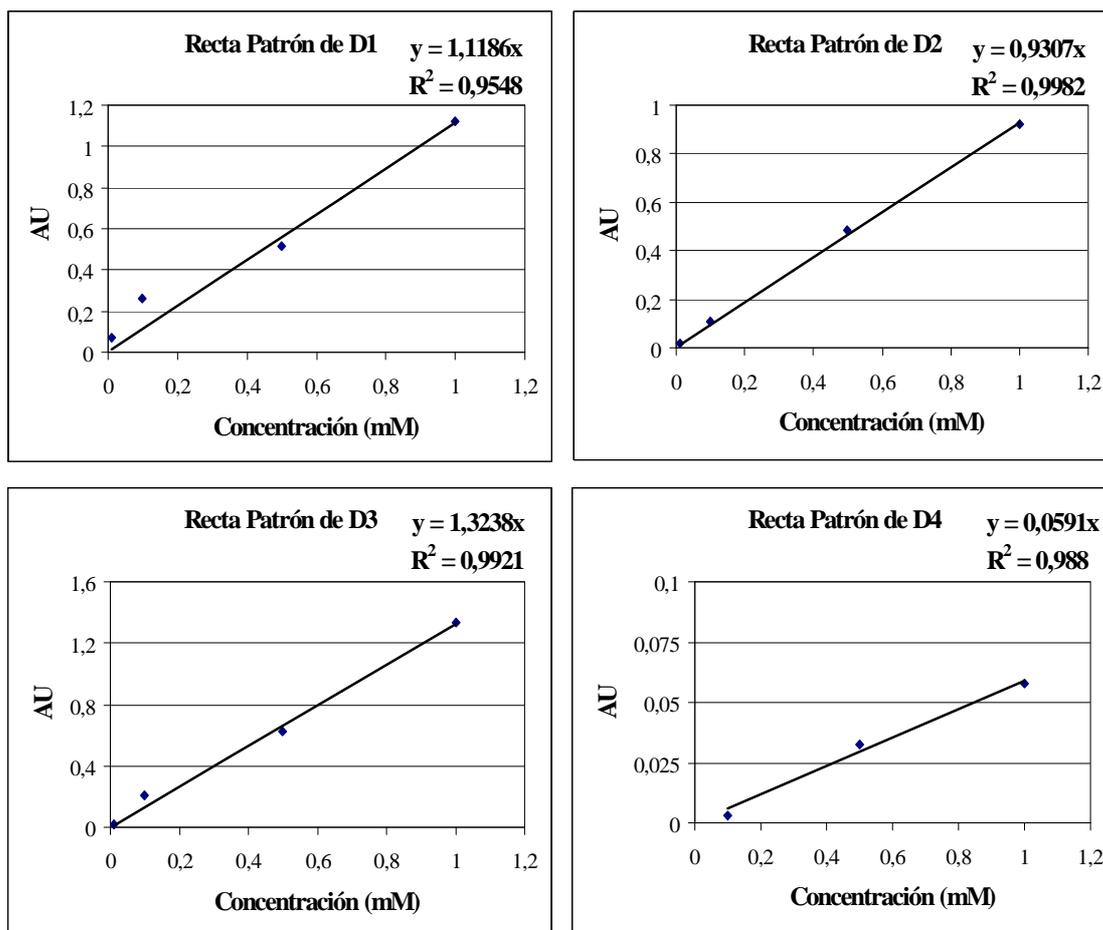


Figura 7: Rectas patrones (de calibrado) de los cuatro diterpenos identificados en *C. ladanifer*

III.2.4.- Cuantificación bajo condiciones controladas: Experimentos en cámara de cultivo.

Con el objeto de estudiar la influencia de los parámetros físicos que determinan la síntesis de estos compuestos, se realizaron experiencias en condiciones controladas donde se cuantificó el efecto de la temperatura y el estrés hídrico.

III.2.4.1.- Recolección de las plantas.

Después de intentar obtener, de forma infructuosa, plantas adultas de *C. ladanifer* mediante semillas, y no encontrando en el mercado ejemplares adecuados para la realización de las experiencias, se optó por la obtención de los pies de planta en el medio natural.

Se seleccionaron jaras de 2 años de edad con 20-30cm de altura. Se extrajeron del suelo sin dañar las raíces y se transplantaron, en sustrato universal, a macetas de PVC de 10cm de diámetro y 20cm de profundidad. El proceso de trasplante se realizó inmediatamente y en el lugar de recolección para impedir el deterioro de la planta y facilitar su enraizamiento. Posteriormente se transportaron al laboratorio, donde se mantuvieron durante 2 meses en condiciones naturales antes del inicio de los tratamientos. Este periodo de adaptación consistió en regar las plantas una vez por semana y mantenerlas bajo condiciones de luz y temperatura ambiente.

III.2.4.2.- Condiciones de los ensayos.

Se diseñaron cuatro ensayos en cámara de germinación (Figura 8), con 9 individuos cada uno, combinando condiciones de altas y bajas temperaturas con estrés y sin estrés hídrico. En todos los ensayos se mantuvo el mismo fotoperiodo con 14 horas de luz.

1. 30°C con luz y 15°C en oscuridad - Sin estrés hídrico. (Plantas regadas cada 2 días)
AT-Sin E.H.
2. 30°C con luz y 15°C en oscuridad - Con estrés hídrico. (Plantas regadas cada 7 días)
AT-Con E.H.
3. 13°C con luz y 4°C en oscuridad - Sin estrés hídrico. (plantas regadas cada 2 días)
BT-Sin E.H.
4. 13°C con luz y 4°C en oscuridad - Con estrés hídrico. (plantas regadas cada 7 días)
BT-Con E.H.



Figura 8: Jaras pertenecientes a ensayos bajo condiciones controladas en cámara de germinación.

La elección de estas temperaturas para la realización de los ensayos no es azarosa ya que corresponden: a la media de las temperaturas máximas en verano (30°C), a la media de las mínimas en verano (15°C), a la media de las máximas en invierno (13°C) y a la media de las mínimas en invierno (4°C) del hábitat extremeño donde la distribución de *C. ladanifer* es mayoritaria (Cabezas y Escudero, 1989).

Cada experiencia se mantuvo durante un mes y se recogieron muestras de hojas al inicio y final de las mismas.

III.2.4.3.- Extracción de exudado.

Para poder determinar y cuantificar los compuestos presentes en las muestras de hojas se procede a la extracción del exudado siguiendo el protocolo descrito en el apartado ***III.2.3.2.***

III.2.4.4.- Análisis del exudado. Cuantificación por HPLC.

Los extractos orgánicos de las muestras de hojas fueron analizadas por HPLC, utilizando el mismo protocolo analítico que en el apartado ***III.2.3.3.***

III.3.- CUANTIFICACIÓN DE DITERPENOS Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ALELOPÁTICA DE *Cistus ladanifer* L. EN UN MEDIO NATURAL CON CONDICIONES CLIMÁTICAS DIVERSAS.

III.3.1.- Selección de los puntos de muestreo.

Se seleccionaron ocho jarales distribuidos en la provincia de Badajoz (Figura 9). Estos puntos de muestreo presentan condiciones climáticas diferentes (temperatura y precipitación) (Tablas 1-4). Respecto a la temperatura, encontramos localidades como Higuera la Real con una temperatura media anual de 15,3°C y otras como Valle de la Serena o Quintana con 17,3°C. Las precipitaciones anuales varían entre los 391 l/m² de Valle de la Serena y los 702 l/m² de Cabeza la Vaca. Estos datos son los valores reales del año de estudio y fueron obtenidos en el Instituto Nacional de Meteorología del Ministerio de Medio Ambiente.



Figura 9: Localización de las ocho poblaciones seleccionadas en la región extremeña y concretamente en la provincia de Badajoz.

Tabla 1: Valores de precipitación total estacional de las ocho poblaciones distribuidas en la provincia de Badajoz. Valores expresados en l/m².

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Cornalvo	61,5	16,6	281,8	136,4
Quintana de la Serena	113,2	38,6	156,0	130,4
Valle de la Serena	98,0	11,2	134,0	148,2
Hornachos	139,8	44,8	219,7	130,7
Santa Ana	147,0	33,0	289,5	147,7
Jerez de los Caballeros	126,0	40,5	300,0	160,0
Higuera la Real	198,0	32,0	253,2	191,9
Cabeza la Vaca	155,2	51,0	309,5	187,2

Tabla 2: Valores medios de temperatura media estacional de las ocho poblaciones distribuidas en la provincia de Badajoz. Valores expresados en °C.

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Cornalvo	17,8	25,7	13,7	9,2
Quintana de la Serena	18,9	26,6	13,9	9,8
Valle de la Serena	18,1	27,1	13,7	10,4
Hornachos	18,9	26,0	14,1	10,2
Santa Ana	16,0	24,5	12,7	9,1
Jerez de los Caballeros	17,1	25,4	12,6	9,9
Higuera la Real	18,3	22,7	11,3	8,7
Cabeza la Vaca	16,7	23,9	12,9	8,7

Tabla 3: Valores de temperatura media máxima estacional de las ocho poblaciones distribuidas en la provincia de Badajoz. Valores expresados en °C.

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Cornalvo	26,2	34,8	16,9	13,8
Quintana de la Serena	25,5	34,2	16,8	14,0
Valle de la Serena	26,1	35,5	17,5	15,7
Hornachos	24,2	32,7	17,8	13,9
Santa Ana	23,8	34,8	16,1	14,1
Jerez de los Caballeros	24,3	33,3	15,6	14,4
Higuera la Real	24,7	35,6	17,1	13,1
Cabeza la Vaca	25,1	34,7	15,2	13,9

Tabla 4: Valores de temperatura media mínima estacional de las ocho poblaciones distribuidas en la provincia de Badajoz. Valores expresados en °C.

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Cornalvo	12,3	18,6	7,8	4,6
Quintana de la Serena	11,3	18,1	8,4	5,5
Valle de la Serena	11,7	17,9	8,5	5,1
Hornachos	12,3	16,3	7,9	6,5
Santa Ana	12,0	18,5	9,1	5,4
Jerez de los Caballeros	11,1	17,4	8,7	5,2
Higuera la Real	11,2	17,9	8,5	4,4
Cabeza la Vaca	10,9	18,3	8,8	4,9

Del mismo modo se seleccionaron doce poblaciones de jaras distribuidas N-S de la Península Ibérica con condiciones climáticas diferentes y más extremas que las ocho anteriores (Figura 10) (Tabla 5-8). De tal manera que, encontramos localidades como Destriana con una temperatura media anual de 11,8°C y otras como Puerto de Galis con 18,8°C. Por su parte, las precipitaciones anuales varían entre los 324 l/m² de El Cubo del Vino y los 1130 l/m² de Valverde del Fresno. Estos datos son los valores reales del año de estudio y fueron obtenidos en el Instituto Nacional de Meteorología del Ministerio de Medio Ambiente.

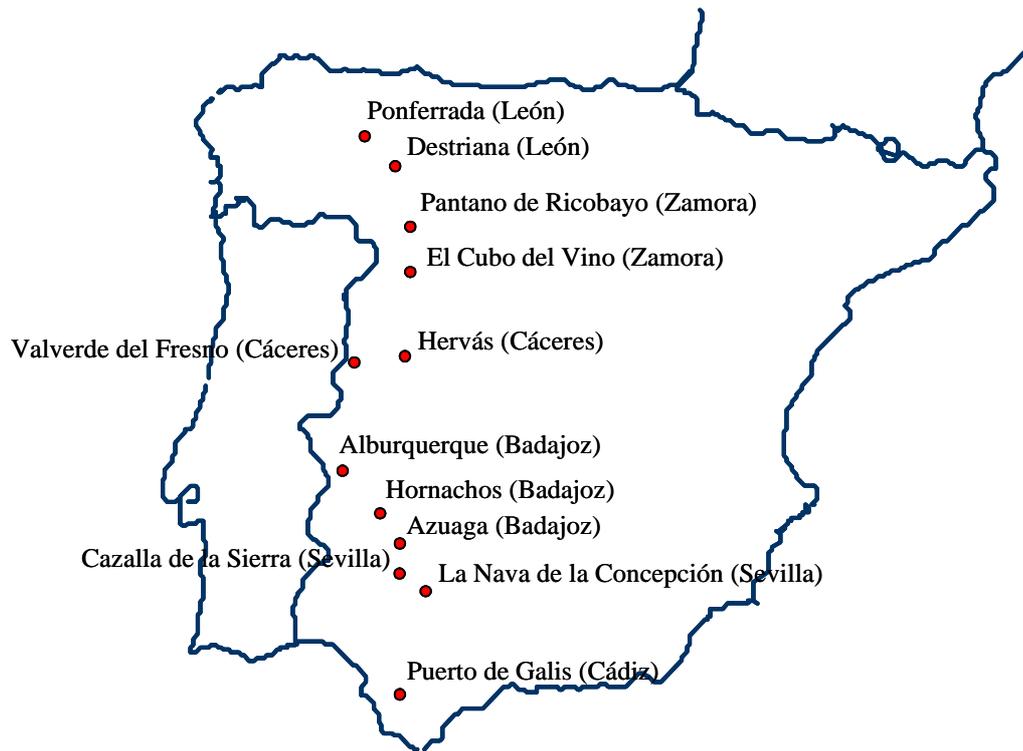


Figura 10: Localización de las doce poblaciones seleccionadas en la Península Ibérica.

Tabla 5: Valores de precipitación total estacional de las doce poblaciones distribuidas en la Península Ibérica. Valores expresados en l/m².

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Ponferrada	113,0	141,3	208,7	96,1
Destriana	56,6	82,4	241,0	67,6
Ricobayo	58,5	53,7	276,9	96,6
El Cubo	90,1	15,7	150,7	67,4
Hervás	169,1	71,1	629,8	204,6
V. del Fresno	96,0	3,3	815,5	215,0
Alburquerque	46,7	11,8	359,4	155,7
Hornachos	118,9	23,0	300,6	196,0
Azuaga	96,4	18,4	389,4	197,8
Cazalla de la S.	121,3	20,2	483,2	249,8
La Nava de la C.	152,9	12,6	556,5	194,7
Puerto de Galis	148,0	16,0	583,8	186,0

Tabla 6: Valores medios de temperatura media estacional de las doce poblaciones distribuidas en la Península Ibérica. Valores expresados en °C.

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Ponferrada	15,8	21,3	9,0	7,1
Destriana	14,0	19,7	7,9	5,7
Ricobayo	14,9	21,5	8,3	6,2
El Cubo	14,5	21,6	8,7	6,4
Hervás	16,9	26,8	10,8	8,7
V. del Fresno	14,8	22,1	9,2	7,2
Alburquerque	18,6	26,3	12,2	10,3
Hornachos	19,2	25,4	13,2	10,6
Azuaga	18,6	26,2	12,2	10,3
Cazalla de la S.	16,4	23,0	11,4	8,8
La Nava de la C.	20,5	27,5	13,5	10,7
Puerto de Galis	19,5	26,2	15,8	13,5

Tabla 7: Valores de temperatura media máxima estacional de las doce poblaciones distribuidas en la Península Ibérica. Valores expresados en °C.

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Ponferrada	23,0	29,1	13,1	12,2
Destriana	21,0	27,0	12,5	11,4
Ricobayo	21,9	29,1	12,2	10,9
El Cubo	21,8	29,6	13,0	11,4
Hervás	22,1	33,9	14,8	13,2
V. del Fresno	22,7	31,1	13,7	12,2
Alburquerque	25,8	35,3	16,5	15,3
Hornachos	26,3	33,4	17,5	15,7
Azuaga	25,1	34,2	16,1	14,9
Cazalla de la S.	25,5	34,1	17,3	16,2
La Nava de la C.	27,9	36,2	17,4	15,9
Puerto de Galis	23,7	31,5	19,0	17,5

Tabla 8: Valores de temperatura media mínima estacional de las doce poblaciones distribuidas en la Península Ibérica. Valores expresados en °C.

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Ponferrada	8,6	13,4	4,9	2,1
Destriana	7,0	12,3	3,2	0,1
Ricobayo	7,9	14,0	4,3	1,4
El Cubo	7,2	13,5	4,4	1,4
Hervás	11,6	19,6	6,8	4,1
V. del Fresno	6,9	13,1	4,7	2,2
Alburquerque	11,4	17,4	8,0	5,2
Hornachos	12,1	17,4	8,9	5,4
Azuaga	12,2	18,3	8,3	5,7
Cazalla de la S.	7,3	11,9	5,5	1,3
La Nava de la C.	13,1	18,8	9,0	5,5
Puerto de Galis	15,1	20,9	12,6	9,5

III.3.2.- Recogida de muestras.

En cada población se seleccionó un jaral con características estructurales similares (densidad, superficie, edad, etc.) y se recogieron muestras de hojas, hojarasca y suelos a lo largo de un año, una muestra por cada estación, siguiendo el mismo protocolo que se detalla en el apartado *III.2.3.1.*

III.3.3.- Extracción del exudado y preparación de muestras.

III.3.3.1.- Extracción del exudado.

Para poder determinar y cuantificar los compuestos presentes en las distintas muestras, se procede a la extracción del exudado siguiendo el protocolo descrito en el apartado *III.2.3.2.* En este caso, las muestras recogidas de suelo se utilizan sólo en los ensayos y no en la cuantificación de los compuestos, por lo que no se procede a su extracción.

III.3.3.2.- Preparación de soluciones acuosas.

Los ensayos de germinación se realizaron con soluciones acuosas procedentes de las muestras de hojas, hojarasca y suelo recogidos en cada punto de muestreo. Para la preparación de estas soluciones acuosas se procedió de la siguiente forma:

- Solución acuosa de hojas y hojarasca: 50g de hojas y hojarasca se mantienen agitando durante 24 horas en un agitador en 1 litro de agua destilada.
- Solución acuosa de suelo: Tras secar al aire los suelos de jara y pasarlos por un tamiz de 2mm de poro, se toman 100g de cada uno y se mantienen en agitación en 500ml de agua destilada durante 24 horas.

Posteriormente se filtran las soluciones y el extracto acuoso se almacena en la nevera durante su utilización.

III.3.3.3.- Preparación de sustratos.

Los ensayos se realizaron sobre diferentes sustratos: Papel Whatman nº118, suelo de jara (recogidos justo debajo de la planta), y suelo control (recogidos fuera de la influencia de la jara). Las muestras de suelo, tanto de jara como control, fueron recogidas en cada localidad de muestreo y tras un tamizado (2mm de poro) se almacenan para su utilización en los distintos ensayos de germinación.

III.3.4.- Análisis de las muestras.

El análisis de los diterpenos presentes en las muestras de hojas y hojarasca se lleva a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado ***III.2.3.3.***

III.3.5.- Ensayos de germinación.

III.3.5.1.- Ensayos de germinación en papel.

Se sembraron 25 semillas de *Rumex crispus* (la elección de estas semillas se describe en el apartado **III.1.3.1**) en placas Petri sobre papel Whatman n°118, las cuales se regaron diariamente con las soluciones acuosas obtenidas de hojas, hojarascas y suelos. Las concentraciones utilizadas de las mismas son de 1 (100g de hojas o 50g de hojarasca en 1l de agua) y 1/2 para las soluciones de hoja y hojarasca; y 1 para soluciones de suelo (100g de suelo de jaral en 500ml de agua). Cuatro réplicas de cada muestra y por concentración se mantienen durante 45 días en una cámara de cultivo a temperatura constante (25°C) y fotoperiodo de 15 horas de luz y 9 horas de oscuridad.

III.3.5.2.- Ensayos de germinación en suelos.

III.3.5.2.1.- Estudio del potencial alelopático de suelos asociados a *C. ladanifer*.

Para cuantificar la actividad alelopática de los suelos de jarales de las diferentes poblaciones seleccionadas, 30g de cada una de las muestras (suelos de jaral y suelos control) se colocan en placas Petri donde se siembran superficialmente 25 semillas de *R. crispus* (cuatro replicas) y se riegan diariamente con agua Milli-Q. Se mantienen durante 45 días en una cámara de cultivo a temperatura constante (25°C) y con un fotoperiodo de 15 horas de luz y 9 horas de oscuridad.

III.3.5.2.2.- Estudio de la actividad alelopática de los extractos acuosos de hoja, hojarasca y suelo.

En placas Petri con 30g de suelos control, se sembraron superficialmente 25 semillas de *R. crispus*. Estos suelos se riegan diariamente con las soluciones acuosas obtenidas de hojas, hojarasca y suelos. Las concentraciones utilizadas de las mismas son de 1 (100g de hojas o 50g de hojarasca en 1l de agua; 100g de suelo de jaral en 500ml de agua) y 1/2 para las soluciones de hoja y hojarasca. Cuatro réplicas de cada muestra y por concentración se mantienen durante 45 días en una cámara de cultivo a temperatura constante (25°C) y fotoperiodo de 15 horas de luz y 9 horas de oscuridad.

III.4.- PARÁMETROS MEDIDOS PARA CUANTIFICAR EL EFECTO ALELOPÁTICO.

En los ensayos realizados en este trabajo, en todos los casos se contabiliza al final de la experiencia:

- Número de semillas germinadas.
- Número de cotiledones emergidos.

Dependiendo del tipo de ensayo, al final de la experiencia se miden por placa, diez plántulas elegidas al azar:

- Longitud de las raíces.
- Longitud de los cotiledones
- Biomasa tanto húmeda como seca de las plántulas emergidas.

Para la obtención de la biomasa se pesa el total de plántulas de cada placa, obteniendo así el peso húmedo medio de cada plántula. Posteriormente, se mantienen durante 24 horas en una cámara de desecación a 100°C, obteniéndose el peso seco medio de cada plántula.

III.5.- ANÁLISIS DE LOS DATOS.

III.5.1.- Análisis estadístico en la cuantificación de diterpenos.

Debido al reducido número de datos (<30) dentro de cada muestra, para establecer si los valores eran significativamente diferentes entre dos muestras, se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney U. Se consideran diferencias significativas con $p < 0,05$.

Del mismo modo, para analizar si existían diferencias significativas al comparar los valores entre más de dos muestras, ya sean localidades o estaciones, se utilizó el test de Kruskal-Wallis. Se consideran diferencias significativas con $p < 0,05$.

III.5.2.- Análisis estadístico de los ensayos de germinación.

Los resultados de germinación, nacimientos de cotiledones, longitud de raíz y cotiledones, así como los resultados de biomasa, se expresan porcentualmente referidos al control. El cálculo de los porcentajes se hizo mediante las siguientes fórmulas:

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

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

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

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

% Biomasa seca = $(\text{Peso seco medio de plántula tratada} / \text{peso seco medio de plántula control}) \times 100$

Para establecer si los valores eran significativamente diferentes al comparar el efecto de los compuestos, o cada uno de los tratamientos, o el efecto de las distintas soluciones acuosas con sus controles, se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney U. Se consideran diferencias significativas con $p < 0,05$.

Para analizar si existían diferencias significativas entre más de dos muestras, se utilizó el test de Kruskal-Wallis. Se consideran diferencias significativas con $p < 0,05$.

IV.- Resultados

IV.1.- ESTUDIO DEL EFECTO INDIVIDUAL Y DE INTERACCIÓN, DE 11 COMPUESTOS FITOTÓXICOS PRESENTES EN EL EXUDADO DE *Cistus ladanifer* L., SOBRE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE *Rumex crispus*, BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE LUZ Y TEMPERATURA.

En este apartado se pretende dar respuesta al primer objetivo planteado en el trabajo: Determinar, en el laboratorio, el efecto de los factores ambientales luz (fotoperiodo) y temperatura, sobre la actividad alelopática de compuestos presentes en el exudado e identificados en *C. ladanifer*, así como de la acción conjunta de los mismos.

IV.1.1.- Actividad de compuestos fitotóxicos presentes en el exudado de *Cistus ladanifer* L., bajo diferentes condiciones de luz y temperatura.

En este apartado se muestra el efecto sobre la germinación y desarrollo de cotiledones y raíces de *R. crispus* de 11 compuestos con actividad alelopática identificados en el exudado de *C. ladanifer*, en las distintas condiciones de temperatura y luz ensayadas. Analizando los cuatro tratamientos en general, se distinguen tres grupos respecto a la actividad fitotóxica que presentan: compuestos con baja actividad como el ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, ácido 3-hidroxibutírico y azuleno; con actividad intermedia como el ácido cinámico y el ácido hidrocinámico; y compuestos con alta actividad como el metilpropionato y ácido butírico. Estos resultados muestran que los parámetros temperatura y luz, pueden modificar la actividad de estos compuestos, bien aumentando o disminuyéndola.

A continuación se analiza como son afectados por cada uno de los compuestos en los diferentes tratamientos, la germinación, el nacimiento de cotiledones, y el desarrollo de las plántulas, considerando para ello la longitud de raíz y cotiledones.

IV.1.1.1.- Efecto de los aleloquímicos en la germinación.

En la Tabla 1 se muestra el efecto de los aleloquímicos bajo diferentes condiciones de luz y temperatura a distintas concentraciones sobre la germinación de *R. crispus*, expresado como porcentaje relativo al control. Los resultados ponen de manifiesto la existencia de compuestos que poseen un alto efecto de inhibición a concentración 10^{-3} M independientemente del tratamiento al que sean sometidos, como es el caso del metilpropionato y el ácido butírico. Al disminuir la concentración, el efecto del metilpropionato desaparece bajo los tratamientos TA-FL (Temperatura Alta y Fotoperiodo Largo) y TA-FC (Temperatura Alta y Fotoperiodo Corto), mientras que para el resto de tratamientos sigue existiendo inhibición, aunque en menor grado. Al disminuir la

concentración del ácido butírico a 10^{-5} M, la inhibición disminuye ligeramente, aunque mantiene el efecto negativo de forma significativa (Mann-Whitney U, $p < 0,05$). Cuando se disminuye a 10^{-7} M el efecto desaparece bajo las diferentes condiciones ensayadas excepto cuando se encuentran a TA-FC.

Por otra parte, el ácido cinámico y el ácido hidrocinámico presentan una actividad intermedia, de tal manera que a concentraciones de 10^{-3} M tienen un ligero efecto de inhibición sobre la germinación (M-W, $p < 0,05$). El ácido cinámico inhibe bajo las distintas condiciones de luz y temperatura excepto cuando se ensaya a TA-FC. Es de destacar que los tratamientos bajo los que el compuesto es más activo significativamente (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) son TC-FC (Temperatura Constante y Fotoperiodo Corto) y TA-FL. En el caso del ácido hidrocinámico, a excepción de las condiciones TC-FL (Temperatura Constante y Fotoperiodo Largo), este compuesto inhibe la germinación en el resto de condiciones de luz y temperatura ensayadas, destacando que la inhibición en estos tres tratamientos es igual significativamente (K-W, $p > 0,05$). Al disminuir la concentración, tanto el ácido cinámico como el ácido hidrocinámico pierden su efecto inhibitor bajo todos los tratamientos.

El azuleno por su parte, inhibe ligeramente a concentración 10^{-3} M, cuando actúa bajo las condiciones de TC-FC y TA-FC (M-W, $p < 0,05$). Al disminuir la concentración a 10^{-4} M este compuesto mantiene el efecto negativo únicamente con el tratamiento de TC-FC.

Existen cinco compuestos que muestran inhibición a la máxima concentración ensayada bajo un único tratamiento, es decir, a unas condiciones de luz y temperatura determinadas. Tres de ellos, ácido ferúlico, ácido oxálico y ácido 3-hidroxibutírico, inhiben significativamente la germinación (M-W, $p < 0,05$) con las condiciones de TC-FC, mientras que el ácido metilmalónico y el ácido p-anísico lo hacen a TA-FC. Al bajar la concentración de todos estos compuestos el efecto negativo desaparece.

Sólo existe un compuesto, ácido 4-hidroxibenzoico, que bajo ningún tratamiento y ninguna de las concentraciones ensayadas presenta efecto negativo sobre la germinación de las semillas de *R. crispus*.

Tabla 1: Efecto de aleloquímicos de *C. ladanifer* sobre la germinación de *R. crispus* bajo diferentes tratamientos. Resultados expresados como porcentaje relativo al control.

	Concentración	% Germinación				p(K-W)
		Tratamientos				
		TC-FL	TC-FC	TA-FL	TA-FC	
Ácido Ferúlico	10 ⁻³ M	109,0	86,5*	103,5	87,8	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	96,9	86,6	101,2	109,5	> 0,05
Ácido Cinámico	10 ⁻³ M	77,9*	58,5*	58,8*	91,5	< 0,05
	10 ⁻⁵ M	94,4	89,0	100,0	89,0	< 0,05
Ácido 4-Hidroxibenzoico	10 ⁻³ M	107,0	104,9	97,0	87,1	< 0,05
	10 ⁻⁴ M	102,5	100,0	104,7	95,2	> 0,05
Ácido Hidrocinámico	10 ⁻³ M	94,4	86,5*	68,2*	81,5*	> 0,05
	10 ⁻⁴ M	105,7	96,3	85,9	87,8	> 0,05
Metilpropionato	10 ⁻³ M	0*	0*	0*	0*	> 0,05
	10 ⁻⁵ M	77,3*	69,5*	98,8	102,6	< 0,05
Ácido Oxálico	10 ⁻³ M	108,9	71,9*	102,4	92,0	> 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	85,5	107,3	103,5	89,5	< 0,05
Ácido Metilmalónico	10 ⁻³ M	108,4	97,6	102,4	82,8*	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	100,0	91,5	84,7	86,5	> 0,05
Ácido p-Anísico	10 ⁻³ M	106,8	91,5	88,2	72,9*	> 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	106,9	86,6	91,8	100,1	> 0,05
Ácido Butírico	10 ⁻³ M	0*	0*	0*	0*	> 0,05
	10 ⁻⁵ M	10,6*	7,3*	0*	3,7*	> 0,05
	10 ⁻⁷ M	97,4	93,9	89,4	81,6*	> 0,05
Ácido 3-Hidroxibutírico	10 ⁻³ M	106,8	85,3*	103,5	103,2	> 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	96,2	100,0	91,8	95,2	> 0,05
Azuleno	10 ⁻³ M	100,0	85,3*	102,4	80,3*	< 0,05
	10 ⁻⁴ M	104,4	85,3*	89,4	107,5	> 0,05

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

p (K-W): Diferencias significativas entre tratamientos; p<0,05

TC-FL: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TC-FC: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

TA-FL: Temperatura alta (20°luz-35°oscuridad) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TA-FC: Temperatura alta (20°luz-35°oscuridad) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

IV.1.1.2- Efecto de los aleloquímicos sobre el nacimiento de cotiledones.

En la Tabla 2 se expresa, como porcentaje relativo al control, el efecto sobre el nacimiento de los cotiledones de *R. crispus*. Se aprecia en general un aumento de la fitotoxicidad de la mayoría de los compuestos cuando se ensaya a condiciones de TA-FL.

Al igual que ocurriera con la germinación, los compuestos ácido metilpropionato y ácido butírico, a concentración 10^{-3} M, ejercen una inhibición total sobre el nacimiento de cotiledones, independientemente del tratamiento aplicado. Al disminuir la concentración del metilpropionato a 10^{-5} M, el efecto desaparece en todos los tratamientos excepto bajo condiciones de TC-FC. En el caso del ácido butírico hay que bajar la concentración a 10^{-7} M para que desaparezca el efecto. Únicamente bajo condiciones de TC-FC se mantiene el efecto significativo inhibitorio aunque más moderado (M-W, $p < 0,05$).

El ácido cinámico y el hidrocínámico inhiben significativamente el nacimiento de cotiledones bajo cualquier tratamiento a concentración 10^{-3} M (M-W, $p < 0,05$). La inhibición del ácido cinámico bajo el tratamiento de TA-FL es significativamente superior que bajo el resto de condiciones (K-W, $p < 0,05$); y por el contrario, el ácido hidrocínámico presenta el mismo efecto inhibitorio bajo cualquier tratamiento (K-W, $p > 0,05$).

El ácido metilmalónico, ácido p-anísico y el azuleno, ejercen inhibición significativa únicamente cuando están sometidos a TA-FL y TA-FC (M-W, $p < 0,05$). En los tres casos, no existen diferencias significativas entre el efecto que ejercen los dos tratamientos (M-W, $p > 0,05$). Al disminuir la concentración a $0,5 \cdot 10^{-3}$ M la inhibición desaparece en todos los casos a excepción del ácido p-anísico donde se mantiene bajo TA-FL.

El ácido 3-hidroxi-butírico inhibe significativamente bajo los tratamientos TC-FC y TA-FL (M-W, $p < 0,05$), aunque al disminuir la concentración, este efecto se mantiene únicamente bajo TA-FL.

Tabla 2: Efecto de aleloquímicos de *C. ladanifer* sobre el nacimiento de cotiledones de *R. crispus* bajo diferentes tratamientos. Resultados expresados como porcentaje relativo al control.

	Concentración	% Cotiledones				<i>p</i> (K-W)
		Tratamientos				
		TC-FL	TC-FC	TA-FL	TA-FC	
Ácido Ferúlico	10 ⁻³ M	110,0	88,7*	95,1	95,3	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	102,4	87,5	91,4	105,5	> 0,05
Ácido Cinámico	10 ⁻³ M	59,3*	50*	7,4*	77,3*	< 0,05
	10 ⁻⁵ M	97,5	87,5	86,4	93,9	> 0,05
Ácido 4-Hidroxibenzoico	10 ⁻³ M	111,4	103,8	-	84,2*	< 0,05
	10 ⁻⁴ M	109,7	102,5	101,2	103,6	> 0,05
Ácido Hidrocinámico	10 ⁻³ M	50*	87,5*	67,9*	87*	> 0,05
	10 ⁻⁴ M	103,6	97,5	83,9*	75,9*	> 0,05
Metilpropionato	10 ⁻³ M	0*	0*	0*	0*	> 0,05
	10 ⁻⁵ M	91,0	67,5*	87,7	110,5	< 0,05
Ácido Oxálico	10 ⁻³ M	100,0	71,2*	86,4	96,7	> 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	109,0	108,8	103,7	91,2	> 0,05
Ácido Metilmalónico	10 ⁻³ M	114,9	96,3	75,3*	80,5*	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	105,1	92,6	101,2	93,9	> 0,05
Ácido p-Anísico	10 ⁻³ M	105,4	93,8	54,3*	71,8*	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	110,5	88,8	85,1*	100,8	< 0,05
Ácido Butírico	10 ⁻³ M	0*	0*	0*	0*	> 0,05
	10 ⁻⁵ M	0*	0*	0*	0*	> 0,05
	10 ⁻⁷ M	110,7	96,3	77,7*	91,2	< 0,05
Ácido 3-Hidroxibutírico	10 ⁻³ M	102,3	86,2*	80,2*	102,2	> 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	107,8	101,3	79*	98,1	< 0,05
Azuleno	10 ⁻³ M	100,5	86,3	75,3*	82,8*	< 0,05
	10 ⁻⁴ M	108,7	86,3	96,3	107,7	> 0,05

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

p (K-W): Diferencias significativas entre tratamientos; $p < 0,05$

TC-FL: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TC-FC: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

TA-FL: Temperatura alta (20°luz-35°oscuridad) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TA-FC: Temperatura alta (20°luz-35°oscuridad) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

El resto de compuestos, ácido ferúlico y ácido oxálico, solamente actúan negativamente sobre el nacimiento de cotiledones cuando se ensaya con TC-FC y el ácido 4-hidroxibenzoico con TA-FC (M-W, $p < 0,05$). Al bajar la concentración el efecto desaparece.

IV.1.1.3.- Efecto de los aleloquímicos sobre el tamaño de las raíces.

En general, se observa que existe un gran efecto inhibitorio sobre el tamaño de las raíces por parte de todos los compuestos y en todas las condiciones. Similar a los resultados obtenidos para la germinación y nacimiento de cotiledones, el ácido metilmalónico y el ácido butírico, a concentración 10^{-3} M, son los compuestos que más afectan negativamente el tamaño de la raíz (M-W, $p < 0,05$) (Tabla 3). Al disminuir la concentración a 10^{-4} M, el metilpropionato mantiene la inhibición de forma significativa con los tratamientos de TA-FL y TA-FC, perdiendo el efecto con los tratamientos de TC-FL y TC-FC. El ácido butírico deja de ser activo a la concentración de 10^{-7} M, en todas las condiciones (M-W, $p > 0,05$).

Compuestos como el ácido cinámico, ácido hidrocínámico, ácido p-anísico, y azuleno también presentan inhibición significativa bajo todos los tratamientos, aunque no todas las condiciones afectan por igual a la actividad de los compuestos. Así, el ácido cinámico ejerce menor inhibición a TA-FC que bajo el resto de los tratamientos (K-W, $p < 0,05$); el ácido hidrocínámico junto con el azuleno presentan mayor inhibición a TA-FL (K-W, $p < 0,05$), y el ácido p-anísico actúa más negativamente a TA-FL y TA-FC (K-W, $p < 0,05$). Al bajar las concentraciones, el efecto negativo permanece aunque en menor grado. Únicamente el ácido cinámico a concentración 10^{-5} M pierde su actividad negativa.

El ácido ferúlico y el ácido metilmalónico inhiben el tamaño de la raíz, a concentración 10^{-3} M, bajo todos los tratamientos ensayados, excepto cuando son sometidos a TC-FC. No existen diferencias significativas entre los tratamientos con efecto negativo (K-W, $p > 0,05$). Cuando se ensaya con concentraciones más bajas, el ácido ferúlico mantiene su actividad en los tratamientos de TA-FL y TA-FC y el ácido metilmalónico únicamente con TC-FL.

Tabla 3: Efecto de aleloquímicos de *C. ladanifer* sobre la longitud de la raíz de *R. crispus* bajo diferentes tratamientos . Resultados expresados como porcentaje relativo al control.

	Concentración	% Longitud de Raíz				<i>p</i> (<i>K-W</i>)
		Tratamientos				
		TC-FL	TC-FC	TA-FL	TA-FC	
Ácido Ferúlico	10 ⁻³ M	84,65*	88,3	64,99*	69,56*	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	85,5	96,3	76,5*	73,8*	< 0,05
Ácido Cinámico	10 ⁻³ M	8,91*	8,2*	8,61*	25,22*	< 0,05
	10 ⁻⁵ M	81,5*	109,0	83,1	84,6	< 0,05
Ácido 4-Hidroxibenzoico	10 ⁻³ M	84,64*	102,0	-	93,6	< 0,05
	10 ⁻⁴ M	79,6*	101,0	85,8	94,4	< 0,05
Ácido Hidrocinámico	10 ⁻³ M	48,15*	61,29*	31,56*	59,81*	< 0,05
	10 ⁻⁴ M	81,1*	103,0	71,7*	64,5*	< 0,05
Metilpropionato	10 ⁻³ M	0*	0*	0*	0*	> 0,05
	10 ⁻⁵ M	90,3	98,5	57,7*	79,4*	< 0,05
Ácido Oxálico	10 ⁻³ M	82,68*	85,5	59,97*	101,5	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	89,0	94,1	109,0	108,0	< 0,05
Ácido Metilmalónico	10 ⁻³ M	76,7*	85,3	73,7*	76,1*	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	83,27*	98,7	97,4	101,3	< 0,05
Ácido p-Anísico	10 ⁻³ M	68,35*	69,13*	51,94*	56,30*	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	87,6	91,7	63,8*	74,4*	< 0,05
Ácido Butírico	10 ⁻³ M	0*	0*	0*	0*	> 0,05
	10 ⁻⁵ M	7,54*	7,29*	0*	5,2*	< 0,05
	10 ⁻⁷ M	99,6	102,0	95,0	103,8	> 0,05
Ácido 3-Hidroxibutírico	10 ⁻³ M	79,14*	97,9	77,62*	100,8	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	99,9	103,2	63,3*	87,6	< 0,05
Azuleno	10 ⁻³ M	30*	45,17*	25,82*	52,66*	< 0,05
	10 ⁻⁴ M	67,16*	86,1	84,6*	84,3*	< 0,05

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

p (*K-W*) : Diferencias significativas entre tratamientos; $p < 0,05$

TC-FL: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TC-FC: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

TA-FL: Temperatura alta (20°luz-35°oscuridad) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TA-FC: Temperatura alta (20°luz-35°oscuridad) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

El ácido oxálico y el ácido 3-hidroxi-butírico, a la concentración más alta seleccionada, inhiben en las condiciones de TC-FL y TA-FL. En el caso del ácido oxálico existen diferencias significativas entre estos dos tratamientos, siendo con TA-FL cuando se registra una inhibición significativamente mayor (K-W, $p < 0,05$). Al disminuir la concentración de estos compuestos el efecto desaparece (M-W, $p > 0,05$) a excepción del ácido oxálico, el cual mantiene inhibición significativa cuando es incubado con TA-FL. Por último, el Ácido 4-hidroxi-benzoico solamente inhibe el tamaño de la raíz cuando es expuesto a TA-FL con las dos concentraciones ensayadas.

IV.1.1.4.- Efecto de los aleloquímicos sobre el tamaño de los cotiledones.

El efecto sobre el tamaño de los cotiledones de las plántulas de *R. crispus*, se exponen en la Tabla 4. A concentración $10^{-3}M$, el ácido metilpropionato y el ácido butírico inhiben totalmente este parámetro, dejando de ejercer efecto negativo a concentración $10^{-5}M$ el metilpropionato y a $10^{-7}M$ el butírico.

El ácido cinámico y el ácido 3-hidroxi-butírico inhiben significativamente bajo todos los tratamientos (M-W, $p < 0,05$), con excepción de TC-FC para el cinámico y TA-FC para el hidroxi-butírico. Es de destacar que, el efecto del ácido cinámico es significativamente mayor cuando es sometido a TC-FL y TA-FL (K-W, $p < 0,05$). Al disminuir la concentración, la inhibición desaparece y sólo el ácido 3-hidroxi-butírico mantiene la inhibición a TA-FL.

Por su parte, los siguientes compuestos; ácido ferúlico, ácido hidrocinámico y ácido p-anísico inhiben significativamente bajo los tratamientos de TC-FL y TA-FL (M-W, $p < 0,05$), y el ácido oxálico a TC-FL y TC-FC. No en todos los casos, el efecto de cada tratamiento es el mismo. Así, el ácido ferúlico presenta una inhibición significativamente mayor con el tratamiento TC-FL que con TA-FL (K-W, $p < 0,05$). El resto de compuestos inhiben significativamente sólo cuando se ensaya con ellos a TC-FL para el ácido 4-hidroxi-benzoico; TC-FL para ácido metilmalónico, y TA-FL para el azuleno. Al bajar la concentración, la inhibición ejercida sobre el tamaño de los cotiledones desaparece.

Tabla 4: Efecto de aleloquímicos de *C. ladanifer* sobre la longitud de los cotiledones de *R. crispus* bajo diferentes tratamientos. Resultados expresados como porcentaje relativo al control.

	Concentración	% Longitud de Cotiledones				p(K-W)
		Tratamientos				
		TC-FL	TC-FC	TA-FL	TA-FC	
Ácido Ferúlico	10 ⁻³ M	73,65*	88,4	87,27*	90,7	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	100,0	90,5	94,8	100,5	> 0,05
Ácido Cinámico	10 ⁻³ M	53,68*	92,6	46,75*	86,45*	< 0,05
	10 ⁻⁵ M	106,9	104,7	96,6	89,8	> 0,05
Ácido 4-Hidroxibenzoico	10 ⁻³ M	73,64*	94,1	-	106,6	< 0,05
	10 ⁻⁴ M	88,2	105,9	101,3	111,9	< 0,05
Ácido Hidrocinámico	10 ⁻³ M	65,36*	92,7	62,34*	99,8	< 0,05
	10 ⁻⁴ M	90,4	102,1	103,9	95,8	> 0,05
Metilpropionato	10 ⁻³ M	0*	0*	0*	0*	> 0,05
	10 ⁻⁵ M	109,0	86,7	89,3	92,3	< 0,05
Ácido Oxálico	10 ⁻³ M	72,30*	82,99*	96,6	94,0	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	99,4	93,5	102,6	95,6	> 0,05
Ácido Metilmalónico	10 ⁻³ M	80,51*	96,5	101,3	97,8	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	108,2	87,0	87,0	92,9	< 0,05
Ácido p-Anísico	10 ⁻³ M	72,30*	94,1	80*	95,9	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	107,3	90,7	100,8	89,6	< 0,05
Ácido Butírico	10 ⁻³ M	0*	0*	0*	0*	> 0,05
	10 ⁻⁵ M	0*	0*	0*	0*	> 0,05
	10 ⁻⁷ M	108,6	99,8	97,4	100,1	> 0,05
Ácido 3-Hidroxibutírico	10 ⁻³ M	73,29*	74,53*	82,86*	105,0	< 0,05
	0,5·10 ⁻³ M	106,9	86,2	81,03*	101,9	< 0,05
Azuleno	10 ⁻³ M	102,6	97,2	67,53*	103,9	< 0,05
	10 ⁻⁴ M	117,3	96,4	105,7	106,3	> 0,05

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

p (K-W) : Diferencias significativas entre tratamientos; p<0,05

TC-FL: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TC-FC: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

TA-FL: Temperatura alta (20°luz-35°oscuridad) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TA-FC: Temperatura alta (20°luz-35°oscuridad) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

IV.1.2.- Actividad derivada de la interacción de compuestos fitotóxicos presentes en el exudado de *C. ladanifer* L., bajo diferentes condiciones de luz y temperatura.

IV.1.2.1.- Efecto de la interacción de los aleloquímicos sobre la germinación.

La Tabla 5 muestra un gran efecto de inhibición en la germinación ejercida por las mezclas de los distintos compuestos, bajo la mayoría de las condiciones ensayadas (M-W; $p > 0,05$). La mayor actividad negativa sobre este parámetro por parte de todas las mezclas es bajo condiciones de TA-FL, seguido por TC-FL. Los porcentajes de inhibición alcanzados en estos ensayos son muy altos, siendo las mezclas 1 y 2 las que menor efecto ejercen. Los dos únicos casos en los que no existe inhibición significativa son cuando se ensaya con la mezcla 1 bajo el tratamiento TC-FC y con la mezcla 2 bajo TA-FC (M-W; $p > 0,05$). Al disminuir la concentración de todas las mezclas, se observa una clara bajada en la actividad de estos compuestos llegando incluso en algunos casos a desaparecer.

Hay que destacar, al igual que cuando se ensaya con los compuestos por separado, que la actividad de las mezclas puede verse potenciada o disminuida dependiendo de las condiciones del tratamiento. De esta forma, a concentración 10^{-3} M, las mezclas 4, 7, 8 y 10 no ven alterado significativamente su actividad inhibidora en función de las condiciones climáticas (K-W; $p > 0,05$). Sin embargo, las mezclas 1, 2, 3, 5, 6 y 9 si presentan diferencias significativas entre los tratamientos (K-W; $p < 0,05$). Con estas mezclas, la inhibición es significativamente mayor cuando son sometidos a TC-FL y TA-FL.

Al bajar la concentración a $0,5 \cdot 10^{-3}$ M, la actividad de las mezclas es alterada igualmente por la influencia de la luz y temperatura, de tal manera que las mezclas 6, 7 y 8 presentan una inhibición significativamente mayor bajo los tratamientos de TA-FL y TA-FC, que bajo los tratamientos TC-FL y TC-FC (K-W; $p < 0,05$). La mezcla 5 ejerce un efecto negativo significativamente superior con el tratamiento TA-FC, y la mezcla 10 con TA-FL (M-W; $p < 0,05$).

El resto de las mezclas, o pierden su actividad a esta concentración (como le sucede a las mezclas 1 y 3) o no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos bajo los que existe inhibición (K-W; $p > 0,05$).

Tabla 5: Efecto de las mezclas de aleloquímicos de *C. ladanifer*, sobre la germinación de *R. crispus*, bajo diferentes tratamientos. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

Mezclas	% Germinación							
	TC-FL		TC-FC		TA-FL		TA-FC	
	10^{-3} M	$0,5 \cdot 10^{-3}$ M	10^{-3} M	$0,5 \cdot 10^{-3}$ M	10^{-3} M	$0,5 \cdot 10^{-3}$ M	10^{-3} M	$0,5 \cdot 10^{-3}$ M
1	40,3	97,3*	89*	93,9*	28,2	94,1*	73,5	83,8
2	20,8	74,3	68,3	97,5*	12,9	84,7*	101,8*	104,4*
3	3,8	39,4	65,9	53,6	0	97,6*	28,2	60,4
4	4,5	34,4	1,2	42,7	0	49,4	5,5	102,7*
5	10,0	49,7	41,5	79,3	3,5	64,7	4,7	24,1
6	7,8	38,3	1,2	31,7	0	11,8	4,0	6,2
7	0,6	20,5	4,9	47,6	0	5,9	0	8,9
8	0	18,5	1,2	13,4	0	0,0	1,1	0
9	15,4	72,2	7,3	65,8	1,2	83,7*	26,5	90,2*
10	0,6	7,4	2,4	2,4	0	0	1,1	2,9

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

TC-FL: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TC-FC: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

TA-FL: Temperatura alta (20° luz- 35° oscuridad) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TA-FC: Temperatura alta (20° luz- 35° oscuridad) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

IV.1.2.2.- Efecto de la interacción de los aleloquímicos sobre el nacimiento de cotiledones.

Al igual que para la germinación, los mayores porcentajes de inhibición se producen bajo el tratamiento TA-FL, donde la inhibición de los cotiledones es prácticamente total cuando se ensaya con todas las mezclas, a excepción de la mezcla 2 (Tabla 6). El porcentaje de inhibición con las mezclas 3 y 5 a concentración 10^{-3}M es significativamente diferente (K-W; $p < 0,05$) dependiendo del tratamiento aplicado. De tal manera, que cuando se ensaya a TC-FC, la inhibición que ejercen estas mezclas sobre la emergencia de cotiledones es significativamente menor (M-W; $p < 0,05$) que a TA-FL, TA-FC y TC-FL, entre los que no existen diferencias significativas (K-W; $p > 0,05$).

Las mezclas 1 y 2, a concentración 10^{-3}M , inhiben significativamente (M-W; $p < 0,05$), pero son los tratamientos TA-FL y TC-FL bajo los que estas mezclas ejercen una inhibición significativamente mayor (M-W; $p < 0,05$).

Con el resto de mezclas ensayadas no se altera el efecto de forma significativa al variar las condiciones de los tratamientos, ejerciendo éstas un efecto prácticamente total de inhibición.

Al disminuir la concentración a $0,5 \cdot 10^{-3}\text{M}$, la inhibición se reduce, aunque se mantiene en la mayoría de las mezclas, con excepción de la mezcla 1 a TC-FC y TA-FL, y la mezcla 2 a TC-FC y TA-FC.

Se puede detectar que existen cinco mezclas, 1, 2, 3, 8 y 10 cuya inhibición sobre el nacimiento de cotiledones no se modifica dependiendo de los tratamientos a los que estén sometidos. Por el contrario, el efecto que ejerce el resto de las mezclas es alterado de forma muy diversa por los distintos tratamientos. Así, siendo de forma general, los ensayos realizados bajo condiciones de TA-FL donde presentan mayor inhibición.

Tabla 6 Efecto de las mezclas de aleloquímicos de *C. ladanifer*, sobre el nacimiento de cotiledones de *R. crispus*, bajo diferentes tratamientos. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

Mezclas	% Cotiledones							
	TC-FL		TC-FC		TA-FL		TA-FC	
	10 ⁻³ M	0,5·10 ⁻³ M						
1	36,7	76,0	76,5	91,5*	7,4	85,2*	67,2	81,4
2	2,1	53,3	60,0	93,8*	2,5	56,8	83,7*	99,5*
3	1,4	24,4	42,5	48,8	0	55,8	4,5	58,6
4	0	20,5	0	28,8	0	6,2	1,4	60,8
5	5,2	39,8	12,5	75,0	0	28,4	2,4	14,3
6	0	19,0	0	13,8	0	0,0	0	0
7	0	6,0	0	36,3	0	1,2	0	7,6
8	0	4,9	0	1,3	0	0	0	0
9	5,3	49,0	1,3	0	0	18,5	7,8	87,1*
10	0	0	0	0,6	0	0	0	1,4

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

TC-FL: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TC-FC: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

TA-FL: Temperatura alta (20°luz-35°oscuridad) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TA-FC: Temperatura alta (20°luz-35°oscuridad) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

IV.1.2.3.- Efecto de la interacción de los aleloquímicos sobre la longitud de las raíces.

En la Tabla 7 se observa como, todas las mezclas sin excepción ejercen una fuerte inhibición sobre el tamaño de las raíces bajo todos los tratamientos. Las condiciones de estos tratamientos pueden condicionar la fitotoxicidad de las mezclas, y por tanto, su efecto sobre el desarrollo de las raíces de las plántulas. Así, a concentración 10⁻³M, los porcentajes de inhibición varían de forma significativa dependiendo del tratamiento que estemos aplicando.

Esto sucede para todas las mezclas, con excepción de las mezclas 1, 5, 8 y 9, cuya inhibición es igual significativamente bajo cualquier tratamiento (K-W; $p>0,05$).

Al disminuir la concentración hasta $0,5 \cdot 10^{-3}M$, se observan diferencias en el efecto de las mezclas 1, 5, 8 y 9 dependiendo de las condiciones, siendo significativamente mayor la inhibición bajo TA-FL y TA-FC que frente a TC-FL y TC-FC (M-W; $p<0,05$). Las mezclas 2, 3, 4, 6, 7 y 10, que a $10^{-3}M$ presentan diferencias significativas (K-W; $p<0,05$) entre los tratamientos, a $0,5 \cdot 10^{-3}M$ el efecto deja de ser significativamente diferente (K-W; $p>0,05$).

Tabla 7: Efecto de las mezclas de aleloquímicos de *C. ladanifer*, sobre la longitud de la raíz de *R. crispus*, bajo diferentes tratamientos. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

Mezclas	% Longitud de Raíz							
	TC-FL		TC-FC		TA-FL		TA-FC	
	$10^{-3}M$	$0,5 \cdot 10^{-3}M$	$10^{-3}M$	$0,5 \cdot 10^{-3}M$	$10^{-3}M$	$0,5 \cdot 10^{-3}M$	$10^{-3}M$	$0,5 \cdot 10^{-3}M$
1	8,7	79,0	17,1	80,8	11,5	45,9	20,1	51,3
2	3,9	18,0	19,1	28,2	11,5	40,2	23,7	29,4
3	3,9	12,0	4,4	6,8	0	11,5	5,0	13,7
4	3,9	3,9	0	5,5	0	12,9	7,7	8,5
5	3,9	10,8	3,6	17,4	5,7	8,6	7,7	5,6
6	6,8	6,4	7,3	5,2	0	11,5	10,3	9,5
7	0,9	3,9	9,7	3,6	0	7,7	0,0	4,6
8	0	4,9	3,6	3,8	0	0	5,2	0
9	4,6	37,5	4,6	19,1	5,7	12,9	6,6	12,7
10	1,2	7,5	3,6	3,6	0	0	10,3	7,7

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

TC-FL: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TC-FC: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

TA-FL: Temperatura alta (20° luz- 35° oscuridad) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TA-FC: Temperatura alta (20° luz- 35° oscuridad) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

IV.1.2.4.- Efecto de la interacción de los aleloquímicos sobre la longitud de los cotiledones.

El efecto sobre el tamaño de los cotiledones se muestra en la Tabla 8. Al igual que ocurre con el resto de parámetros estudiados, la mayoría de las mezclas ejercen una fuerte inhibición. Existen tres mezclas (1, 2 y 3) en las que se aprecia un efecto negativo dependiente de los tratamientos. Así, por ejemplo, a concentración 10^{-3} M, la mezcla 1, ejerce un efecto negativo únicamente bajo las condiciones de TA-FL; la mezcla 2 con TC-FL y TA-FL; y la mezcla 3 a TC-FC (M-W; $p < 0,05$).

El resto de mezclas presentan inhibición bajo todos los tratamientos apreciándose nuevamente diferencias dependiendo de las condiciones ensayadas. Así, para las mezclas 4, 5 y 9 las condiciones de TA-FL producen una inhibición significativamente mayor que el resto (M-W; $p < 0,05$). Por el contrario, los porcentajes de inhibición de las mezclas 6, 7, 8 y 10 no presentan diferencias significativas a las distintas condiciones ensayadas (M-W; $p > 0,05$).

Al disminuir la concentración, el efecto negativo sobre el tamaño de los cotiledones en la mayoría de los casos disminuye, llegando incluso a desaparecer. Esto sucede con la mezcla 1 y 2 bajo el tratamiento TA-FL, la mezcla 3 en TC-FC y TA-FL, la mezcla 4 con TA-FC, la mezcla 5 con los tratamientos TC-FL y TC-FC, y la mezcla 9 bajo TC-FL, TC-FC y TA-FC. El resto de mezclas y tratamientos mantienen la inhibición.

En general, la actividad de las mezclas sobre el tamaño de cotiledones varía dependiendo de los tratamientos, siendo los ensayos realizados a TA-FL los que presentan una inhibición significativamente mayor.

Tabla 8: Efecto de las mezclas de aleloquímicos de *C. ladanifer*, sobre la longitud de los cotiledones de *R. crispus*, bajo diferentes tratamientos. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

Mezclas	% Longitud de Cotiledones							
	TC-FL		TC-FC		TA-FL		TA-FC	
	10 ⁻³ M	0,5·10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	0,5·10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	0,5·10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	0,5·10 ⁻³ M
1	90*	92*	88,2*	94,7*	41,5	103,8*	92,3*	96,2*
2	19,0	82,0	91,7*	81,0	20,8	85,71*	93,0*	100,5*
3	40,0	61,0	81,8	97,1*	0	96,05*	87,3*	84,6
4	0	82,0	0	71,2	0	46,8	45,2	87,9*
5	34,0	102*	20,6	87,9*	0	77,9	31,6	75,3
6	0	59,0	0	40,4	0	0	0	0
7	0	52,0	0	65,7	0	51,9	0	76,1
8	0	22,0	0	31,6	0	0	0	0
9	52,8	86,1*	19,0	96,5*	0	67,5	76,9	93,5*
10	0	0	0	31,7	0	0	0	45,2

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

TC-FL: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TC-FC: Temperatura constante (25°) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

TA-FL: Temperatura alta (20°luz-35°oscuridad) y fotoperiodo largo (15 h de luz-9 h oscuridad)

TA-FC: Temperatura alta (20°luz-35°oscuridad) y fotoperiodo corto (9 h de luz-15 h oscuridad)

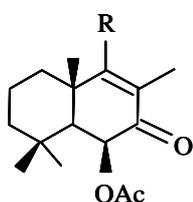
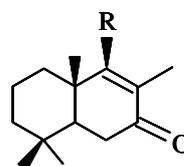
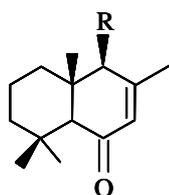
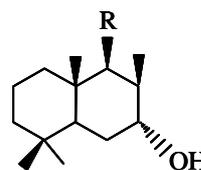
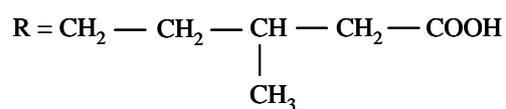
**IV.2.- IDENTIFICACIÓN, COMPROBACIÓN DE ACTIVIDAD
POTENCIAL Y CUANTIFICACIÓN DE DITERPENOS EN *C.ladanifer* L.**

En este capítulo, se muestran los resultados del segundo objetivo particular planteado en este trabajo. Por un lado, identificar el resto de compuestos mayoritarios del exudado que aún no había sido caracterizado y cuantificar su posible capacidad fitotóxica. Por otro lado, cuantificar la presencia de estos compuestos en las hojas, hojarasca y suelos de jarales a lo largo del año. Y por último, en laboratorio y bajo condiciones controladas, conocer cuales son los factores responsables de la síntesis de estos compuestos, estudiando la secreción de los mismos en respuesta a distintos valores de temperatura y humedad.

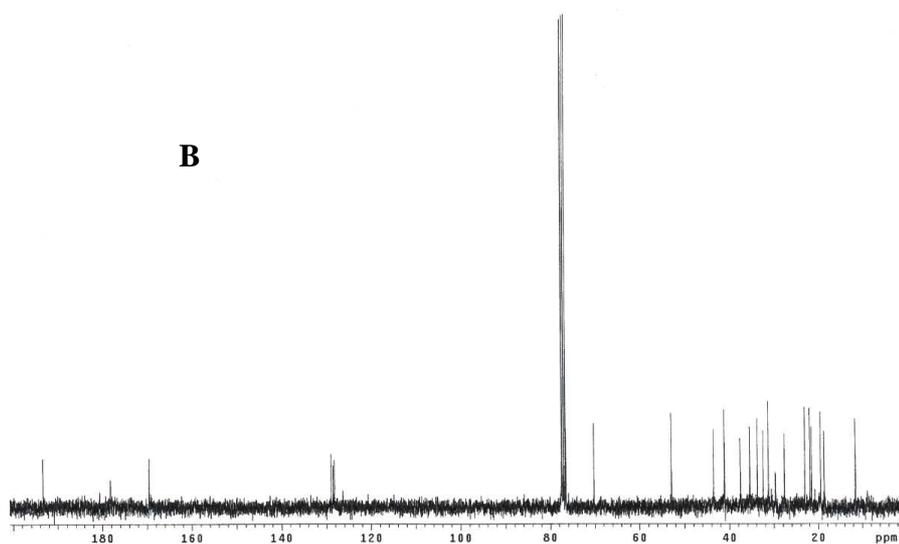
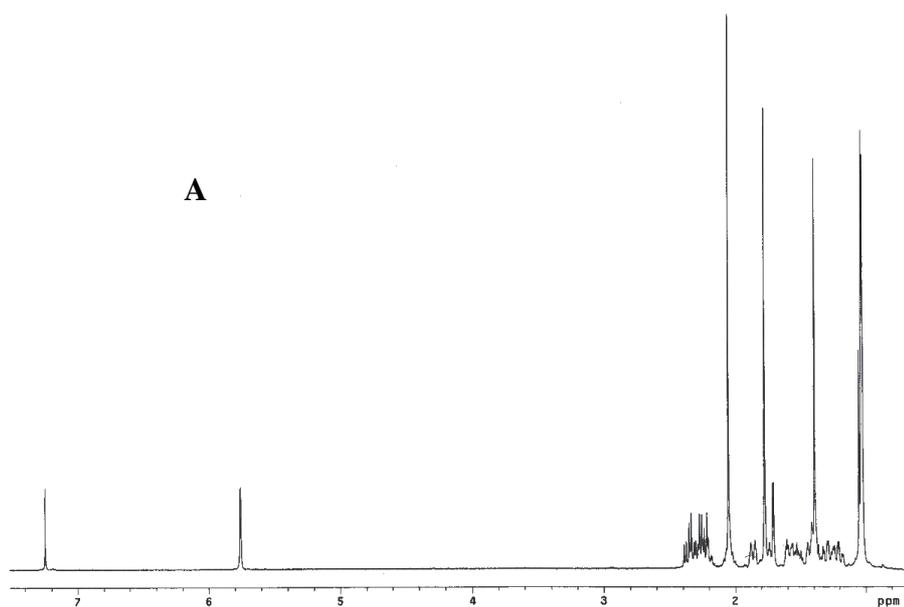
IV.2.1- Identificación de diterpenos en el exudado de *C. ladanifer* L.

Tras los procesos de extracción, separación y purificación descritos en el apartado de materiales y métodos, se procedió a la identificación de estos compuestos gracias a los “perfiles de RMN” y fuentes bibliográficas (Pascual y col., 1977, 1979, 1982). Los compuestos identificados fueron cuatro diterpenos:

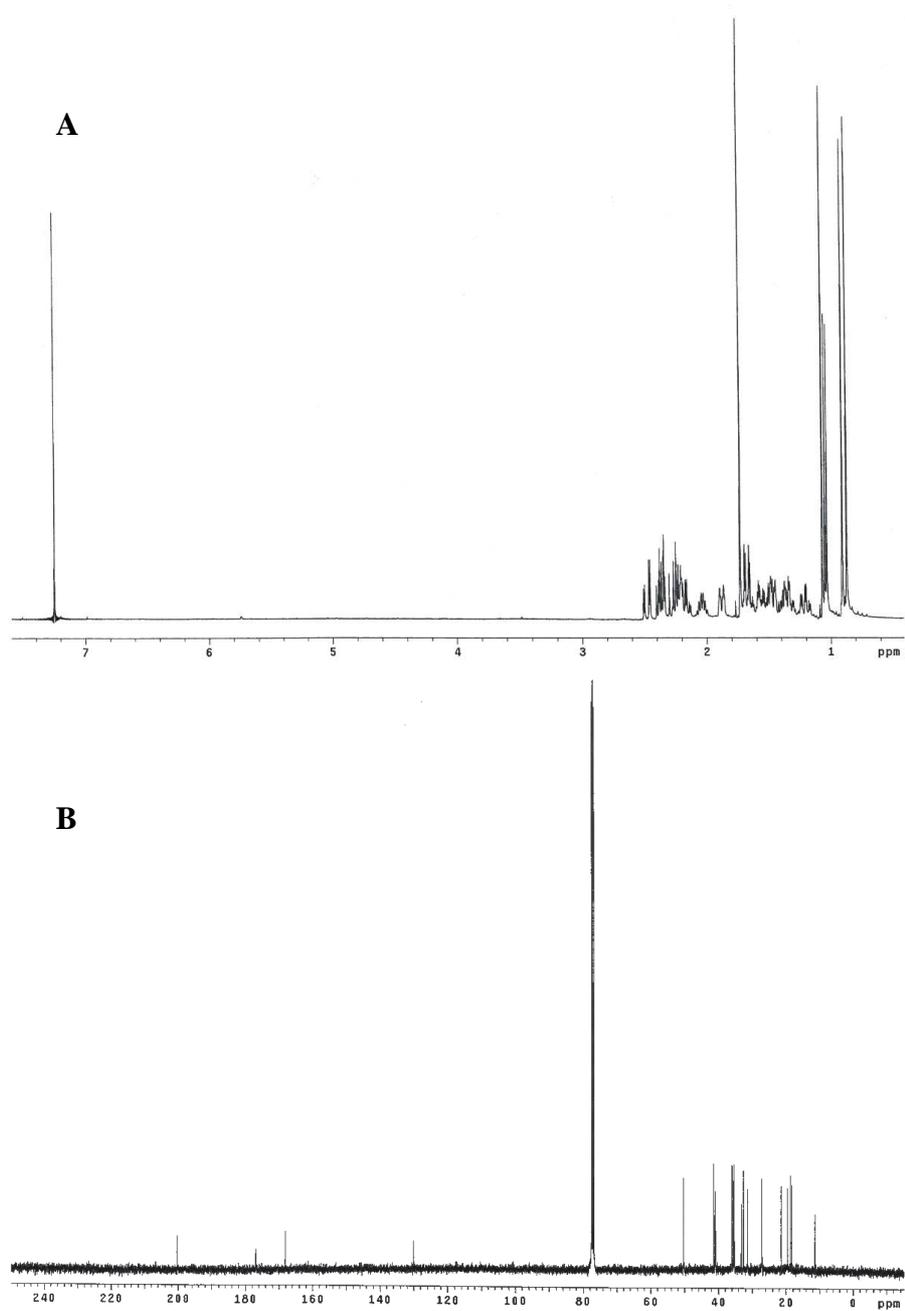
- **D1.** Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico. M_r :378, λ :255
- **D2.** Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico. M_r :320, λ :249
- **D3.** Ácido 6-oxocatívico M_r :320, λ :238
- **D4.** Ácido labdanólico. M_r :324

**D1****D2****D3****D4**

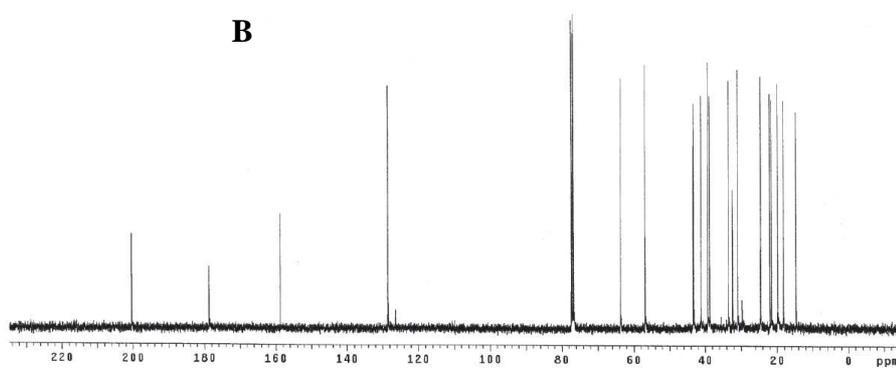
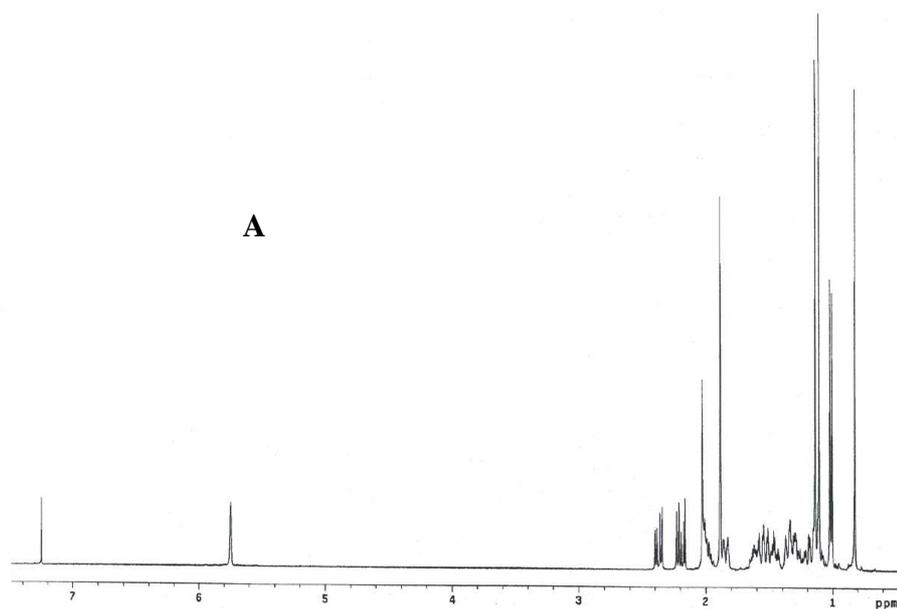
A continuación se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear obtenidos para la purificación e identificación de los cuatro diterpenos estudiados (Espectros D1-D4):



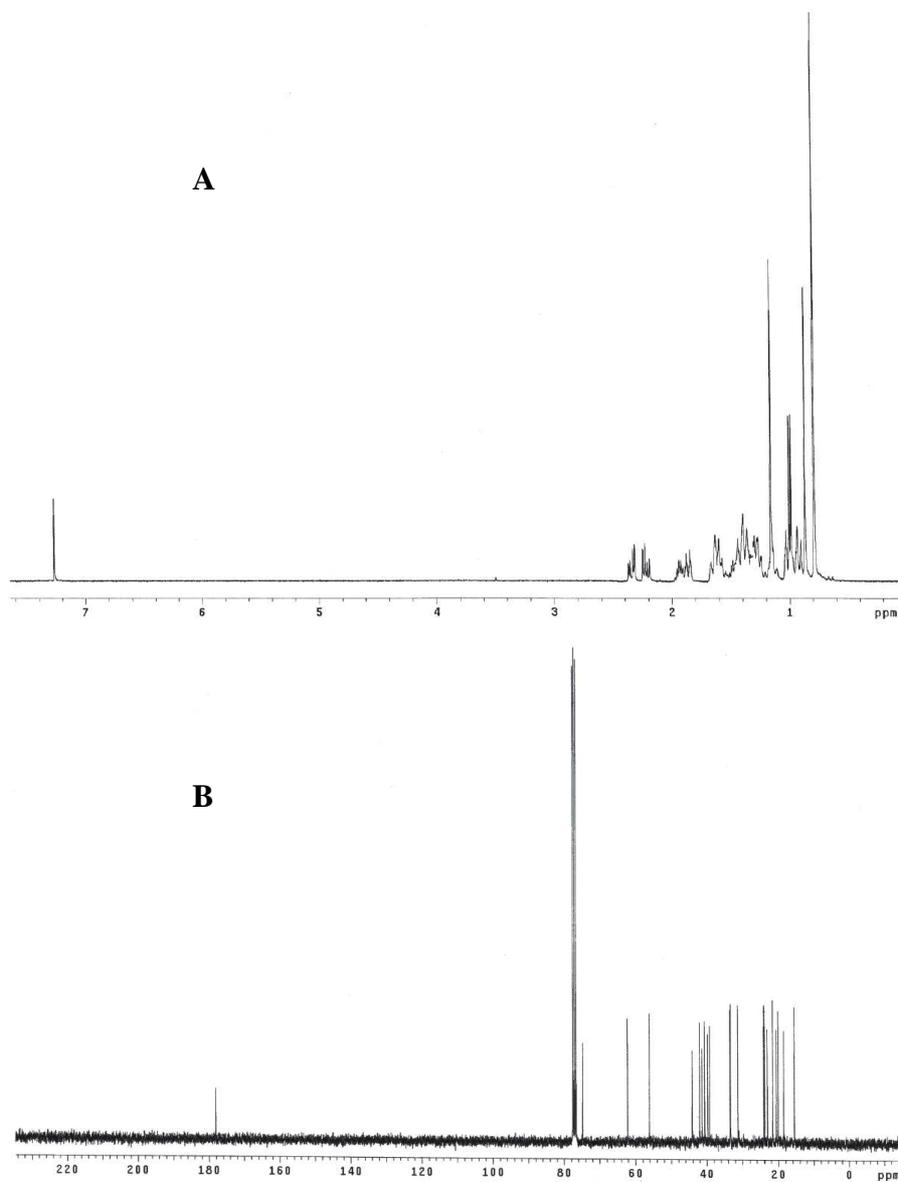
Espectro D1: Espectros de resonancia magnética nuclear del 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico.
A) ^1H RMN. B) ^{13}C RMN



Espectro D2: Espectros de resonancia magnética nuclear del Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico.
A) ^1H RMN. B) ^{13}C RMN



Espectro D3: Espectros de resonancia magnética nuclear del Ácido oxocárvico. A) ¹H RMN.
B) ¹³C RMN



Espectro D4: Espectros de resonancia magnética nuclear del Ácido labdanólico. **A)** ^1H RMN.
B) ^{13}C RMN

IV.2.2.- Actividad de los diterpenos identificados en el exudado de *C. ladanifer* L.

Una vez identificados los cuatro diterpenos se purificaron en cantidad suficiente para comprobar su bioactividad mediante bioensayos con coleoptilos etiolados de trigo y STS.

A partir de 100g de hoja se obtuvieron 12g de exudado bruto, del cual se aislaron, con gran dificultad, las siguientes cantidades de compuestos puros para realizar los ensayos:

- 13,3 mg de Ácido 6 β -acetoxo-7-oxo-8-labden-15-oico. (D1).
- 4,4 mg de Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico. (D2).
- 45,1 mg de Ácido oxocatívico (D3).
- 125,7 mg de Ácido labdanólico. (D4).

IV.2.2.1.- Actividad de diterpenos sobre coleoptilos etiolados de trigo.

En la Figura 1 se observa, a modo de ejemplo, el efecto real del diterpeno D1 sobre la capacidad de elongación de los coleoptilos etiolados de trigo.

Como se observa en las Figuras 2 y 3, a concentración 10^{-3} M, todos los compuestos inhiben el crecimiento de los coleoptilos alrededor de un 80%, alcanzando el D1 un máximo del 90%. Al disminuir la concentración a 10^{-4} M, la inhibición de la elongación de los coleoptilos se reduce en todos los casos, siendo el compuesto D1 el que presenta menor actividad con un porcentaje del 25%. Por su parte, el D3 mantiene un porcentaje de inhibición del 45%, seguido del D2 y del D4.

Cuando se ensaya con concentraciones más bajas, la actividad de los cuatro diterpenos se reduce, aunque mantienen niveles alrededor del 20%. Es de destacar, que en el

caso del D3, la actividad a concentración 10^{-6}M es mayor que a concentración 10^{-5}M en ambas réplicas.

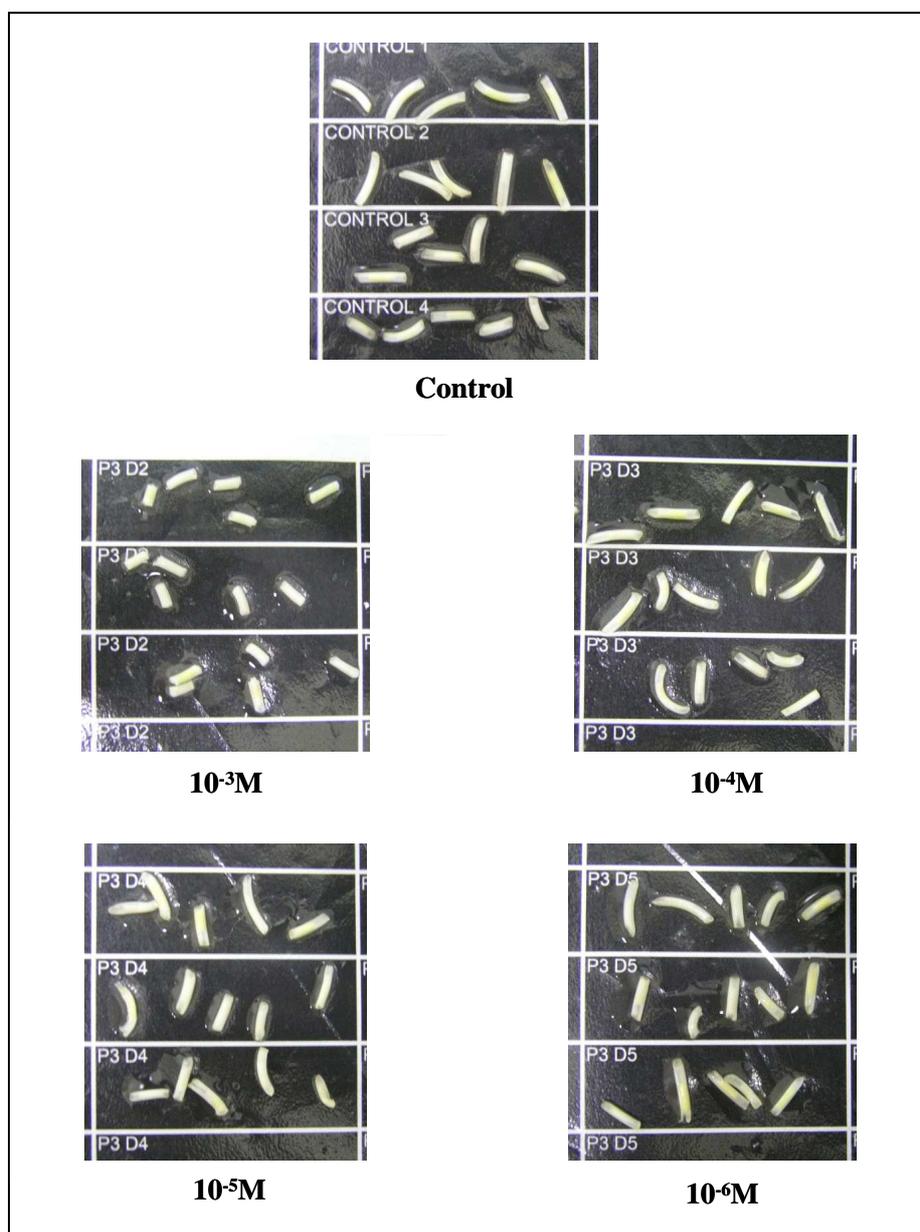


Figura 1: Efecto del Ácido 6-β-acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico, a distintas concentraciones, sobre la capacidad de elongación de coleoptilos etiolados de trigo. Valores medidos por Photomed®.

Esta experiencia se realiza por duplicado y el comportamiento de los cuatro diterpenos es el mismo en ambas réplicas: se aprecia un fuerte efecto en la disminución de la elongación del coleoptilo a altas concentraciones, el cual se ve reducido al ir disminuyendo la concentración.

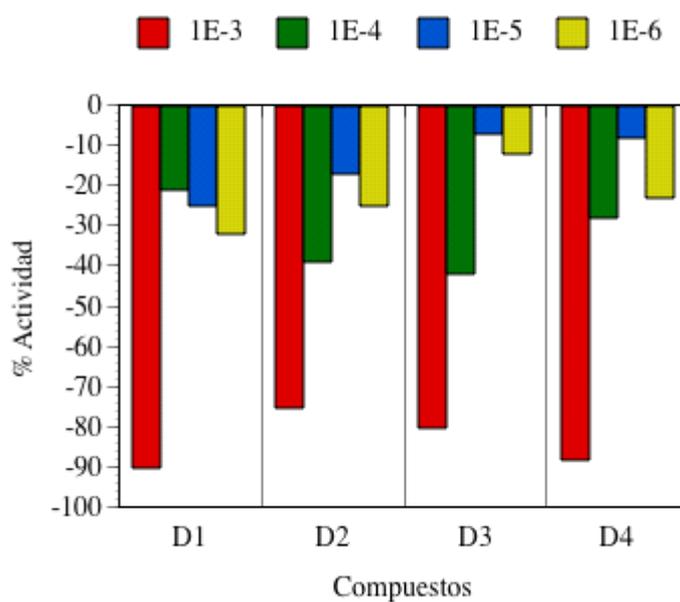


Figura 2: Porcentaje de actividad respecto al control de los cuatro diterpenos identificados sobre la elongación de coleoptilos etiolados de trigo. Réplica 1.

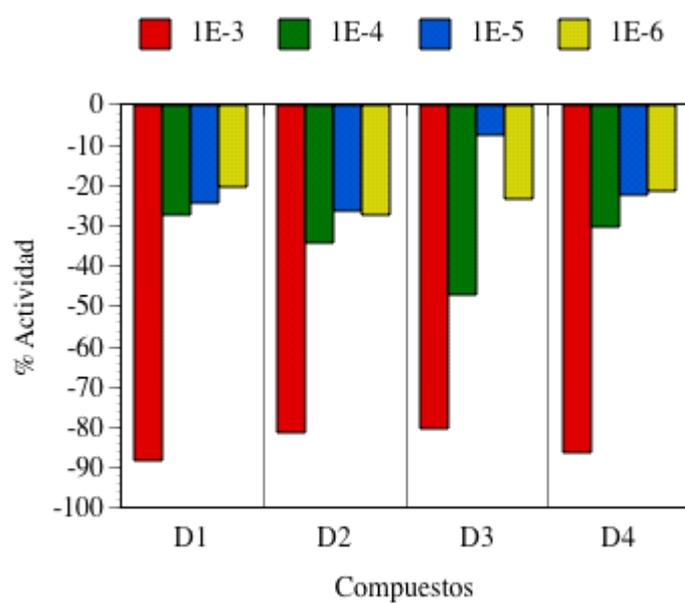


Figura 3: Porcentaje de actividad respecto al control de los cuatro diterpenos identificados sobre la elongación de coleoptilos etiolados de trigo. Réplica 2.

IV.2.2.2.- Actividad de diterpenos en bioensayos STS.

Los resultados que a continuación se exponen son los obtenidos en los bioensayos STS, destacando que se aprecia un comportamiento muy heterogéneo dependiendo tanto de la especie diana que se ha utilizado como del diterpeno con el que se ha ensayado. Las especies utilizadas en estos bioensayos han sido: tomate (*Lycopersicum esculentum*), cebolla (*Allium cepa*), trigo (*Triticum* sp.), berro (*Lepidium sativum*), y lechuga (*Lactuca sativa*).

IV.2.2.2.1.- Efecto sobre la germinación.

En las Figuras 4-8 se representa el efecto en la germinación de los diterpenos sobre las distintas especies diana. Como puede observarse no existe ningún efecto negativo en la germinación de trigo, tomate, lechuga y cebolla bajo ninguna de las concentraciones ensayadas y con ninguno de los diterpenos. Por el contrario, sí se inhibe la germinación del berro a distintas concentraciones, destacando que el D3 y el D4 inhiben significativamente la germinación de semillas de berro a concentración 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-6} M, no existiendo inhibición a 10^{-5} M. El D1 también produce reducción en la germinación, aunque no es significativa.

Es de destacar que junto con los diterpenos también se ha ensayado con un herbicida comercial (Logran), resultados que se tienen como referencia. Como puede observarse en las Figuras 4 - 8, no se produce inhibición en la germinación de ninguna de las especies utilizadas cuando son regadas con Logran, mientras que con los diterpenos extraídos D3 y D4 en *C. ladanifer*, se inhibe la germinación de las semillas de berro.

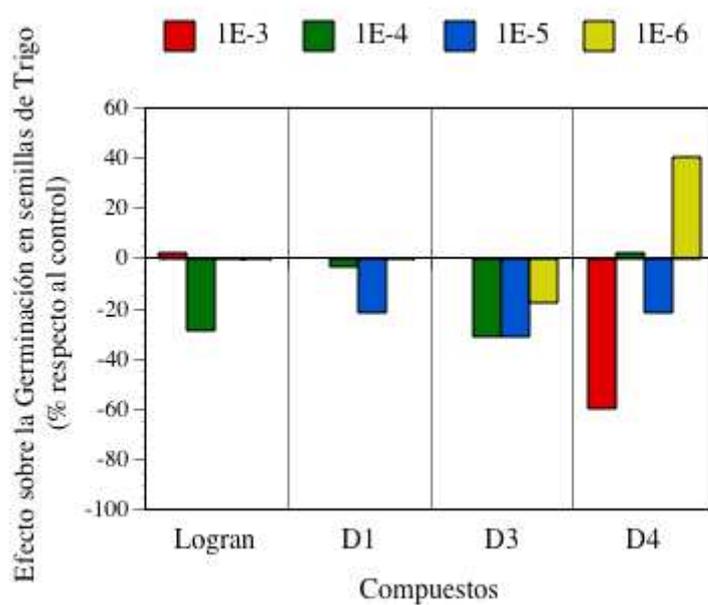


Figura 4: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la germinación de semillas de Trigo. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

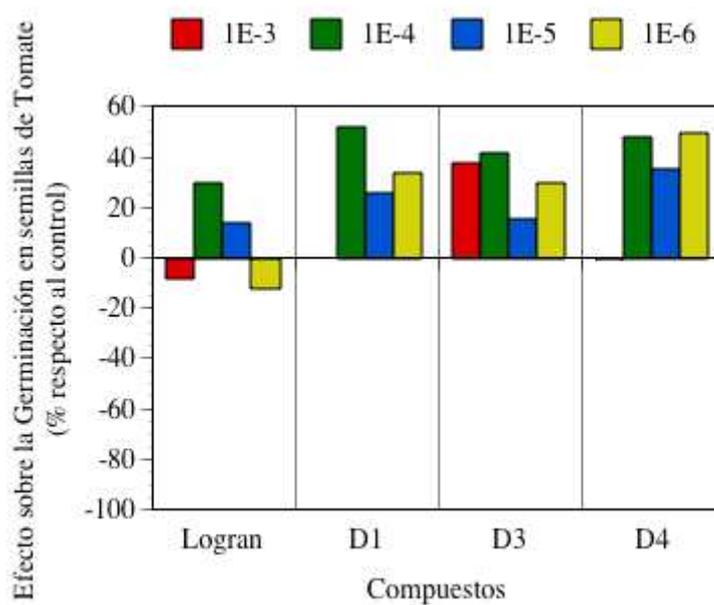


Figura 5: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la germinación de semillas de Tomate. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

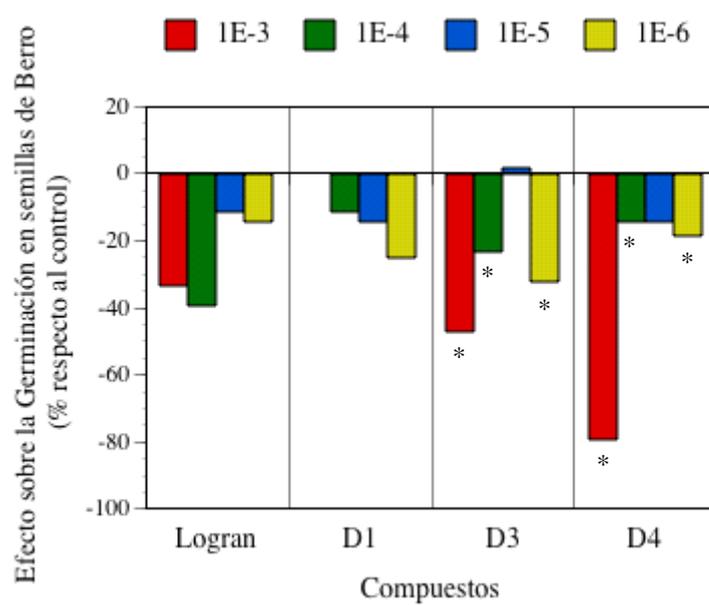


Figura 6: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la germinación de semillas de Berro. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

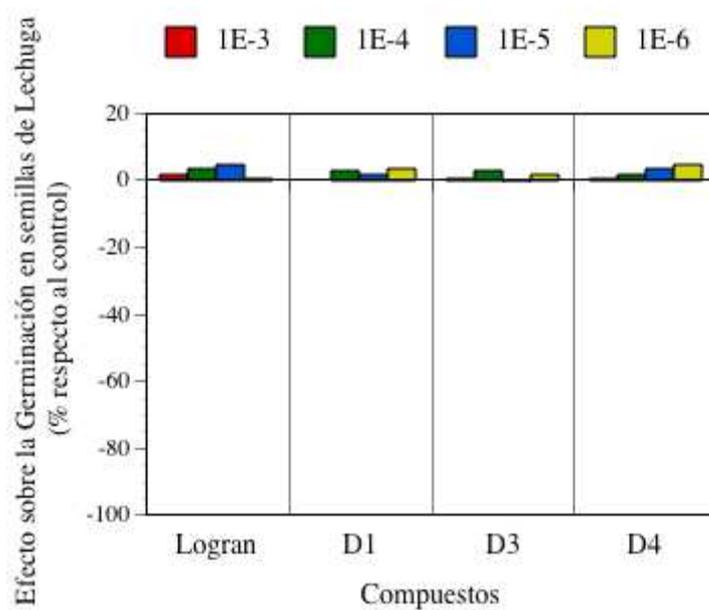


Figura 7: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la germinación de semillas de Lechuga. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

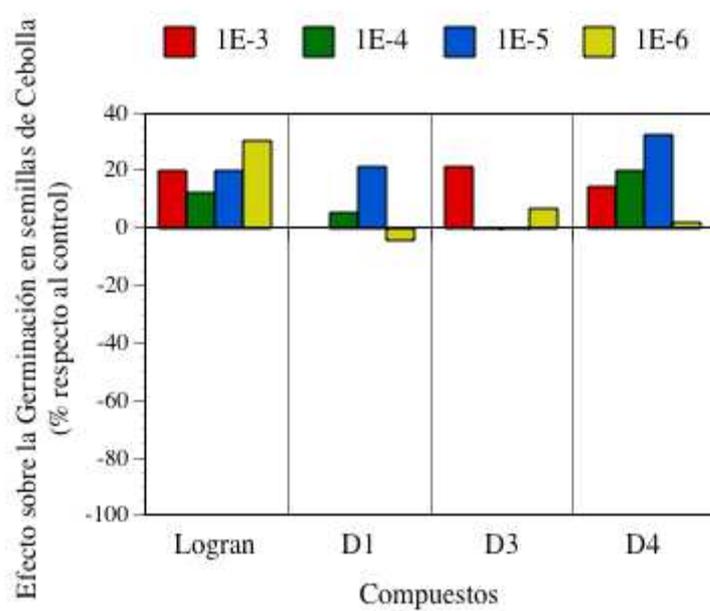


Figura 8: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la germinación de semillas de Cebolla. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

IV.2.2.2.2.- Efecto sobre la longitud de las raíces.

Cuando se cuantifica el efecto de los diterpenos sobre la longitud de las raíces de las diferentes especies seleccionadas, al igual que con la germinación, el comportamiento es nuevamente heterogéneo (Figuras 9-13).

De tal manera que el D1 afecta negativamente a la longitud de las raíces de dos de las especies estudiadas, la cebolla y el berro. Hay que destacar, que la cebolla es inhibida cuando se utiliza el D1 a su máxima concentración (10^{-4}M); y por el contrario, las raíces de berro reducen su longitud a la concentración más baja ensayada de este compuesto (10^{-6}M).

El D3 únicamente reduce significativamente el tamaño de las raíces del berro y sólo a la concentración de 10^{-6}M . Las raíces de las otras especies no se ven afectadas significativamente por este compuesto.

Por su parte, el D4 muestra un fuerte efecto en la inhibición del tamaño de raíces de todas las especies estudiadas, aunque únicamente a concentración 10^{-3}M . Al bajar la concentración la inhibición desaparece.

Al contrario de lo observado en los ensayos de germinación, este parámetro si se ve fuertemente afectado por el herbicida comercial. La longitud de las raíces de cebolla se reduce significativamente con todas las concentraciones. Las de lechuga y tomate también son inhibidas significativamente a todas las concentraciones excepto a 10^{-6}M . Las raíces del berro ven reducido su tamaño a concentración 10^{-3} y 10^{-5}M , y las del trigo a 10^{-3}M . Estos resultados ponen de manifiesto que el Logran presenta mayor eficacia que los diterpenos de *C. ladanifer* en la inhibición de este parámetro.

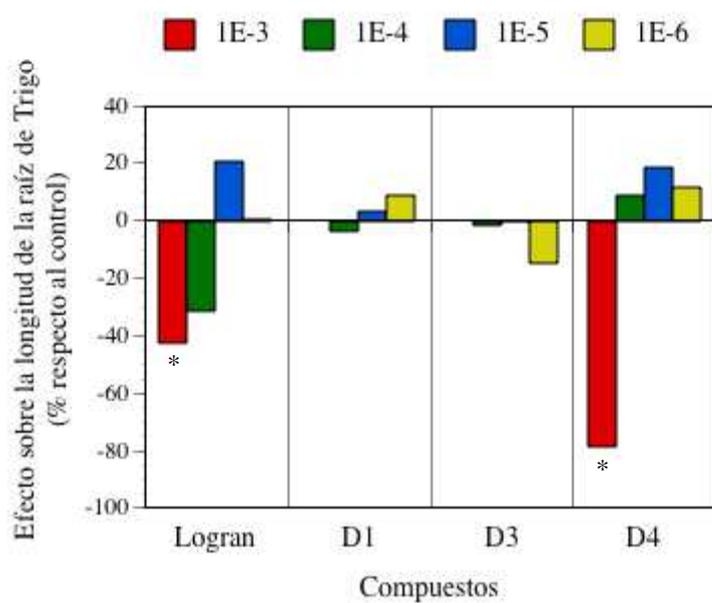


Figura 9: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la longitud de raíces de Trigo. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

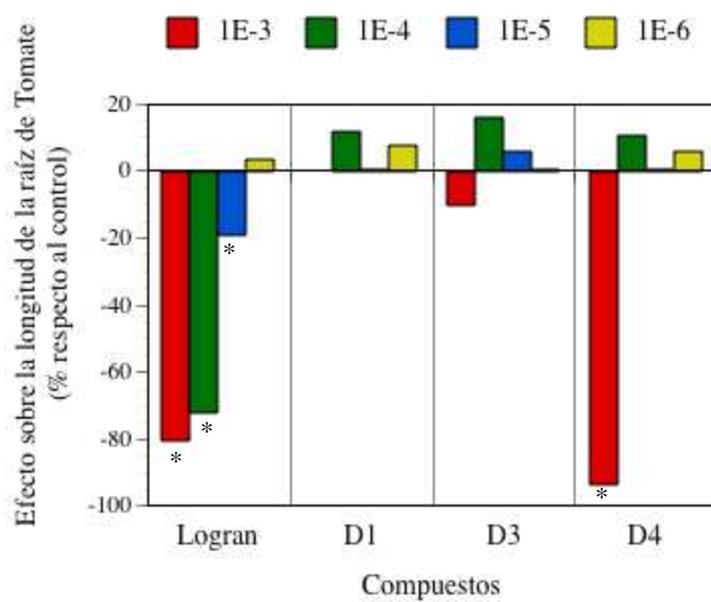


Figura 10: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la longitud de raíces de Tomate. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

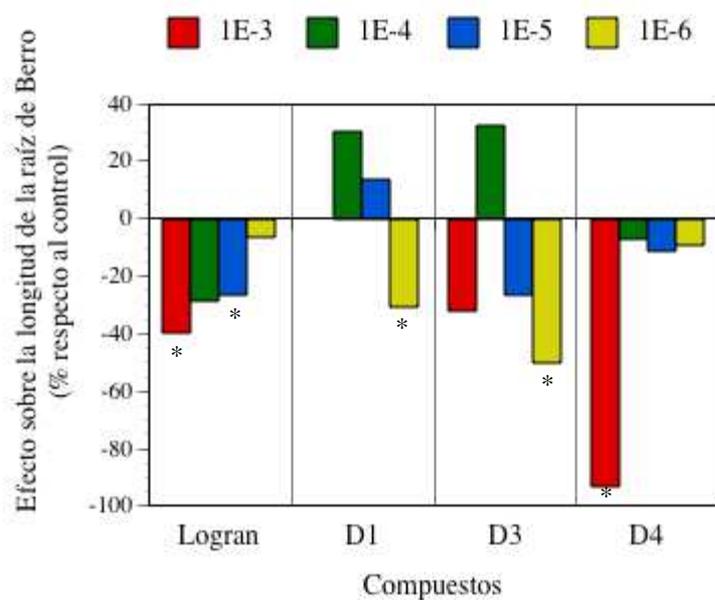


Figura 11: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la longitud de raíces de Berro. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

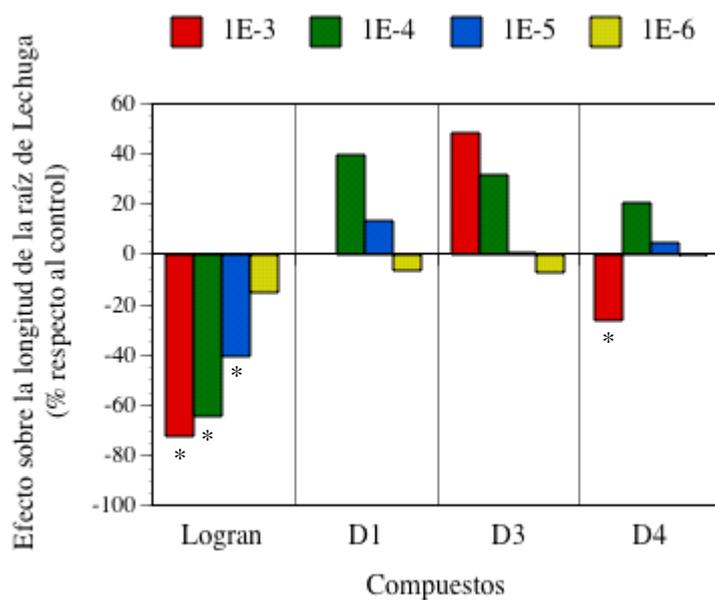


Figura 12: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la longitud de raíces de Lechuga. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

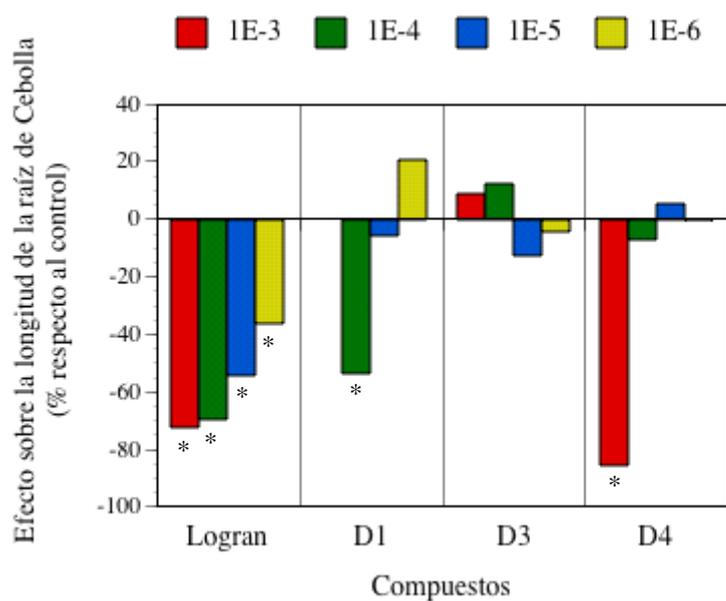


Figura 13: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la longitud de raíces de Cebolla. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

IV.2.2.2.3- Efecto sobre la longitud de los cotiledones.

El comportamiento de este parámetro es muy similar al que se produce sobre la longitud de las raíces, viéndose fuertemente afectado por la acción del herbicida comercial (Figuras 14-18). Así, la longitud de cotiledones de cebolla se reducen significativamente a todas las concentraciones excepto a 10^{-6} M. Los cotiledones del berro y el tomate también son inhibidos significativamente a las concentraciones 10^{-3} y 10^{-4} M y los de la lechuga ven reducido su tamaño a concentración 10^{-3} y 10^{-5} M. La única especie que no ve inhibido el desarrollo de sus coleóptilos es el trigo (Figura 14).

Cuando los bioensayos son realizados con los diterpenos, el comportamiento es nuevamente heterogéneo. De tal manera, el D1 presenta inhibición a la concentración máxima ensayada 10^{-4} M en cebolla. Por el contrario, los cotiledones de berro ven inhibida su longitud a la concentración más baja ensayada de este compuesto 10^{-6} M.

Por su parte, el D3 produce reducción significativa en el tamaño de los cotiledones de tomate y berro a la concentración 10^{-3} M, mientras que para el resto de semillas no inhibe significativamente.

El D4 presenta un fuerte efecto en la inhibición del tamaño de cotiledones de todas las semillas estudiadas únicamente a la concentración más alta 10^{-3} M, con el resto de concentraciones la inhibición desaparece.

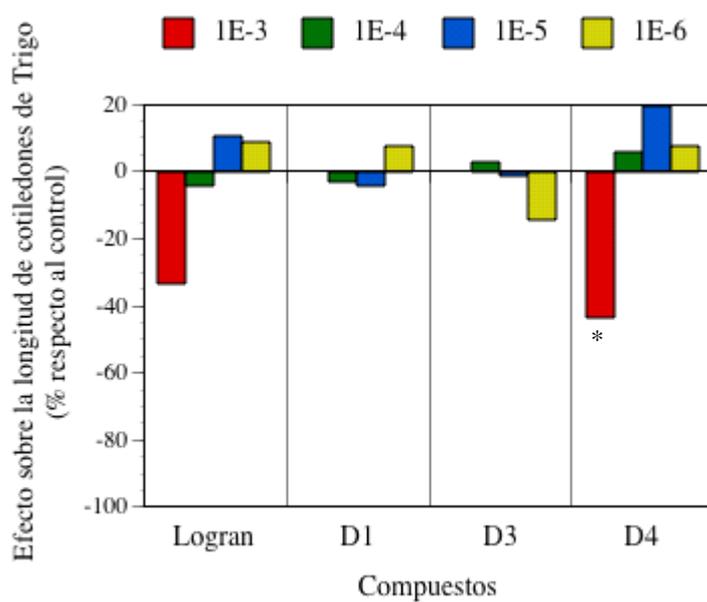


Figura 14: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la longitud de cotiledones de Trigo. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

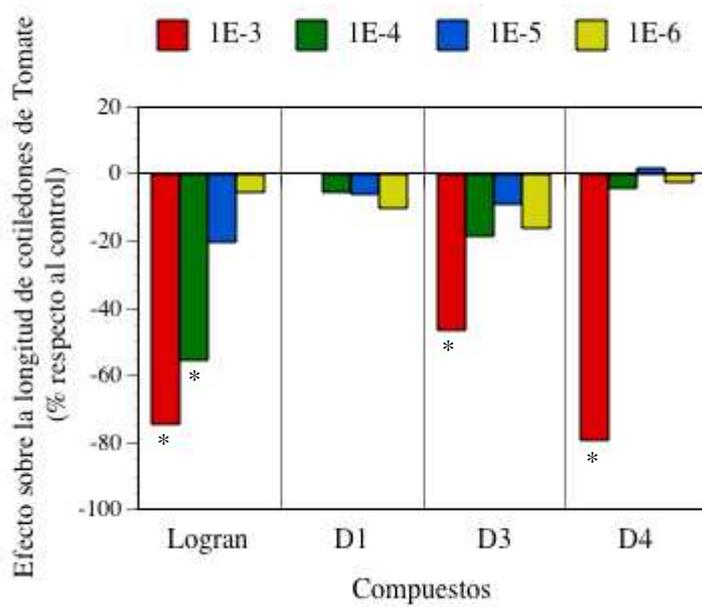


Figura 15: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la longitud de cotiledones de Tomate. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

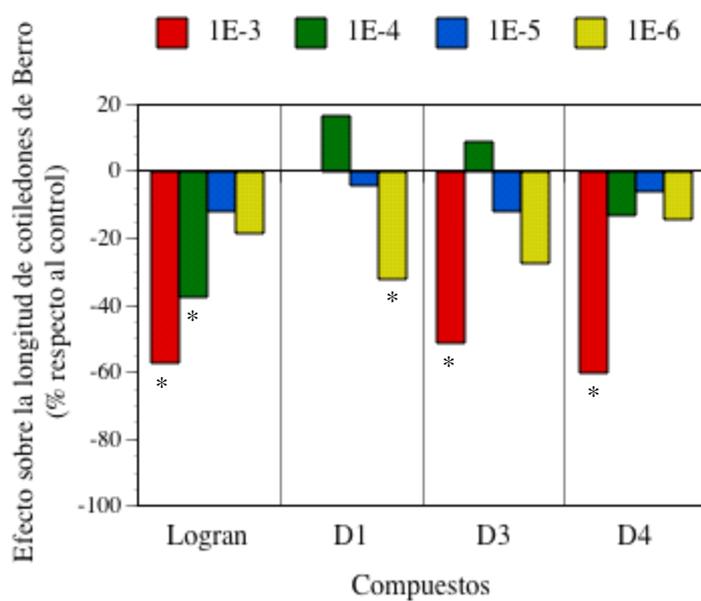


Figura 16: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la longitud de cotiledones de Berro. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

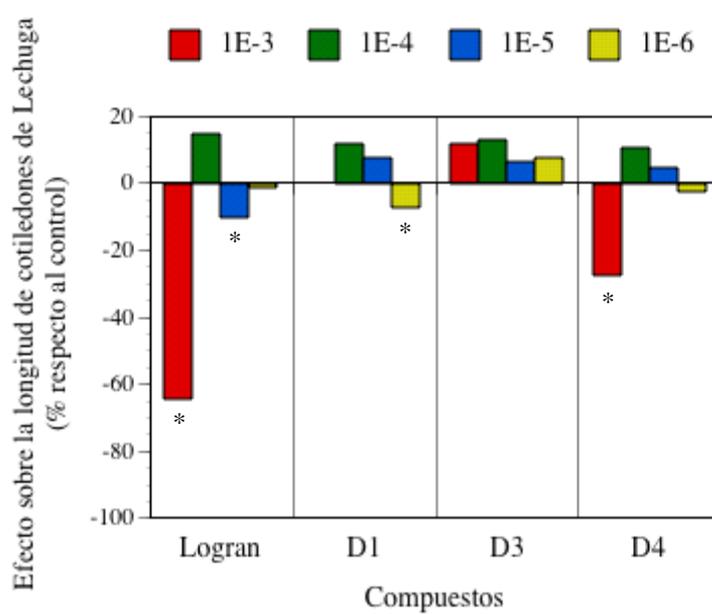


Figura 17: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la longitud de cotiledones de Lechuga. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

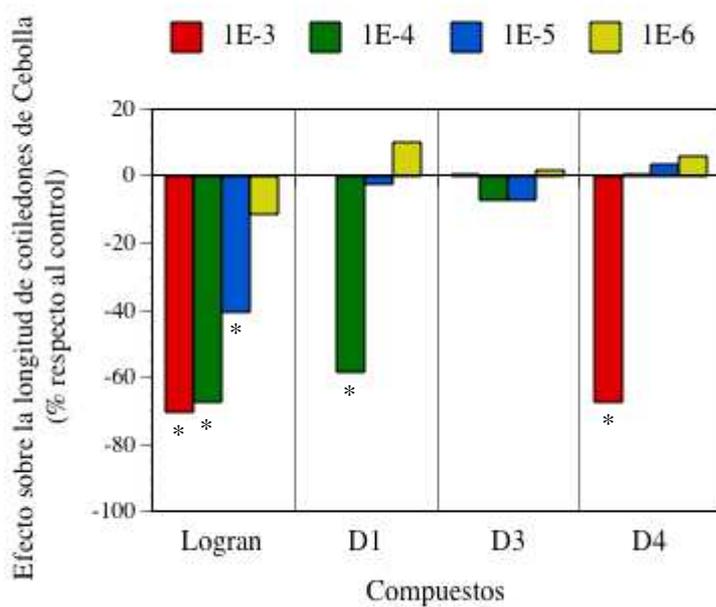


Figura 18: Efecto de los diterpenos, a distintas concentraciones, sobre la longitud de cotiledones de Cebolla. Datos expresados en porcentaje relativo al control. (* diferencias significativa respecto al control).

IV.2.3.- Cuantificación de diterpenos en hojas, hojarasca y suelos de *C. ladanifer* L., a lo largo del año.

Para la cuantificación de los diterpenos, se han recogido muestras en cuatro puntos de muestreo, correspondientes a cuatro localidades distribuidas por la provincia de Badajoz (Quintana de la Serena, Hornachos, Jerez de los Caballeros y Cabeza la Vaca). De esta manera se pretende homogeneizar los resultados, obteniendo valores representativos del conjunto de los jarales. La cuantificación se ha realizado a lo largo del año; una muestra por estación.

IV.2.3.1.- Cuantificación de diterpenos en la estación de primavera.

Como se observa en la Tabla 9, el diterpeno mayoritario es el D3, seguido del D1 y D2, no apreciándose diferencias significativas en la cantidad de compuestos presentes entre las distintas localidades, a excepción del D2. En este caso, las hojas recogidas en la localidad de Jerez de los Caballeros son las que mayor cantidad presentan. El D3, también es mayoritario en esta localidad, aunque la diferencia con otras localidades no es significativa.

Tabla 9: Cantidad de diterpenos presentes en hojas de *C. ladanifer*, recogidas durante la estación de primavera en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/g peso seco de hoja.

Localidades	D1	D2	D3
Quintana de la S.	3,423	1,946	5,403
Hornachos	4,262	1,935	4,197
Jerez de los C.	3,788	4,245	9,680
Cabeza la V.	2,541	2,930	6,774
<i>Kruskal-Wallis</i>	p > 0.05	p < 0.05	p > 0.05

Tabla 10: Cantidad de diterpenos presentes en la hojarasca de *C. ladanifer*, recogida durante la estación de primavera en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/g peso seco de hojarasca.

Localidades	D1	D2	D3
Quintana de la S.	0,113	0,073	0,130
Hornachos	0,058	0,033	0,028
Jerez de los C.	0,115	0,071	0,097
Cabeza la V.	0,029	0,021	0,016
<i>Kruskal-Wallis</i>	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$

No sucede lo mismo en la composición de la hojarasca, donde existen diferencias significativas entre las localidades para los tres diterpenos (Tabla 10), siendo la hojarasca de las localidades de Quintana de la Serena y Jerez de los Caballeros las que mayor cantidad presentan de todos los compuestos.

La cantidad presente de estos compuestos en el suelo en primavera es mínima, y en la mayoría de los casos no se aprecia. Únicamente en los suelos de jara de Jerez de los Caballeros y Cabeza la Vaca se encuentra presencia de los compuestos (Tabla 11).

Tabla 11: Cantidad de diterpenos presentes en los suelos de *C. ladanifer* recogidos durante la estación de primavera en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/100g de suelo.

	D1	D2	D3
Quintana de la S.	-	-	-
Hornachos	-	-	-
Jerez de los C.	0,033	0,022	0,022
Cabeza la V.	0,024	0,018	0,017
<i>Kruskal-Wallis</i>	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

IV.2.3.2.- Cuantificación de diterpenos en la estación de verano.

En la Tabla 12 se aprecia que las cantidades cuantificadas en las hojas de las cuatro poblaciones, en esta estación, no muestran diferencias significativas para D2 y D3. Sin embargo, en las hojas de las localidades de Hornachos y Cabeza la Vaca se aprecia mayor cantidad del diterpeno D1, existiendo diferencias significativas para este compuesto entre localidades (K-W, $p < 0.05$). Los compuestos D2 y D3, presentan también la mayor cantidad en Hornachos y Cabeza la Vaca, aunque las diferencias en este caso no son significativas (K-W, $p > 0.05$).

Tabla 12: Cantidad de diterpenos presentes en hojas de *C. ladanifer*, recogidas durante la estación de verano en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/g peso seco de hoja.

Localidades	D1	D2	D3
Quintana de la S.	1,486	1,354	3,398
Hornachos	3,819	2,302	4,441
Jerez de los C.	1,890	1,100	2,057
Cabeza la V.	5,931	3,364	3,120
<i>Kruskal-Wallis</i>	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

Por su parte, no se aprecian diferencias significativas en la cantidad de compuestos presentes en la hojarasca entre las distintas localidades (Tabla 13), aunque de forma general las poblaciones de Quintana y Cabeza la Vaca presentan mayor cantidad de diterpenos que el resto.

Tabla 13: Cantidad de diterpenos presentes en la hojarasca de *C. ladanifer*, recogida durante la estación de verano en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/g peso seco de hojarasca.

	D1	D2	D3
Quintana de la S.	0,269	0,211	0,239
Hornachos	0,164	0,132	0,129
Jerez de los C.	0,139	0,071	0,133
Cabeza la V.	0,241	0,140	0,200
Kruskal-Wallis	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

En esta estación, la presencia y cantidad de compuestos presentes en el suelo de jara (Tabla 14) es mayor que en primavera. De todos los compuestos presentes, es en el suelo procedente de la localidad de Jerez de los Caballeros donde mayor cantidad de estos compuestos encontramos.

Tabla 14: Cantidad de diterpenos presentes en los suelos de *C. ladanifer* recogidos durante la estación de verano en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/100g de suelo.

	D1	D2	D3
Quintana de la S.	0,065	0,051	0,056
Hornachos	0,054	0,042	0,047
Jerez de los C.	0,098	0,073	0,081
Cabeza la V.	0,049	0,036	0,035
Kruskal-Wallis	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$

IV.2.3.3.- Cuantificación de diterpenos en la estación de otoño.

Como se observa en la Tabla 15, no se aprecian diferencias significativas en la cantidad de compuestos presentes en las hojas entre las distintas localidades a excepción del D3. Este diterpeno está presente en mayor cantidad y de forma significativa (K-W; $p < 0.05$) en las localidades de Cabeza la Vaca y Quintana de la Serena. Para D1 y D2, aunque no existen diferencias significativas entre las localidades, es en las hojas de Cabeza la Vaca dónde se ha cuantificado mayor cantidad.

Tabla 15: Cantidad de diterpenos presentes en hojas de *C. ladanifer*, recogidas durante la estación de otoño en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/g peso seco de hoja.

	D1	D2	D3
Quintana de la S.	2,518	2,270	3,770
Hornachos	3,544	2,163	2,058
Jerez de los C.	2,555	1,766	2,850
Cabeza la V.	4,721	3,329	5,559
Kruskal-Wallis	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$

Respecto a la composición de la hojarasca en la estación de otoño (Tabla 16), existen diferencias significativas (K-W; $p < 0.05$) entre las localidades para los compuestos D1, D2 y D3, siendo la hojarasca de las localidades de Quintana y Hornachos las que mayor cantidad presentan de estos tres compuestos.

Tabla 16: Cantidad de diterpenos presentes en la hojarasca de *C. ladanifer*, recogida durante la estación de otoño en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/g peso seco de hojarasca.

	D1	D2	D3
Quintana de la S.	0,311	0,218	0,264
Hornachos	0,169	0,115	0,176
Jerez de los C.	0,036	0,031	0,057
Cabeza la V.	0,039	0,035	0,021
Kruskal-Wallis	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05

Cuando se cuantifican estos compuestos en el suelo en la estación de otoño (Tabla 17), las mayores cantidades de diterpenos se aprecian en Quintana de la Serena, seguida por Hornachos, para los tres diterpenos.

Tabla 17: Cantidad de diterpenos presentes en los suelos de *C. ladanifer* recogidos durante la estación de otoño en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/100g de suelo.

	D1	D2	D3
Quintana de la S.	0,053	0,042	0,041
Hornachos	0,026	0,021	0,015
Jerez de los C.	0,015	0,012	0,009
Cabeza la V.	0,021	0,017	0,011
Kruskal-Wallis	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05

IV.2.3.4.- Cuantificación de diterpenos en la estación de invierno.

Como se observa en la Tabla 18, en la estación de invierno no se aprecian diferencias significativas (K-W; $p > 0.05$) en la cantidad de ninguno de los diterpenos entre las distintas localidades, aunque es de destacar la mayor cantidad del compuesto D3 en la localidad de Jerez de los Caballeros.

Tabla 18: Cantidad de diterpenos presentes en hojas de *C. ladanifer*, recogidas durante la estación de invierno en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/g peso seco de hoja.

	D1	D2	D3
Quintana de la S.	8,602	3,636	7,681
Hornachos	7,015	3,492	5,959
Jerez de los C.	8,662	4,830	13,212
Cabeza la V.	7,858	4,451	8,322
Kruskal-Wallis	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

Respecto a la composición de la hojarasca en la estación de invierno (Tabla 19), existen diferencias significativas (K-W; $p < 0.05$) entre las localidades para los compuestos D2 y D3, siendo la hojarasca de las localidades de Quintana de la Serena y Jerez de los Caballeros las que mayor cantidad presentan de estos dos diterpenos.

Tabla 19: Cantidad de diterpenos presentes en la hojarasca de *C. ladanifer*, recogida durante la estación de invierno en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/g peso seco de hojarasca.

	D1	D2	D3
Quintana de la S.	0,074	0,071	0,097
Hornachos	0,055	0,031	0,026
Jerez de los C.	0,107	0,073	0,105
Cabeza la V.	0,065	0,039	0,042
Kruskal-Wallis	p > 0.05	p < 0.05	p < 0.05

Durante el invierno (Tabla 20), los tres diterpenos están presentes en los suelos de jarales de todas las localidades, destacando que es en Jerez de los Caballeros dónde se ha cuantificado mayor cantidad para los tres diterpenos. Cabe destacar que, tanto en esta estación como en otoño, la mayor presencia de estos compuestos en hojarasca y suelos se da en las muestras recogidas en la población de Jerez de los Caballeros.

Tabla 20: Cantidad de diterpenos presentes en los suelos de *C. ladanifer* recogidos durante la estación de invierno en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/100g de suelo.

	D1	D2	D3
Quintana de la S.	0,032	0,028	0,022
Hornachos	0,029	0,020	0,013
Jerez de los C.	0,045	0,035	0,029
Cabeza la V.	0,015	0,012	0,009
Kruskal-Wallis	p < 0.05	p > 0.05	p > 0.05

IV.2.3.5.- Análisis estacional en muestras de hojas de jara.

En la Tabla 21 se expresan, de forma estacional, las cantidades medias de cada uno de los diterpenos analizados en las muestras de hoja de jara recogidas en las cuatro localidades. Del análisis estacional se observa como, en todos los compuestos, existen diferencias significativas estacionales, siendo en la estación de invierno seguido de la primavera cuando se cuantifican en las hojas las mayores cantidades de diterpenos. Es también en invierno donde se establecen mayores diferencias en la síntesis de los tres diterpenos, siendo prácticamente el doble la cantidad de D1 y D3 (8,034 y 8,7793 mg/g PS respectivamente) frente a D2 (4,10 mg/g PS).

Tabla 21: Cantidad estacional de diterpenos presentes en hojas de *C. ladanifer*, recogidas en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/g peso seco de hoja.

	D1	D2	D3
Primavera	3,503	2,764	6,513
Verano	3,281	2,030	3,254
Otoño	3,334	2,382	3,559
Invierno	8,034	4,102	8,793
<i>Kruskal-Wallis</i>	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05

IV.2.3.6.- Análisis estacional en muestras de hojarasca de jara.

En la Tabla 22 se expresan, de forma estacional, las cantidades medias de cada uno de los diterpenos analizados en la hojarasca de jara recogida en las cuatro localidades. Existen diferencias significativas estacionales en la presencia de los tres diterpenos en la hojarasca, siendo la estación de verano, seguido del otoño, cuando encontramos las mayores

cantidades. Es de destacar que la contribución de los tres diterpenos en la hojarasca es prácticamente la misma, repitiéndose este comportamiento en las cuatro estaciones.

Tabla 22: Cantidad estacional de diterpenos presentes en la hojarasca de *C. ladanifer*, recogida en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/g peso seco de hojarasca.

	D1	D2	D3
Primavera	0,079	0,049	0,068
Verano	0,203	0,139	0,175
Otoño	0,139	0,100	0,129
Invierno	0,075	0,053	0,068
<i>Kruskal-Wallis</i>	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05

IV.2.3.7.- Análisis estacional en muestras de suelos de jara.

Debido al comportamiento que presentan estos compuestos en el suelo y a su escasa presencia en la mayoría de las muestras analizadas, solo destacar que la mayor presencia de los diterpenos en los suelos de jarales se produce en la estación de verano, sin destacar la presencia de algún compuesto en particular (Tabla 23).

Tabla 23: Cantidad estacional de diterpenos presentes en el suelo de jarales, recogido en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/100g de suelo.

	D1	D2	D3
Primavera	0,029	0,020	0,019
Verano	0,066	0,051	0,055
Otoño	0,029	0,023	0,019
Invierno	0,030	0,024	0,018

En resumen, sumando las cantidades medias de los tres diterpenos analizados en la hoja (Tabla 24), es en la estación de invierno cuando se sintetiza la mayor cantidad de estos compuestos, seguida de la primavera. En el caso de la hojarasca y el suelo, es en la estación de verano cuando se cuantifica la mayor cantidad de estos compuestos, seguida del otoño.

Tabla 24 : Cantidad estacional de diterpenos totales presentes en hojas, hojarasca y suelos de *C. ladanifer*, recogido en cuatro localidades de la provincia de Badajoz. Datos expresados en mg/g peso seco de hoja y hojarasca; mg/100g de suelo.

	Hoja	Hojarasca	Suelo
Primavera	12,781	0,196	0,068
Verano	8,565	0,517	0,172
Otoño	9,275	0,368	0,071
Invierno	20,929	0,196	0,072

IV.2.4.- Cuantificación de diterpenos del exudado de *C. ladanifer* L. bajo condiciones controladas. Efecto de la temperatura y estrés hídrico.

Se ha comprobado que existe variación cuantitativa de los diterpenos del exudado de *C. ladanifer* a lo largo del año, dependiente de la estación. Esto induciría a pensar que la síntesis de estos compuestos es dependiente de factores físicos-climáticos, como puede ser la temperatura y el estrés hídrico. Para comprobar esta hipótesis, se ha cuantificado la síntesis de diterpenos en individuos sometidos durante un mes a condiciones controladas de temperatura y humedad.

A continuación se muestran las cantidades de diterpenos obtenidos en plantas sometidas a altas temperaturas sin estrés hídrico (Tabla 25), altas temperaturas con estrés hídrico (Tabla 26), bajas temperaturas sin estrés hídrico (Tabla 27) y bajas temperaturas con estrés hídrico (Tabla 28). Como puede observarse, tras un mes sometiendo a las plantas a altas temperaturas y exceso de humedad, se produce un ligero aumento de los compuestos D1 y D2, y una disminución del compuesto D3 (Tabla 25). Por su parte, la cantidad de los tres compuestos en las plantas sometidas a estrés hídrico y altas temperaturas es menor que al inicio del experimento, aunque no se aprecian diferencias significativas (Tabla 26).

Tabla 25: Variación en la cantidad de diterpenos en plantas de *C. ladanifer* sometidas a condiciones de altas temperaturas y sin EH. Datos expresados en mg/g hoja (PS).

	D1	D2	D3
t₀	7,02	4,06	28,15
t_{final}	10,34	5,61	21,52
Mann-Whitney	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05

t₀ = inicio de la experiencia

t_{final} = un mes desde el inicio de la experiencia

Tabla 26: Variación en la cantidad de diterpenos en plantas de *C. ladanifer* sometidas a condiciones de altas temperaturas y con EH. Datos expresados en mg/g hoja (PS)

	D1	D2	D3
t_0	20,35	9,14	41,08
t_{final}	15,52	6,75	29,75
Mann-Whitney	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

t_0 = inicio de la experiencia

t_{final} = un mes desde el inicio de la experiencia

Por el contrario, las plantas sometidas a bajas temperaturas producen, tanto con estrés como sin estrés hídrico (Tablas 27 y 28), un aumento considerable en las cantidades encontradas de los tres compuestos, llegando incluso a doblar la cantidad presente al inicio de la experiencia.

Tabla 27: Variación en la cantidad de diterpenos en plantas de *C. ladanifer* sometidas a condiciones de bajas temperaturas y sin EH. Datos expresados en mg/g hoja (PS).

	D1	D2	D3
t_0	12,35	5,18	25,86
t_{final}	29,48	10,61	42,64
Mann-Whitney	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

t_0 = inicio de la experiencia

t_{final} = un mes desde el inicio de la experiencia

Tabla 28: Variación en la cantidad de diterpenos en plantas de *C. ladanifer* sometidas a condiciones de bajas temperaturas y con EH. Datos expresados en mg/g hoja (PS).

	D1	D2	D3
t₀	17,9	8,51	37,45
t_{final}	29,61	13,24	60,89
Mann-Whitney	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05

t₀ = inicio de la experiencia

t_{final} = un mes desde el inicio de la experiencia

El análisis de los valores porcentuales desde el inicio hasta el final de la experiencia, comparando los distintos tratamientos, revela como a temperaturas altas (Tabla 29), la secreción de los compuestos varía dependiendo de las condiciones de humedad bajo las que se ensaye. Así, encontramos diferencias significativas (M-W, p<0.05) en la variación de los diterpenos D1 y D2 al comparar los tratamientos AT-sin estrés hídrico y AT-con estrés hídrico.

Tabla 29: Variación porcentual, respecto al inicio de la experiencia, en la cantidad de diterpenos en plantas de *C. ladanifer* sometidas a altas temperaturas sin EH y con EH.

	D1	D2	D3
Sin EH	47	38	-24
Con EH	-24	-25	-28
Mann-Whitney	p < 0,05	p < 0,05	p > 0,05

Por el contrario, cuando se ensaya a bajas temperaturas, las diferencias en la variación porcentual encontrada tanto con estrés como sin estrés hídrico, no se revelan significativas en ninguno de los compuestos (Tabla 30). Por lo tanto, el aumento en la secreción de estos compuestos a bajas temperaturas es similar independientemente de las condiciones de humedad.

Tabla 30: Variación porcentual, respecto al inicio de la experiencia, en la cantidad de diterpenos en plantas de *C. ladanifer* sometidas a bajas temperaturas sin EH y con EH.

	D1	D2	D3
Sin EH	139	105	65
Con EH	65	56	63
Mann-Whitney	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

Si ahora se comparan las variaciones porcentuales obtenidas en los tratamientos de altas temperaturas con bajas temperaturas, se observan claras diferencias significativas (M-W; p<0.05) tanto con estrés hídrico como sin estrés hídrico (Tablas 31 y 32). Esto sugiere que es el parámetro físico temperatura el determinante a la hora de modificar la secreción de estos compuestos, produciéndose un aumento en la secreción a bajas temperaturas.

Tabla 31: Variación porcentual, respecto al inicio de la experiencia, en la cantidad de diterpenos en plantas de *C. ladanifer* sometidas sin EH, a altas y bajas temperaturas.

	D1	D2	D3
AT	47	38	-24
BT	139	105	65
Mann-Whitney	p < 0,04	p < 0,05	p < 0,05

Tabla 32: Variación porcentual, respecto al inicio de la experiencia, en la cantidad de diterpenos en plantas de *C. ladanifer* sometidas a EH, con altas y bajas temperaturas.

	D1	D2	D3
AT	-24	-25	-28
BT	65	56	63
Mann-Whitney	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05

IV.3.- ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO ALELOPÁTICO, DEPENDIENTE DE LAS CONDICIONES CLIMÁTICAS, DE OCHO POBLACIONES DE *C. ladanifer* L., DISTRIBUIDAS EN LA PROVINCIA DE BADAJOZ.

Este capítulo muestra los resultados del tercer objetivo planteado: cuantificar la actividad alelopática de una especie (*Cistus ladanifer* L.) dependiendo de las características climáticas en la que se desarrolle.

Para ello se cuantificó la actividad alelopática de los distintos compartimentos que pueden estar implicados: hoja, hojarasca y suelo. Las muestras de jaras fueron recogidas en poblaciones con características climáticas diferentes. Por una parte se extrajeron soluciones acuosas de cada una de ellas y se realizaron ensayos de germinación con semillas de *Rumex crispus* en suelos control de las ocho poblaciones seleccionadas. Por otra parte, se sembraron directamente sobre los suelos procedentes de jarales, siendo estos regados con agua. Se realizaron ensayos estacionales, durante dos años, sobre el porcentaje de germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de las plántulas crecidas en los bioensayos. Los resultados son expresados como la media correspondiente a los dos años.

IV.3.1.- Actividad alelopática de suelos de jarales procedentes de ocho poblaciones con características climáticas diferentes.

A continuación se exponen los resultados de las experiencias realizadas sobre los suelos de jarales de las ocho poblaciones, a lo largo del año.

IV.3.1.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de *R. crispus* en la estación de otoño.

En la estación de otoño (Tabla 33), existe inhibición significativa (M-W; $p < 0.05$) sobre la germinación en los suelos procedentes de jarales de todas las localidades, excepto en los suelos de Cornalvo y Santa Ana. Destacar, que son los suelos de Cabeza la Vaca los que presentan mayor inhibición, con un 64% de germinación respecto al control.

Tabla 33: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de plántulas de *R. crispus* sembradas sobre suelo. Los suelos proceden de jarales recogidos en ocho localidades de la provincia de Badajoz durante la estación de otoño. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% Biomasa
Cornalvo	111	113	95
Quintana	78*	72*	88
V. Serena	73*	72*	73*
Hornachos	77*	77*	91
Santa Ana	98	94	80
Jerez	72*	69*	109
Higuera	72*	70*	89
C. la Vaca	64*	62*	72*

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

Del mismo modo, el nacimiento de cotiledones muestra un comportamiento similar al descrito anteriormente para la germinación, siendo nuevamente los suelos de Cornalvo y Santa Ana los únicos que no inhiben significativamente este parámetro. Igualmente, es en los suelos de Cabeza la Vaca donde se produce la máxima inhibición.

Por el contrario, el desarrollo de las plántulas, cuantificado en esta experiencia como biomasa de las plántulas, es afectado negativamente cuando se ensaya en los suelos procedentes de las localidades de Valle de la Serena y Cabeza la Vaca, ambos con un porcentaje de biomasa que ronda el 73% respecto al control.

IV.3.1.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de R. crispus en la estación de invierno.

Cuando estos ensayos son realizados en suelos recogidos durante la estación de invierno, y como se observa en la Tabla 34, únicamente los suelos de las localidades de Hornachos e Higuera muestran inhibición significativa sobre la germinación (M-W; $p < 0.05$), con un 78% y 72% respecto al control, respectivamente. Del mismo modo, el nacimiento de cotiledones también es únicamente inhibido de forma significativa (M-W; $p < 0.05$) en estas dos localidades.

Por el contrario, en estas localidades no es afectado negativamente el desarrollo de las plántulas; pero sí en los suelos de otras poblaciones como Quintana y Cabeza la Vaca, dónde el tamaño de las plántulas es menor significativamente (M-W; $p < 0.05$), con un porcentaje de biomasa respecto al control del 69% y 78% respectivamente.

Tabla 34: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de plántulas de *R. crispus* sembradas sobre suelo. Los suelos proceden de jarales recogidos en ocho localidades de la provincia de Badajoz durante la estación de invierno. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% Biomasa
Cornalvo	96	98	85
Quintana	83	91	69*
V. Serena	116	116	95
Hornachos	78*	74*	92
Santa Ana	91	90	112
Jerez	89	90	106
Higuera	72*	72*	101
C. la Vaca	106	107	78*

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

IV.3.1.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de R. crispus en la estación de primavera.

En la estación de primavera (Tabla 35), cuatro son las localidades cuyos suelos inhiben significativamente (M-W; $p < 0,05$) la germinación: Valle de la Serena, Hornachos, Quintana e Higuera, siendo estas dos últimas donde encontramos los porcentajes de germinación más bajos de las tres estaciones estudiadas, con un 58% y 52% respectivamente.

Lo mismo sucede al analizar el nacimiento o emergencia de los cotiledones. Así, en los suelos de estas cuatro localidades, además de Cabeza la Vaca, se produce inhibición significativa (M-W, $p < 0,05$) en este parámetro. Es nuevamente Quintana e Higuera, con un porcentaje de nacimiento de cotiledones respecto al control del 55% y 30% respectivamente, las localidades con suelos más activos sobre este parámetro.

Por su parte, el porcentaje de biomasa en esta estación presenta una reducción significativa en los suelos de las localidades de Quintana, Valle de la Serena, Santa Ana, Jerez de los Caballeros e Higuera. En este caso, los menores porcentajes se alcanzan en los suelos de Valle de la Serena y nuevamente en Higuera con un 42% y 37% respectivamente.

Tabla 35: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de plántulas de *R. crispus* sembradas sobre suelo. Los suelos proceden de jarales recogidos en ocho localidades de la provincia de Badajoz durante la estación de primavera. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% Biomasa
Cornalvo	119	87	101
Quintana	58*	55*	65*
V. Serena	77*	66*	41*
Hornachos	64*	64*	83
Santa Ana	83	99	62*
Jerez	91	82	74*
Higuera	52*	30*	37*
C. la Vaca	81	71*	86

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

IV.3.2.- Actividad alelopática de las soluciones acuosas de hojas, hojarasca y suelos procedentes de ocho poblaciones con características climáticas diferentes.

A continuación se exponen los resultados obtenidos en las experiencias realizadas con las soluciones acuosas de las muestras de suelos, hojas y hojarasca procedentes de ocho poblaciones diferentes. En estas experiencias se ha estudiado el efecto de estas muestras sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de plántulas de *R. crispus* a lo largo del año, una muestra por cada estación, excepto el verano. Los resultados expuestos son la media de dos años de estudio.

IV.3.2.1.- Efecto alelopático de soluciones acuosas de hojas de *C. ladanifer* en semillas de *R. crispus*.**IV.3.2.1.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de *R. crispus* en la estación de otoño.**

Como se observa en la Tabla 36, en la estación de otoño no existe efecto negativo significativo sobre la germinación, excepto cuando se ensaya con muestras recogidas en la localidad de Cornalvo a la máxima concentración (concentración 1). Curiosamente, también presentan inhibición significativa (M-W; $p < 0.05$) sobre la germinación, las soluciones acuosas procedentes de las localidades de Santa Ana, Jerez de los Caballeros y Cabeza la Vaca. En este caso, la inhibición no se produce a concentración 1 sino cuando se reduce la concentración a la mitad (concentración $\frac{1}{2}$). Por su parte, el nacimiento de cotiledones únicamente es inhibido significativamente (M-W; $p < 0.05$) al ensayar con la solución de hojas procedentes de la localidad de Cabeza la Vaca. Por último, el desarrollo de las plántulas tampoco se ve afectado negativamente de forma general, encontrando únicamente inhibición significativa (M-W; $p < 0.05$) en las localidades de Valle de la Serena y Hornachos.

Tabla 36: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojas de *C. ladanifer* recogidas en ocho localidades de la provincia de Badajoz durante la estación de otoño. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% Biomasa	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Cornalvo	79*	102	80	104	91	85
Quintana	102	106	97	104	89	93
V. Serena	104	99	105	101	67*	98
Hornachos	113	102	114	106	71*	81
Santa Ana	86	73*	91	82	105	98
Jerez	84	78*	84	83	100	87
Higuera	96	88	96	88	92	84
C. la Vaca	81	77*	79*	79*	93	92

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

IV.3.2.1.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de *R. crispus* en la estación de invierno.

En la Tabla 37 se puede apreciar como las soluciones acuosas de hojas procedentes de las localidades de Cornalvo, Valle de la Serena y Santa Ana son las únicas que inhiben significativamente (M-W; $p < 0.05$) la germinación y el nacimiento de los cotiledones, manteniendo esta inhibición Cornalvo y Santa Ana cuando se reduce la concentración a la mitad. Por su parte, la biomasa de las plántulas no es afectada negativamente de forma significativa (M-W; $p > 0.05$) durante esta estación por ninguna de las soluciones acuosas de las poblaciones elegidas.

Tabla 37: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojas de *C. ladanifer*, recogidas en ocho localidades de la provincia de Badajoz durante la estación de invierno. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% Biomasa	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Cornalvo	54*	68*	54*	68*	99	90
Quintana	96	88	96	88	90	86
V. Serena	72*	103	72*	103	110	106
Hornachos	104	107	104	107	94	107
Santa Ana	54*	71*	54*	69*	104	99
Jerez	106	96	106	96	103	115
Higuera	112	107	110	108	103	105
C. la Vaca	90	108	90	109	92	92

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

IV.3.2.1.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de *R. crispus* en la estación de primavera.

De las tres estaciones estudiadas, es en ésta donde las soluciones acuosas de más localidades (cuatro de ellas) inhiben significativamente (M-W; $p < 0.05$) la germinación, alcanzando valores de inhibición por encima del 50%, respecto al control, como en el caso de Santa Ana (Tabla 38). Tres de estas poblaciones, Hornachos, Higuera y Cabeza la Vaca, mantienen la inhibición cuando se ensaya a concentración más baja. Como ocurre en la estación de otoño, encontramos localidades con valores de germinación más bajos cuando se ensaya a concentración $\frac{1}{2}$ que a concentración 1, como es el caso de Quintana de la Serena. Lo mismo sucede cuando se analiza el efecto en el nacimiento de los cotiledones y el desarrollo de las plántulas, siendo ambos parámetros inhibidos significativamente (M-W; $p < 0.05$) por la mayoría de las poblaciones, alcanzándose generalmente mayor inhibición cuando se ensaya a concentraciones más bajas.

Es de destacar en esta estación que el desarrollo de las plántulas es el parámetro más afectado negativamente; las soluciones procedentes de Cornalvo e Higuera no inhiben significativamente (M-W; $p > 0.05$) y por el contrario son Valle de la Serena y Santa Ana con 39% y 37% respectivamente, las localidades con menor porcentaje de biomasa respecto al control.

Tabla 38: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojas de *C. ladanifer*, recogidas en ocho localidades de la provincia de Badajoz durante la estación de primavera. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% Biomasa	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Cornalvo	103	100	114	120	89	95
Quintana	82	57*	76*	56*	66*	65*
V. Serena	81	102	101	72*	116	39*
Hornachos	71*	54*	69*	49*	82	73*
Santa Ana	42*	82	36*	81	65*	75*
Jerez	105	117	115	116	71*	63*
Higuera	79*	75*	86	77*	95	112
C. la Vaca	78*	70*	70*	54*	66*	37*

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

IV.3.2.2.- Efecto alelopático de soluciones acuosas de hojarasca de *C. ladanifer* en semillas de *R. crispus*.

IV.3.2.2.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de *R. crispus* en la estación de otoño.

En los ensayos realizados con las soluciones procedentes de hojarasca recogidas en la estación de otoño, los resultados han puesto de manifiesto que únicamente existe un efecto negativo significativo (M-W; $p < 0.05$) sobre la germinación y nacimiento de cotiledones cuando se ensaya con la solución procedente de la localidad de Cornalvo y a la máxima concentración (Tabla 39). En el resto de localidades no se aprecia ningún tipo de efecto negativo. Por su parte, el desarrollo de las plántulas es afectado negativamente cuando se ensaya a altas concentraciones con las soluciones procedentes de Cornalvo, Hornachos y Santa Ana.

Tabla 39: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojarasca de *C. ladanifer*, recogidas en ocho localidades de la provincia de Badajoz durante la estación de otoño. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% Biomasa	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Cornalvo	67*	99	63*	88	79*	93
Quintana	94	94	95	89	103	95
V. Serena	105	106	105	108	88	86
Hornachos	93	93	96	93	69*	81
Santa Ana	119	104	120	103	71*	88
Jerez	83	85	87	86	118	116
Higuera	99	103	99	103	104	114
C. la Vaca	90	88	94	88	106	113

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

IV.3.2.2.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de *R. crispus* en la estación de invierno.

En la Tabla 40 se puede apreciar como las soluciones acuosas de hojarasca procedente de las localidades de Quintana, Santa Ana y Cabeza la Vaca inhiben significativamente la germinación y nacimiento de cotiledones (M-W; $p < 0.05$). Con las soluciones acuosas procedentes de dos de estas localidades, Quintana y Santa Ana, y para ambos parámetros, la inhibición se mantiene incluso cuando se disminuye la concentración. Por su parte, la biomasa es reducida de forma significativa (M-W; $p < 0.05$) con cinco soluciones de las ocho estudiadas, y con porcentajes de inhibición que superan el 55%, como es el caso de Cabeza la Vaca. Cuando se ensaya con una concentración menor, la inhibición se mantiene en tres de las localidades: Cornalvo, Santa Ana y Cabeza la Vaca.

Tabla 40: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojarasca de *C. ladanifer*, recogidas en ocho localidades de la provincia de Badajoz durante la estación de invierno. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% Biomasa	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Cornalvo	83	101	83	101	60*	55*
Quintana	68*	70*	68*	70*	115	95
V. Serena	101	93	101	93	71*	94
Hornachos	95	103	95	103	82	92
Santa Ana	74*	73*	74*	73*	70*	69*
Jerez	93	104	93	104	72*	100
Higuera	115	80	115	80	109	89
C. la Vaca	66*	88	66*	87	43*	77*

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

IV.3.2.2.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de *R. crispus* en la estación de primavera.

Como puede observarse al comparar las Tablas 39, 40 y 41, y como sucedía con los ensayos realizados con las soluciones acuosas de hojas, es en esta estación donde se aprecia mayor número de localidades cuyas soluciones acuosas de hojarasca inhiben significativamente (M-W; $p < 0.05$) la germinación de semillas de *R. crispus*. Las localidades con inhibición significativa sobre este parámetro son: Cornalvo, Quintana, Hornachos, Santa Ana y Cabeza la Vaca. Tres de estas localidades también inhiben significativamente (M-W; $p < 0.05$) el nacimiento de cotiledones. Hay que destacar que en esta estación, como se observa en la Tabla 41, el tamaño de las plántulas, cuantificado como porcentaje de biomasa, se reduce significativamente (M-W; $p < 0.05$) en todas las localidades, alcanzando en la mayoría de los casos la mitad al obtenido en el control. Es por tanto, en esta estación cuando las soluciones de hojarasca afectan en mayor grado a este parámetro.

Tabla 41: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojarasca de *C. ladanifer*, recogidas en ocho localidades de la provincia de Badajoz durante la estación de primavera. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% Biomasa	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Cornalvo	70*	94	119	106	58*	82
Quintana	72*	87	104	117	55*	84
V. Serena	98	84	115	105	25*	65*
Hornachos	74*	75*	78*	113	46*	73*
Santa Ana	69*	76*	64*	58*	58*	58*
Jerez	115	112	87	115	55*	70*
Higuera	105	92	98	110	62*	68*
C. la Vaca	71*	71*	74*	80	49*	58*

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

IV.3.2.3.- Efecto alelopático de soluciones acuosas de suelos de *C. ladanifer* en semillas de *R. crispus*.

IV.3.2.3.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de *R. crispus* en la estación de otoño.

Como se observa en la Tabla 42, cuando se recogen los suelos en la estación de otoño y se obtiene la solución acuosa de los mismos para realizar los ensayos de germinación, únicamente las soluciones acuosas procedentes de los jarales localizados en Cornalvo y Jerez de los Caballeros inhiben significativamente (M-W; $p < 0.05$) la germinación y el nacimiento de cotiledones. Por su parte, el desarrollo de las plántulas no se ve afectado negativamente por la solución procedente de ninguna de las localidades, al no encontrarse diferencias significativas (M-W; $p > 0.05$) respecto a la biomasa control.

Tabla 42: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de suelos de *C. ladanifer*, recogidos en ocho localidades de la provincia de Badajoz, durante la estación de otoño. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% Biomasa	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Cornalvo	72*	97	76*	82	102	82
Quintana	87	89	87	91	91	96
V. Serena	111	110	112	94	96	80
Hornachos	109	101	108	101	108	96
Santa Ana	102	111	105	116	113	94
Jerez	78*	55*	75*	53*	97	112
Higuera	102	80	102	81	111	95
C. la Vaca	99	91	103	94	97	99

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

IV.3.2.3.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de *R. crispus* en la estación de invierno.

Al igual que ocurre en las experiencias realizadas en la estación de otoño, con las muestras recogidas en invierno, como se observa en la Tabla 43, no se observa apenas efecto negativo sobre los parámetros estudiados por parte de las soluciones acuosas de los suelos. Únicamente la solución procedente del suelo de Cornalvo inhibe significativamente la germinación y el nacimiento de cotiledones (M-W; $p < 0.05$); y la de Cabeza la Vaca actúa negativamente sobre el crecimiento de las plántulas.

Tabla 43: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de suelos de *C. ladanifer*, recogidos en ocho localidades de la provincia de Badajoz, durante la estación de invierno. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% Biomasa	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Cornalvo	76*	90	76*	90	90	95
Quintana	83	85	83	85	100	115
V. Serena	111	120	111	115	104	94
Hornachos	82	100	82	100	103	119
Santa Ana	90	90	90	90	103	100
Jerez	98	107	98	107	102	114
Higuera	110	100	114	100	95	116
C. la Vaca	109	109	109	110	58*	81

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

IV.3.2.3.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa total en semillas y plántulas de *R. crispus* en la estación de primavera.

Al igual que ocurre cuando se ensaya con las soluciones de hoja y hojarasca, es en esta estación donde las soluciones acuosas de suelo presentan mayor actividad sobre los parámetros estudiados (Tabla 44). De tal manera que se obtienen valores de inhibición significativa (M-W; $p < 0.05$) sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa con cinco de las ocho soluciones utilizadas. Destacar las soluciones de Quintana, Santa Ana y Cabeza la Vaca por presentar inhibición significativa sobre todos los parámetros medidos, manteniéndose la inhibición incluso cuando se reduce la concentración a la mitad.

Tabla 44: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones y biomasa de plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de suelos de *C. ladanifer*, recogidos en ocho localidades de la provincia de Badajoz, durante la estación de primavera. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% Biomasa	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Cornalvo	79*	102	53*	117	96	100
Quintana	77*	88	24*	33*	66*	76*
V. Serena	94	92	84	92	73*	60*
Hornachos	89	100	71*	76*	89	99
Santa Ana	78*	66*	76*	57*	67*	76*
Jerez	112	118	119	115	102	96
Higuera	78*	117	86	104	76*	65*
C. la Vaca	70*	68*	76*	65*	62*	59*

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

De todas las experiencias realizadas con las ocho poblaciones, y utilizando las muestras procedentes de hojas, hojarasca y suelo a lo largo del año, cabe destacar los siguientes resultados:

-Es en la estación de primavera cuando se obtiene mayores niveles de inhibición para los tres parámetros medidos y con todas las muestras estudiadas.

-Teniendo en cuenta las soluciones acuosas empleadas, la que mayor actividad presenta en término global, es la procedente de la hojarasca, seguida de la hoja y la de los suelos.

-Las poblaciones fueron elegidas en función de sus características climáticas, con diferentes precipitaciones y temperaturas. De esta forma, podemos clasificar las poblaciones en dos grupos:

- Poblaciones con temperatura más alta y bajas precipitaciones: Cornalvo, Quintana de la Serena, Valle de la Serena y Hornachos
- Poblaciones con temperaturas más bajas y altas precipitaciones: Santa Ana, Jerez de los Caballeros, Higuera y Cabeza la Vaca.

Atendiendo a estos dos grupos establecidos, se esperaba que el comportamiento alelopático de estas localidades se diferenciara. Con los resultados obtenidos no se observa una clara diferenciación. Sí existen diferencias entre las localidades, pero muestran un comportamiento heterogéneo, por ejemplo: cuando se estudia el efecto de las soluciones acuosas procedentes de hojas en el nacimiento de cotiledones en la estación de primavera, se produce inhibición significativa en dos localidades pertenecientes al primer grupo y en otras dos del segundo grupo. El que no exista un comportamiento asociado a las condiciones climáticas puede ser debido a que las diferencias entre poblaciones no sean suficientes como para derivar distintos efectos alelopáticos.

Esto ha llevado a repetir todo este estudio, seleccionando poblaciones con valores de precipitación y temperatura más extremos y volviendo a plantear desde el inicio la experiencia.

IV.4.- ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO ALELOPÁTICO, DEPENDIENTE DE LAS CONDICIONES CLIMÁTICAS DE DOCE POBLACIONES DE *C. ladanifer* L. DISTRIBUIDAS NORTE-SUR DE LA PENÍNSULA IBÉRICA.

En los siguientes apartados se exponen los resultados obtenidos al analizar y ensayar con muestras procedentes de doce poblaciones distribuidas de N-S de la Península Ibérica. En ellas se ha estudiado, la cantidad de diterpenos en hojas y hojarasca; el efecto derivado de soluciones acuosas de hojas y hojarasca cuando las semillas son sembradas sobre papel y sobre suelo control; y el efecto cuando se siembra sobre los suelos de jarales y son regados con agua. El estudio se ha realizado durante un año, recogiendo muestras en cada estación y contabilizando los parámetros: germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones.

IV.4.1.- Cuantificación de los diterpenos presentes en las muestras de hoja y hojarasca procedentes de doce poblaciones.

Los compuestos que a continuación se refieren, fueron cuantificados en muestras de hojas y hojarasca recogidas, durante las cuatro estaciones, en las localidades de Ponferrada, Destriana, Pantano de Ricobayo, El Cubo del Vino, Hervás, Valverde del Fresno, Albuquerque, Hornachos, Azuaga, Cazalla de la Sierra, La Nava de la Concepción y Puerto de Galis. En todos los casos, el valor se expresa en mg/g de peso seco (PS) de hoja u hojarasca.

IV.4.1.1.- Cuantificación de compuestos en la estación de primavera.

Como se observa en la Tabla 45, se aprecia variabilidad significativa entre localidades (K-W; $p < 0.05$) en la cantidad de diterpenos presentes en las muestras de hojas recogidas en la estación de primavera. La localidad con menor cantidad de compuesto D1 es El Cubo con 1,6 mg/g PS, y las poblaciones que más cantidad presentan son La Nava de la Concepción y Puerto de Galis con 6,8 y 5,7 mg/g PS, respectivamente. Para el D2 también existen diferencias significativas entre localidades, pasando de los 1,3 mg/g PS de Destriana a los 4,0 mg/g PS de Puerto de Galis. Por su parte, el diterpeno D3 presenta su mínimo en las muestras de hojas procedentes de Hornachos con 3,2 mg/g PS y el máximo, como ocurriera con el resto de compuestos, en Puerto de Galis con 10,3 mg/g PS.

Cuando se cuantifica la cantidad de diterpenos presentes en la hojarasca recogida en esta estación, también se aprecian diferencias significativas entre localidades (K-W; $p < 0.05$). Así, la localidad con menor cantidad de estos compuestos es Hornachos con 0,26 mg/g PS para el D1; 0,17 mg/g PS para el D2 y 0,17 mg/g PS para el D3. Por el contrario, la hojarasca procedente de la localidad de Hervás es la que mayor cantidad de diterpenos presenta 1,4 mg/g PS para el D1, 1,2 mg/g PS para el D2, y 1,7 mg/g PS para el D3 (Tabla 46).

Tabla 45: Cantidad de diterpenos presentes en hojas de *C. ladanifer*, recogidas durante la estación de primavera en doce poblaciones distribuidas de N-S peninsular. Datos expresados en mg/g peso seco de hoja.

	D1	D2	D3
Ponferrada	2,484	1,476	5,657
Destriana	2,529	1,372	5,653
Ricobayo	4,552	2,757	6,289
El Cubo	1,674	1,696	8,602
Hervás	2,303	1,888	3,807
V. del Fresno	3,293	3,444	6,046
Alburquerque	3,425	2,912	5,402
Hornachos	3,572	2,101	3,200
Azuaga	3,392	3,869	5,995
Cazalla de la S.	4,638	3,002	3,869
La Nava de la C.	6,863	3,696	5,200
Puerto de Galis	5,776	4,006	10,337
Kruskal-Wallis	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05

Tabla 46: Cantidad de diterpenos presentes en la hojarasca de *C. ladanifer*, recogida durante la estación de primavera en doce poblaciones distribuidas de N-S peninsular. Datos expresados en mg/g peso seco de hojarasca.

	D1	D2	D3
Ponferrada	0,335	0,242	0,805
Destriana	0,697	0,389	0,819
Ricobayo	0,767	0,546	1,359
El Cubo	0,421	0,411	1,711
Hervás	1,459	1,237	1,784
V. del Fresno	1,001	0,633	1,300
Alburquerque	0,954	0,539	0,707
Hornachos	0,260	0,176	0,171
Azuaga	0,592	0,560	0,781
Cazalla de la S.	0,372	0,304	0,426
La Nava de la C.	0,285	0,201	0,236
Puerto de Galis	0,327	0,347	0,684
Kruskal-Wallis	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05

IV.4.1.2.- Cuantificación de compuestos en la estación de verano.

En la Tabla 47 se observa la cantidad de compuestos presentes en las muestras de hojas recogidas en la estación de verano. En ella, al igual que en primavera, se aprecia una variación significativa entre las localidades (K-W; $p < 0.05$). De tal manera que la localidad con menor cantidad del diterpeno D1 es Valverde del Fresno con 3,2 mg/g PS y las que más Ponferrada y El Cubo con una cantidad mayor de 6,5 mg/g PS. Para el D2 también existen diferencias significativas entre localidades, pasando de los 2,6 mg/g PS de Cazalla, la Nava y Hornachos, a los más de 4,0 mg/g PS de Ponferrada, Hervás y Alburquerque. Por su parte, el compuesto D3 presenta su mínimo en las muestras de hojas procedentes de La Nava con 2,4 mg/g PS, y el máximo en Ponferrada, Destriana y El Cubo con más de 11 mg/g PS.

Tabla 47: Cantidad de diterpenos presentes en hojas de *C. ladanifer*, recogidas durante la estación de verano en doce poblaciones distribuidas de N-S peninsular. Datos expresados en mg/g peso seco de hoja.

	D1	D2	D3
Ponferrada	6,853	4,418	11,080
Destriana	4,813	3,132	11,374
Ricobayo	4,327	2,975	10,592
El Cubo	6,566	3,698	11,274
Hervás	6,055	4,049	8,509
V. del Fresno	3,247	2,937	8,239
Alburquerque	4,171	4,186	8,150
Hornachos	4,147	2,667	4,487
Azuaga	4,131	2,846	7,346
Cazalla de la S.	4,482	2,672	6,804
La Nava de la C.	3,981	2,621	2,405
Puerto de Galis	4,758	3,707	10,617
Kruskal-Wallis	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$

Por su parte, en la cantidad de diterpenos presentes en la hojarasca recogida en esta estación, también se aprecian diferencias significativas entre localidades (K-W; $p < 0.05$). Así, la localidad con menor cantidad de los compuestos D1 y D2 es Ponferrada seguida de Cazalla, y para el compuesto D3 es Hornachos seguido de Albuquerque. Por el contrario, la hojarasca con mayor cantidad de diterpenos D1 y D2 es la recogida en las localidades de Valverde del Fresno y Hervás, y las localidades con mayor cantidad de D3 es El Cubo seguido de Hervás (Tabla 48).

Tabla 48: Cantidad de diterpenos presentes en la hojarasca de *C. ladanifer*, recogida durante la estación de verano en doce poblaciones distribuidas de N-S peninsular. Datos expresados en mg/g peso seco de hojarasca.

	D1	D2	D3
Ponferrada	0,229	0,208	0,661
Destriana	0,511	0,327	0,563
Ricobayo	0,435	0,319	0,887
El Cubo	0,567	0,648	1,957
Hervás	0,776	0,770	1,815
V. del Fresno	1,004	0,735	1,368
Alburquerque	0,507	0,398	0,305
Hornachos	0,515	0,374	0,261
Azuaga	0,817	0,675	0,898
Cazalla de la S.	0,371	0,292	0,454
La Nava de la C.	0,549	0,418	0,524
Puerto de Galis	0,687	0,501	1,592
Kruskal-Wallis	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$

IV.4.1.3.- Cuantificación de compuestos en la estación de otoño.

En la Tabla 49 se observa la cantidad de compuestos presentes en las muestras de hojas recogidas en la estación de otoño. Se aprecia nuevamente variabilidad significativa entre las localidades (K-W; $p < 0.05$), de tal manera que las hojas con menor cantidad del diterpeno D1 proceden de Ricobayo con 3,5 mg/g PS, y la que más Destriana con 10,5 mg/g PS seguida por Hervás, Albuquerque, Puerto de Galis y Valverde del Fresno, todas ellas con más de 9,0 mg/g PS.

En la cantidad cuantificada de D2 también existen diferencias significativas entre localidades, pasando de los 3,5 mg/g PS de las hojas de Ricobayo, a los más de 6,0 mg/g PS en Destriana, Puerto de Galis y Albuquerque. Por su parte, el compuesto D3 presenta su mínimo en las muestras de hojas procedentes de Hornachos con 6,0 mg/g PS, y el máximo en Ponferrada y Puerto de Galis con más de 25,0 mg/g PS.

La cantidad de diterpenos presentes en la hojarasca recogida en esta estación, también presenta diferencias significativas entre localidades (K-W; $p < 0.05$) (Tabla 50). Así, la localidad con menor cantidad del compuesto D1 es El Cubo con 0,07 mg/g PS, y la hojarasca con mayor cantidad procede de Puerto de Galis con más de 0,63 mg/g PS. Por su parte, el D2 pasa de los 0,07 mg/g PS de Ponferrada y El Cubo, a los casi 0,4 mg/g PS de Puerto de Galis. El compuesto D3 presenta su mínimo en las muestras de hojarasca procedentes de Hornachos, Azuaga y La Nava con 0.13 mg/g PS y el máximo nuevamente en Puerto de Galis con más de 0,9 mg/g PS.

Tabla 49: Cantidad de diterpenos presentes en hojas de *C. ladanifer*, recogidas durante la estación de otoño en doce poblaciones distribuidas de N-S peninsular. Datos expresados en mg/g peso seco de hoja.

	D1	D2	D3
Ponferrada	6,482	5,087	25,881
Destriana	10,521	6,818	14,426
Ricobayo	3,576	3,422	18,463
El Cubo	8,310	3,886	8,589
Hervás	9,864	5,852	17,814
V. del Fresno	9,673	5,505	20,124
Alburquerque	9,754	6,313	9,224
Hornachos	5,625	3,566	6,038
Azuaga	5,374	4,290	9,181
Cazalla de la S.	6,783	3,795	9,468
La Nava de la C.	6,056	4,987	9,608
Puerto de Galis	9,400	6,450	26,894
<i>Kruskal-Wallis</i>	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05

Tabla 50: Cantidad de diterpenos presentes en la hojarasca de *C. ladanifer*, recogida durante la estación de otoño en doce poblaciones distribuidas de N-S peninsular. Datos expresados en mg/g peso seco de hojarasca.

	D1	D2	D3
Ponferrada	0,087	0,069	0,196
Destriana	0,148	0,088	0,142
Ricobayo	0,219	0,178	0,527
El Cubo	0,078	0,073	0,249
Hervás	0,172	0,144	0,229
V. del Fresno	0,123	0,096	0,242
Alburquerque	0,231	0,169	0,193
Hornachos	0,212	0,158	0,134
Azuaga	0,207	0,153	0,139
Cazalla de la S.	0,253	0,198	0,245
La Nava de la C.	0,196	0,125	0,131
Puerto de Galis	0,633	0,391	0,948
<i>Kruskal-Wallis</i>	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$

IV.4.1.4.- Cuantificación de compuestos en la estación de invierno.

Como se observa en la Tabla 51, la cantidad de compuestos presentes en las muestras de hojas recogidas en la estación de invierno presenta una variabilidad significativa entre localidades (K-W; $p < 0.05$). La localidad que presenta menor cantidad del compuesto D1 es La Nava con 4,7 mg/g hoja (PS), seguido de Ponferrada con 5,6 mg/g hoja (PS). La mayor cantidad es cuantificada en las hojas recogidas en Puerto de Galis con 13,1 mg/g PS. Para el diterpeno D2 también existen diferencias significativas entre localidades, pasando de los 3,4 mg/g PS de La Nava, a los 9,8 mg/g PS de El Cubo. Por su parte, la cantidad de D3 es mínima en las muestras de hojas procedentes de La Nava con 4,2 mg/g PS y máxima en las hojas de Puerto de Galis con 31,4 mg/g PS y El Cubo con más de 25,0 mg/g PS.

Tabla 51: Cantidad de diterpenos presentes en hojas de *C. ladanifer*, recogidas durante la estación de invierno en doce poblaciones distribuidas de N-S peninsular. Datos expresados en mg/g peso seco de hoja.

	D1	D2	D3
Ponferrada	5,658	4,305	19,900
Destriana	7,573	3,984	6,976
Ricobayo	10,955	7,145	16,397
El Cubo	8,441	9,824	25,650
Hervás	7,814	6,917	17,517
V. del Fresno	8,258	8,613	19,525
Alburquerque	10,434	6,680	19,827
Hornachos	7,007	5,343	10,925
Azuaga	8,020	8,021	16,989
Cazalla de la S.	9,132	7,764	13,862
La Nava de la C.	4,787	3,406	4,236
Puerto de Galis	13,169	7,490	31,436
<i>Kruskal-Wallis</i>	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$

Por su parte, los compuestos presentes en la hojarasca recogida en esta estación (Tabla 52), también presentan cantidades significativamente diferentes entre localidades (K-W; $p < 0.05$). Así, la hojarasca con menor cantidad del D1 es la que procede de Ponferrada con 0,06 mg/g PS. En el extremo opuesto está la recogida en Albuquerque con más de 0,5 mg/g PS, seguido de Azuaga, Cazalla y Puerto de Galis con más de 0,35 mg/g PS. Por su parte, el diterpeno D2 pasa de los 0,06 mg/g PS cuantificado en la hojarasca de Ponferrada, a los 0,3 mg/g PS de Puerto de Galis y Albuquerque. El D3 presenta su mínimo en las muestras de hojarasca procedentes de La Nava y Hornachos con 0,12 mg/g PS y el máximo nuevamente en Puerto de Galis con más de 0,9 mg/g PS.

Tabla 52: Cantidad de diterpenos presentes en la hojarasca de *C. ladanifer*, recogida durante la estación de invierno en doce poblaciones distribuidas de N-S peninsular. Datos expresados en mg/g peso seco de hojarasca.

	D1	D2	D3
Ponferrada	0,069	0,061	0,422
Destriana	0,148	0,121	0,577
Ricobayo	0,201	0,146	0,385
El Cubo	0,073	0,077	0,304
Hervás	0,134	0,112	0,213
V. del Fresno	0,246	0,249	0,476
Albuquerque	0,514	0,294	0,429
Hornachos	0,217	0,139	0,127
Azuaga	0,394	0,280	0,336
Cazalla de la S.	0,395	0,276	0,434
La Nava de la C.	0,121	0,094	0,111
Puerto de Galis	0,354	0,317	0,901
Kruskal-Wallis	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$

IV.4.1.5.- Cuantificación anual de compuestos por localidades.

En las Tablas 53 y 54 se expresa el valor medio anual de cada compuesto encontrado en las muestras de hoja y hojarasca recogidas en las doce poblaciones estudiadas.

Como se observa en la Tabla 53, en las hojas de la población de Puerto de Galis es donde más compuestos se cuantifican, y en las de Hornachos y La Nava donde menos. A pesar de esto, no existen diferencias significativas entre la cantidad media de los compuestos D1 y D2 presentes en las hojas de las doce localidades (K-W; $p > 0.05$). Por su parte, el D3 sí muestra diferencias significativas entre localidades a nivel global (K-W; $p < 0.05$).

Tabla 53: Cantidad media anual de los tres diterpenos presentes en hojas de *C. ladanifer*, recogidas en doce poblaciones distribuidas de N-S peninsular. Datos expresados en mg/g peso seco de hoja.

	D1	D2	D3
Ponferrada	5,369	3,822	15,630
Destriana	6,359	3,827	9,607
Ricobayo	5,853	4,075	12,936
El Cubo	6,248	4,776	13,529
Hervás	6,509	4,676	11,912
V. del Fresno	6,118	5,125	13,483
Alburquerque	6,946	5,023	10,651
Hornachos	5,088	3,419	6,163
Azuaga	5,229	4,757	9,878
Cazalla de la S.	6,259	4,308	8,501
La Nava de la C.	5,422	3,677	5,362
Puerto de Galis	8,275	5,413	19,821
<i>Kruskal-Wallis</i>	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$

Al analizar la cantidad anual media en la hojarasca (Tabla 54), se observa una clara diferencia interpoblacional para los tres compuestos (K-W; $p < 0.05$). La hojarasca que presenta más cantidad de compuesto D1 es la procedente de Hervás, seguida de Valverde del Fresno, Albuquerque y Puerto de Galis, y la que menos en Ponferrada y La Nava. El diterpeno D2 presenta máximos también en las localidades de Hervás, Valverde del Fresno, Azuaga y Puerto de Galis, y mínimos en Ponferrada y La Nava. Por último, la mayor cantidad de D3 se encuentra en la hojarasca de El Cubo, Puerto de Galis y Hervás; y donde menos, nuevamente en Hornachos y La Nava.

Tabla 54: Cantidad media anual de los tres diterpenos presentes en la hojarasca de *C. ladanifer*, recogida en doce poblaciones distribuidas de N-S peninsular. Datos expresados en mg/g peso seco de hojarasca.

	D1	D2	D3
Ponferrada	0,180	0,145	0,521
Destriana	0,376	0,231	0,525
Ricobayo	0,406	0,297	0,789
El Cubo	0,285	0,302	1,056
Hervás	0,635	0,566	1,010
V. del Fresno	0,594	0,428	0,847
Alburquerque	0,552	0,350	0,408
Hornachos	0,301	0,212	0,173
Azuaga	0,502	0,417	0,538
Cazalla de la S.	0,348	0,268	0,390
La Nava de la C.	0,288	0,209	0,251
Puerto de Galis	0,500	0,389	1,031
Kruskal-Wallis	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$

IV.4.1.6.- Análisis estacional en muestras de hojas de jara.

En la Tabla 55 se expresan estacionalmente las cantidades medias de cada uno de los compuestos analizados en las muestras de hojas de jara recogidas en las doce localidades durante un año, expresado en mg/g PS de hoja. Del análisis se observa como en todos los compuestos existen diferencias significativas estacionales, siendo en la estación de invierno seguida de otoño cuando mayor síntesis de compuestos se produce.

Concretamente, en la Figura 19 se observa como el diterpeno D1 no presenta diferencias significativas en la secreción entre las estaciones de primavera y verano, ni tampoco entre el otoño y el invierno, pero si entre las dos parejas de estaciones. Por tanto, es en otoño e invierno cuando más secreción se produce de este compuesto. El compuesto D2 muestra diferencias significativas entre todas las estaciones excepto entre la primavera y el verano, produciéndose una cantidad significativamente mayor en la estación de invierno seguido del otoño. El D3 muestra un comportamiento estacional similar a los otros dos, encontrándose diferencias entre todas las estaciones excepto, en este caso, entre otoño e invierno. Es en otoño e invierno cuando se sintetiza mayor cantidad del compuesto, y en primavera cuando menor es su secreción.

Tabla 55: Cantidad estacional de diterpenos presentes en hojas de *C. ladanifer*. Los resultados muestran la media de doce localidades distribuidas de N-S peninsular. Datos expresados en mg/g peso seco de hoja.

	D1	D2	D3
Primavera	5,38	2,68	5,84
Verano	4,79	3,33	8,41
Otoño	7,62	5,00	14,64
Invierno	8,44	6,62	16,94
Kruskal-Wallis	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05

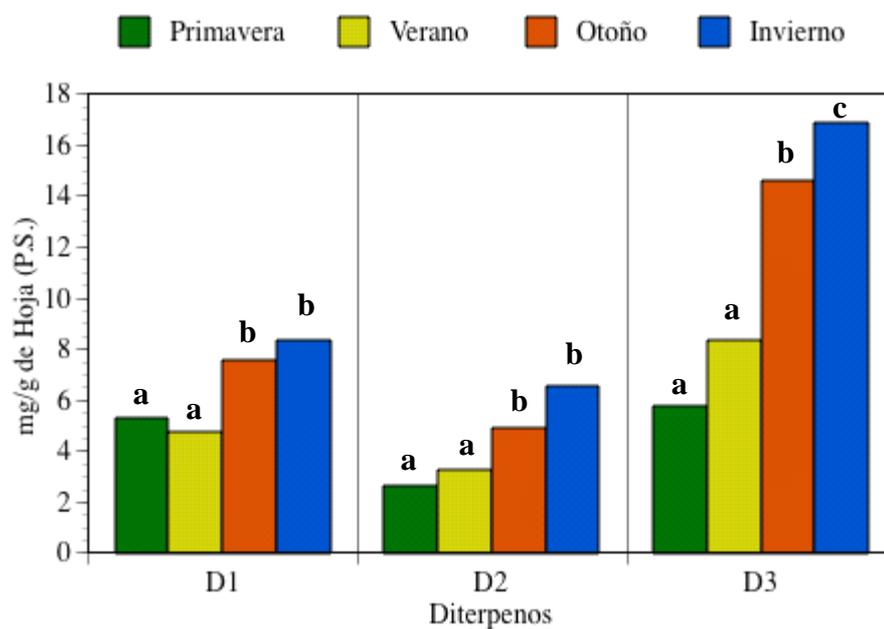


Figura 19: Cantidad estacional media de diterpenos cuantificados en hojas de *C. ladanifer* recogidas en las doce localidades. Datos expresados en mg/g de PS hoja. (a b c: letras iguales, no diferencia significativa: $p > 0,05$, test de Mann-Withney).

IV.4.1.7.- Análisis estacional en muestras de hojarasca de jara.

En la Tabla 56 se expresan, de forma estacional, las cantidades medias de cada uno de los compuestos analizados en las muestras de hojarasca de jara recogidas en las doce poblaciones, expresado en mg/g PS de hojarasca. Obsérvese como en todos los compuestos existen diferencias significativas estacionales.

Tabla 56: Cantidad estacional de diterpenos presentes en hojarasca de *C. ladanifer*. Los resultados muestran la media de doce localidades distribuidas de N-S peninsular. Datos expresados en mg/g peso seco de hojarasca.

	D1	D2	D3
Primavera	0,62	0,47	0,90
Verano	0,58	0,47	0,94
Otoño	0,21	0,15	0,28
Invierno	0,24	0,18	0,39
<i>Kruskal-Wallis</i>	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$

En la Figura 20 podemos observar como las cantidades encontradas de todos los compuestos presentan el mismo patrón.

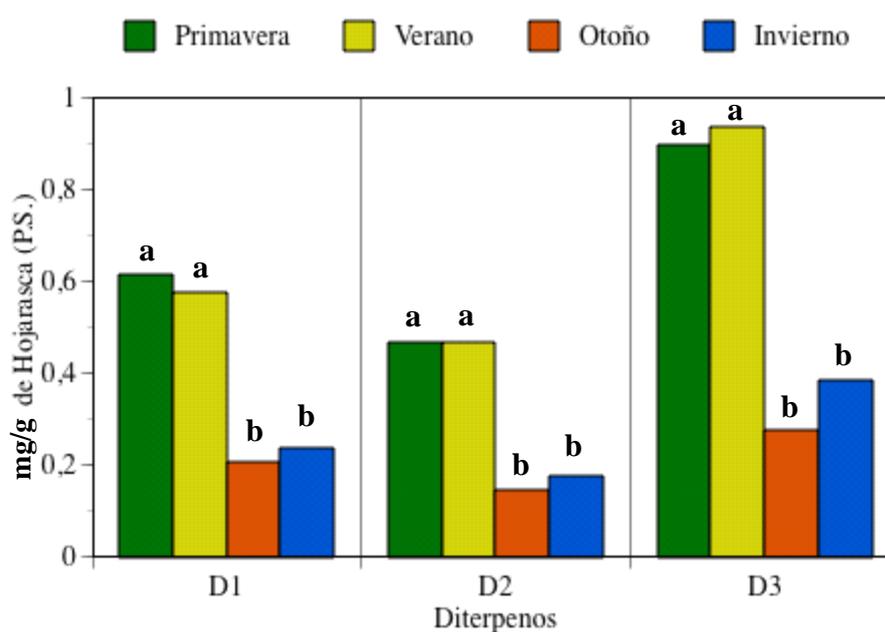


Figura 20: Cantidad estacional media de diterpenos cuantificados en hojarasca de *C. ladanifer* recogida en las doce localidades. Datos expresados en mg/g de PS hojarasca. (a b c: letras iguales, no diferencia significativa: $p > 0,05$, test de Mann-Withney).

Es en las estaciones de primavera y verano cuando se encuentra, en la hojarasca, mayor cantidad de los tres compuestos, no apreciándose diferencias significativas entre las estaciones de primavera y verano, ni tampoco entre el otoño y el invierno, pero si cuando se compara primavera-verano frente a otoño-invierno.

De forma general destacar, que la población que mayor cantidad de compuesto sintetiza en sus hojas, para los tres diterpenos, es Puerto de Galis y la población en la que se ha cuantificado menor cantidad es Hornachos, para D1 y D2 y La Nava de la Concepción para el D3. Por otra parte, existe un claro comportamiento estacional en la síntesis de estos compuestos en la hoja, siendo otoño e invierno donde la síntesis es mayoritaria. Destacar que este comportamiento estacional se produce en la mayoría de las localidades.

Con respecto a la hojarasca, la población que mayor cantidad presenta es Hervás, para los tres diterpenos y la que menor es Ponferrada para D1 y D2 y Hornachos para D3. Igualmente que para las hojas, existe un comportamiento estacional en la presencia de estos compuestos, siendo en este caso las estaciones de verano y primavera cuando mayor cantidad se cuantifica.

IV.4.2.- Análisis de la actividad alelopática de los suelos de jarales procedentes de doce poblaciones.

Para analizar la posible influencia que ejercen las distintas condiciones ambientales en la actividad alelopática de los suelos de jaral, se seleccionaron suelos de doce poblaciones localizadas en Ponferrada, Destriana, Pantano de Ricobayo, El Cubo del Vino, Hervás, Valverde del Fresno, Albuquerque, Hornachos, Azuaga, Cazalla de la Sierra, La Nava de la Concepción y Puerto de Galis, las cuales presentaban valores de precipitación y temperaturas diferentes. Las experiencias se realizaron estacionalmente a lo largo de un año y los datos obtenidos son expresados como porcentajes relativos al control.

IV.4.2.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de primavera.

Como se observa en la Tabla 57, cuando las semillas de *R. crispus* se siembran sobre los suelos de jarales recogidos en la estación de primavera, ni la germinación ni el nacimiento de cotiledones es afectado negativamente, independientemente de donde procedan estos suelos. Por el contrario, cuando se analiza el tamaño de la raíz de las plántulas, en los suelos procedentes de todas las poblaciones, excepto Puerto de Galis, éste parámetro es fuertemente afectado negativamente (M-W; $p < 0.05$). Es de destacar que son los suelos procedentes de Ponferrada y Ricobayo los que presentan raíces de un menor tamaño respecto al control, con un 30% y 31% respectivamente.

Por su parte, el tamaño de los cotiledones también se reduce significativamente en los suelos procedentes de siete de las localidades estudiadas, pero en menor medida que el tamaño de las raíces. Así, el menor crecimiento de los cotiledones respecto al control lo encontramos en los suelos procedentes de Puerto de Galis y Albuquerque, con un 81% y 84% respectivamente.

Tabla 57: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus* sembradas sobre suelo y regadas con agua. Los suelos proceden de jarales distribuidos en doce localidades y recogidos durante la estación de primavera. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

Localidades	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Ponferrada	101	102	30*	102
Destriana	102	100	46*	111
Ricobayo	100	101	31*	103
El Cubo	101	102	62*	102
Hervás	97	98	74*	89*
V. del Fresno	111	105	86*	91*
Alburquerque	91	99	79*	84*
Hornachos	106	115	66*	90*
Azuaga	95	93	89*	97
Cazalla de la S.	98	97	84*	85*
La Nava de la C.	91	91	73*	89*
Puerto de Galis	96	98	106	81*

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

IV.4.2.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de verano.

En la estación de verano y como sucede en el resto de estaciones, no existe efecto negativo significativo (M-W; $p < 0.05$) en ninguno de los suelos estudiados sobre la germinación de las semillas y nacimiento de cotiledones. Pero nuevamente, donde si encontramos inhibición es en los parámetros que miden el desarrollo de la plántula una vez germinada (Tabla 58). Respecto a las raíces, en los suelos de todas las localidades se reduce fuertemente el tamaño de forma significativa (M-W; $p < 0.05$) a excepción de Hervás y Albuquerque. El tamaño de los cotiledones únicamente es inhibido de forma significativa (M-W; $p < 0.05$) en los suelos de Ricobayo, Puerto de Galis, La Nava y Hornachos.

Tabla 58: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus* sembradas sobre suelo y regadas con agua. Los suelos proceden de jarales distribuidos en doce localidades y recogidos durante la estación de verano. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Ponferrada	85	84	45*	111
Destriana	109	109	67*	97
Ricobayo	112	114	47*	91*
El Cubo	105	109	72*	101
Hervás	98	93	109	97
V. del Fresno	106	106	30*	100
Alburquerque	93	94	108	99
Hornachos	94	94	62*	82*
Azuaga	93	92	40*	105
Cazalla de la S.	109	105	84*	109
La Nava de la C.	105	109	66*	81*
Puerto de Galis	102	96	47*	85*

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

IV.4.2.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de otoño.

En la estación de otoño (Tabla 59), al igual que en el resto de estaciones, no se observa inhibición significativa (M-W; $p>0.05$) en la germinación ni en el nacimiento de cotiledones en ninguno de los suelos estudiados.

Por su parte, el tamaño de los cotiledones sólo es inhibido significativamente (M-W; $p<0.05$) en los suelos de dos localidades, Ponferrada y Puerto de Galis. Nuevamente es el tamaño de las raíces el parámetro más afectado negativamente, observándose una reducción significativa respecto al control (M-W; $p<0.05$) en todas las localidades a excepción de Hervás, Ponferrada y Puerto de Galis.

Tabla 59: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus* sembradas sobre suelo y regadas con agua. Los suelos proceden de jarales distribuidos en doce localidades y recogidos durante la estación de otoño. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Ponferrada	106	96	104	80*
Destriana	106	100	54*	106
Ricobayo	99	106	61*	111
El Cubo	93	86	82*	102
Hervás	102	105	98	103
V. del Fresno	110	107	87*	101
Alburquerque	102	106	46*	108
Hornachos	98	103	41*	105
Azuaga	102	104	84*	96
Cazalla de la S.	91	89	67*	108
La Nava de la C.	100	94	53*	93
Puerto de Galis	103	102	91	86*

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

IV.4.2.4.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de invierno.

Como se observa en la Tabla 60, ninguno de los suelos de jara inhiben la germinación de las semillas de *R. crispus* en esta estación, y sólo el suelo procedente de Cazalla de la Sierra inhibe significativamente (M-W; $p < 0.05$) el nacimiento de cotiledones con un 89% respecto al control.

Con respecto al efecto sobre el tamaño de raíces, cinco son las poblaciones que muestran un tamaño significativamente menor que su control (M-W; $p < 0.05$), siendo esta la estación con una inhibición más moderada de este parámetro. En el caso de los cotiledones, su tamaño es ligera pero significativamente inhibido (M-W; $p < 0.05$) en cuatro de los doce suelos estudiados.

Tabla 60: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus* sembradas sobre suelo y regadas con agua. Los suelos proceden de jarales distribuidos en doce localidades y recogidos durante la estación de invierno. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Ponferrada	99	95	106	102
Destriana	107	107	91	111
Ricobayo	99	95	77*	102
El Cubo	108	109	108	86*
Hervás	102	106	73*	91*
V. del Fresno	100	108	71*	106
Alburquerque	102	103	102	92*
Hornachos	104	108	102	102
Azuaga	97	97	84*	92*
Cazalla de la S.	92	89*	113	105
La Nava de la C.	98	92	73*	97
Puerto de Galis	101	101	108	96

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

En resumen cabe destacar que atendiendo al parámetro más afectado negativamente, como es el tamaño de la raíz, existen suelos de cuatro localidades, Ricobayo, Valverde del Fresno, La Nava de la Concepción y Azuaga, donde se produce inhibición en las cuatro estaciones. Por el lado opuesto nos encontramos los suelos procedentes de Puerto de Galis, que solamente afectan negativamente a este parámetro durante el verano.

IV.4.2.5.- Análisis estacional de la actividad alelopática de los suelos de jarales procedentes de doce poblaciones con características climáticas diferentes.

En la Tabla 61 se expresan los valores medios, a nivel estacional, de los distintos parámetros analizados en los ensayos de germinación en los suelos de las doce poblaciones de jarales. Como puede observarse en el análisis global de los datos (Figura 21), el suelo de los jarales seleccionados no inhiben la germinación de las semillas de *R. crispus*, ni el nacimiento y tamaño de sus plántulas. Por el contrario, sí inhibe el tamaño de las raíces de forma significativa (M-W; $p < 0.05$) en las estaciones de primavera, verano y otoño, siendo muy parecida la reducción del tamaño para las tres estaciones.

Tabla 61: Porcentajes estacionales de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíces y longitud de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelos de *C. ladanifer* y regados con agua. Los resultados muestran la media de doce localidades distribuidas de N-S peninsular y son expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Primavera	100	101	69*	95
Verano	98	96	66*	98
Otoño	101	101	73*	103
Invierno	101	101	96	100
Total	100	100	76*	99

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

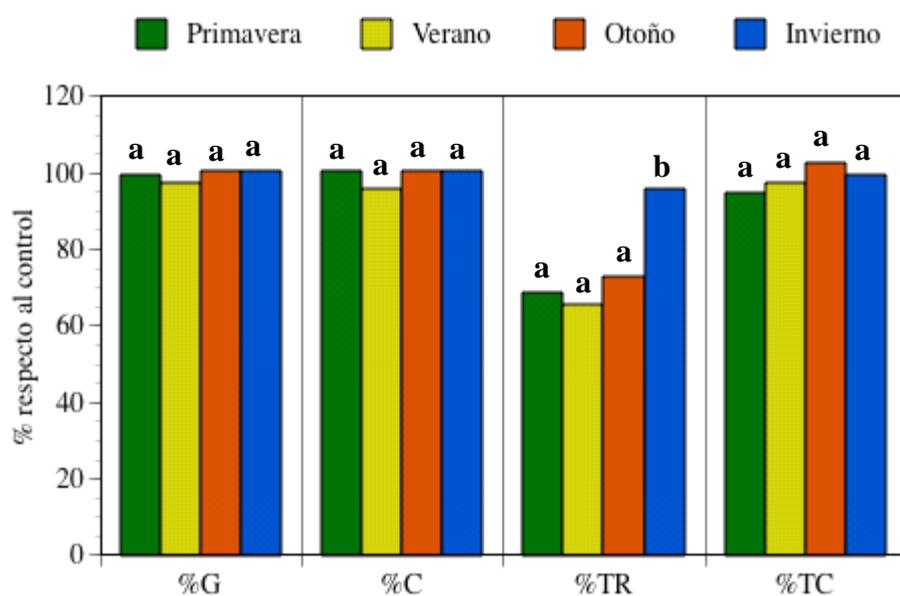


Figura 21: Porcentajes estacionales de germinación (%G), nacimiento de cotiledones (%C), longitud de raíces (%TR) y longitud de cotiledones (%TC) de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelos de *C. ladanifer* y regados con agua. Los resultados muestran la media de 12 localidades distribuidas de N-S peninsular y son expresados como porcentaje relativo al control. (a b c: letras iguales, no diferencia significativa: $p > 0,05$, test de Mann-Whitney).

IV.4.3.- Actividad alelopática de soluciones acuosas de hojas y hojarasca procedentes de doce poblaciones.

Para determinar la actividad alelopática de los distintos compartimentos de la planta que pueden estar implicados en la alelopatía de esta especie, se extrajeron soluciones acuosas de hoja y hojarasca, realizándose ensayos de germinación con semillas de *R. crispus* sembradas sobre papel y sobre suelo control y regadas con estas soluciones. Se analizó estacionalmente el porcentaje de germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de las plántulas crecidas en los bioensayos, expresando los resultados como porcentajes relativos al control.

IV.4.3.1- Efecto alelopático de soluciones acuosas de hojas de C. ladanifer en semillas de R. crispus sembradas en papel.***IV.4.3.1.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de R. crispus en la estación de primavera.***

En la Tabla 62 se aprecia que cuando se añade a las semillas las soluciones acuosas de hojas de las doce poblaciones, el efecto sobre la germinación es prácticamente nulo, produciéndose inhibición únicamente cuando ésta proviene de la localidad de Destriana y a concentración máxima. Por el contrario, el nacimiento de cotiledones sí es fuerte y significativamente disminuido (M-W; $p < 0.05$) por las soluciones procedentes de la mayoría de las poblaciones a concentración 1. Los porcentajes de nacimiento son muy diversos, desde 11% en Ricobayo hasta el 81% en Hornachos. Al ensayar con concentración $\frac{1}{2}$, el efecto de inhibición desaparece en todas las localidades a excepción de El Cubo y Ponferrada.

Con respecto a los parámetros que miden el desarrollo de las plántulas, cabe destacar la inhibición significativa (M-W; $p < 0.05$) que se produce con las soluciones acuosas de todas las poblaciones, tanto en el tamaño de raíz como en el de los cotiledones a concentración 1, y manteniéndose en la mayoría de las localidades cuando se ensaya a concentración $\frac{1}{2}$ (Tabla 62).

Tabla 62: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojas de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de primavera. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% L. raíz		% L. cotiledones	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Ponferrada	93	99	49*	85*	47*	68*	83*	91*
Destriana	71*	105	12*	102	35*	79*	84*	96
Ricobayo	91	104	11*	96	21*	69*	75*	94*
El Cubo	88	103	16*	92*	39*	69*	87*	104
Hervás	100	104	61*	96	42*	73*	79*	95*
V. del Fresno	101	103	78	102	49*	79*	88*	95
Alburquerque	90	96	67*	96	69*	98	81*	97
Hornachos	89	95	81*	89	79*	96	80*	80*
Azuaga	96	98	84	91	61*	97	77*	91*
Cazalla de la S.	96	96	85	90	86*	78*	80*	101
La Nava de la C.	94	95	72*	89	68*	66*	90*	100
Puerto de Galis	94	95	67	95	68*	86*	77*	90*

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

IV.4.3.1.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de R. crispus en la estación de verano.

En los ensayos de germinación realizados con soluciones de hojas recogidas en verano (Tabla 63) se aprecia un mayor número de localidades con inhibición significativa (M-W; $p < 0.05$) que en el resto de estaciones, llegando a reducirse la germinación, como en el caso de Puerto de Galis, al 29%.

Siete son las poblaciones que inhiben significativamente (M-W; $p < 0.05$) este parámetro a concentración 1, y seis las que aún mantienen este efecto al reducir la concentración a la mitad.

El nacimiento de cotiledones es fuertemente inhibido (M-W; $p < 0.05$) cuando se ensaya con las soluciones a concentración 1 procedentes de todas las localidades, excepto de Destriana y Valverde del Fresno. Al disminuir la concentración a la mitad se reduce el efecto sobre este parámetro, aunque se mantiene inhibición significativa en la mayoría de los casos.

Por su parte, los parámetros que miden el desarrollo de las plántulas, tamaño de raíz y tamaño del cotiledón, presentan inhibición significativa (M-W; $p < 0.05$) en todas las localidades cuando se ensaya a concentración 1, y se mantiene en la mayoría de ellas cuando se ensaya a concentración $\frac{1}{2}$. Cabe destacar la localidad de Puerto de Galis en la cual se dan los valores más bajos de germinación y nacimiento de cotiledones y en el que el desarrollo de las plántulas es casi nulo en esta estación.

Tabla 63: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojas de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de verano. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% L. raíz		% L. cotiledones	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Ponferrada	93	77	51*	44*	89*	84*	76*	78*
Destriana	110	100	78	82	92*	81*	73*	73*
Ricobayo	80*	80	61*	68*	80*	83*	78*	77*
El Cubo	92	98	38*	76	90*	68*	77*	72*
Hervás	87	75	46*	69	76*	106	74*	88*
V. del Fresno	104	93	67	92	90*	98	74*	93*
Alburquerque	55*	73*	15*	53*	29*	76	65*	93
Hornachos	77*	92	39*	78*	61*	108	77*	83*
Azuaga	55*	87*	44*	110	66*	99	68*	77*
Cazalla de la S.	42*	74*	37*	74*	33*	108	64*	61*
La Nava de la C.	59*	71*	32*	62*	50*	70*	65*	67*
Puerto de Galis	29*	42*	2*	3*	6*	20*	0*	0*

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

IV.4.3.1.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de otoño.

En la Tabla 64 se observa que, en la estación de otoño, ninguna de las soluciones acuosas de hojas afectan negativamente a la germinación. Sin embargo, el nacimiento de cotiledones si se inhibe significativamente (M-W; $p < 0.05$) con las soluciones de seis de las doce localidades, manteniéndose el efecto en cuatro de ellas al reducir la concentración a la mitad. Del mismo modo, el tamaño de las raíces se reduce significativamente con las soluciones de todas las poblaciones, excepto las procedentes de la Nava de la Concepción y Puerto de Galis. El tamaño de los cotiledones también es reducido de forma significativa en todas las poblaciones, excepto en Hervás y Cazalla de la Sierra.

Tabla 64: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojas de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de otoño. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% L. raíz		% L. cotiledones	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Ponferrada	104	107	88	93	84*	107	87*	103
Destriana	107	92	65*	77*	75*	88*	81*	84*
Ricobayo	106	1	103	104	78*	76*	93*	111
El Cubo	104	107	81	97	88*	109	90*	110
Hervás	112	108	104	104	71*	109	95	104
V. del Fresno	106	108	77*	65*	52*	80*	88*	93
Albuquerque	98	108	63	104	75*	91	64*	73*
Hornachos	91	101	31*	57*	84*	80*	76*	81*
Azuaga	94	96	50*	89	80*	97	56*	72*
Cazalla de la S.	106	107	98	74	82*	91	94	93
La Nava de la C.	100	102	50*	81	90	104	75*	87*
Puerto de Galis	104	101	67*	56*	99	104	82*	86*

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

IV.4.3.1.4.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de invierno.

De las doce soluciones acuosas de hoja ensayadas, sólo tres inhiben significativa, aunque débilmente, el porcentaje de germinación a concentración 1 (Tabla 65). Al reducir la concentración a la mitad, este efecto desaparece en todas las localidades. Por su parte, el nacimiento de cotiledones es inhibido de forma moderada en la mitad de las poblaciones estudiadas, manteniéndose este efecto al reducir la concentración en dos de ellas. Cabe destacar que a concentración 1/2 aparecen dos localidades, Cazalla y Puerto de Galis, cuyas soluciones inhiben este parámetro y no lo hacían a la máxima concentración.

Tabla 65: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojas de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de invierno. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

LOJA	% Germinación		% Cotiledones		% L. raíz		% L. cotiledones	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Ponferrada	90*	100	100	90	59*	71*	95	102
Destriana	88*	100	73*	90	69*	83*	87*	104
Ricobayo	93	101	94	93	68*	80*	90*	107
El Cubo	88*	99	84	80	59*	79*	92	111
Hervás	96	98	93	98	64*	85*	84*	103
V. del Fresno	92	101	54*	100	54*	79*	103	103
Alburquerque	95	94	28*	70*	62*	78*	77*	86*
Hornachos	95	100	56*	99	73*	78*	88*	91*
Azuaga	95	98	84*	80	68*	74*	92*	90*
Cazalla de la S.	94	97	88	65*	68*	69*	85*	92*
La Nava de la C.	94	95	53*	77*	65*	75*	82*	91*
Puerto de Galis	96	91	95	80*	87*	80*	80*	85*

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

En esta estación, el tamaño de la raíz es inhibido de forma significativa (M-W; $p < 0.05$) por todas las soluciones y a las dos concentraciones. Por su parte, el tamaño de los cotiledones también es reducido por las soluciones de hojas de la mayoría de localidades a excepción de El Cubo, Ponferrada y Valverde del Fresno. Al reducir a la mitad la concentración, seis localidades mantienen la inhibición significativa sobre este parámetro.

En resumen, el parámetro más afectado negativamente con las soluciones acuosas de hojas es el tamaño de la raíz, que es inhibida significativamente (M-W; $p < 0.05$) por todas las poblaciones y en todas las estaciones, a excepción de Puerto de Galis y La Nava de la Concepción, cuyas soluciones no inhiben este parámetro en la estación de otoño.

IV.4.3.1.5.- Efecto alelopático estacional de soluciones acuosas de hoja de C. ladanifer en semillas de R. crispus sembradas en papel.

En la Tabla 66 se reflejan estacionalmente los resultados obtenidos al realizar la media de las doce poblaciones en los porcentajes de los distintos parámetros analizados en los ensayos de germinación.

Tabla 66: Porcentajes estacionales de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíces y longitud de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre papel y regados con soluciones acuosas de hojas de *C. ladanifer*. Los resultados muestran la media de doce localidades distribuidas de N-S peninsular y son expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% L. raíz		% L. cotiledones	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Primavera	92	99	57*	94	55*	80*	82*	95
Verano	74*	80*	43*	68*	64*	84*	66*	72*
Otoño	103	104	73*	83	80*	95	82*	92
Invierno	93	98	75*	85	67*	78*	88*	97
Total	90	95	62*	83	67*	84*	80*	89

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

Respecto al porcentaje de germinación se observa inhibición significativa únicamente en la estación de verano, tanto a concentración 1 como $\frac{1}{2}$, obteniéndose diferencias significativas entre los porcentajes de todas las estaciones (M-W; $p < 0.05$) excepto entre primavera e invierno (M-W; > 0.05) (Figura 22).

Por su parte, el nacimiento de cotiledones es inhibido significativamente en todas las estaciones a concentración 1, perdiéndose el efecto al disminuir la concentración, excepto en verano. Además, como se observa en la Figura 22, existen diferencias entre los distintos porcentajes estacionales, produciéndose en verano una reducción significativamente mayor en la presencia de cotiledones que en el resto de estaciones.

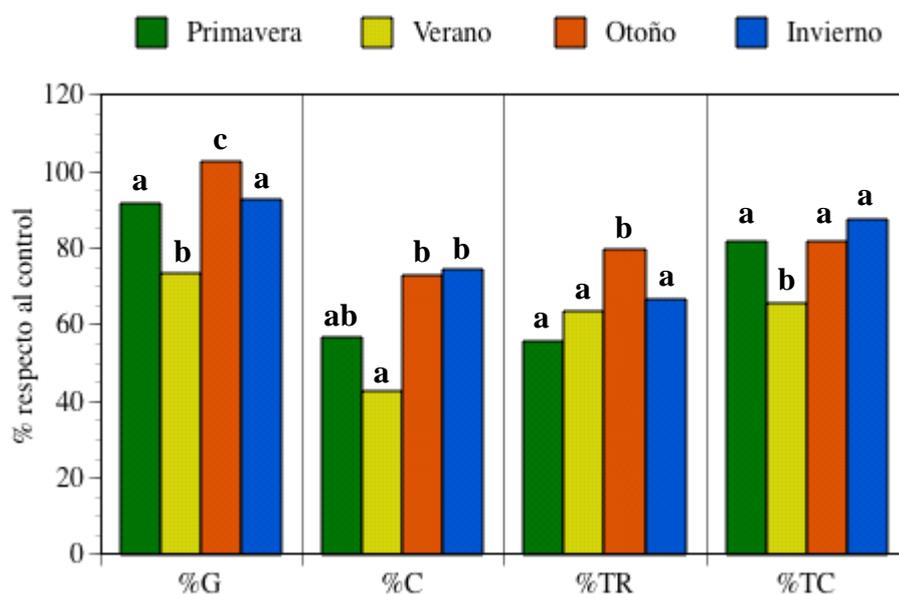


Figura 22: Porcentajes estacionales de germinación (%G), nacimiento de cotiledones (%C), longitud de raíces (%TR) y longitud de cotiledones (%TC) de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre papel y regados con soluciones acuosas de hojas de *C. ladanifer*. Los resultados muestran la media de 12 localidades distribuidas de N-S peninsular y son expresados como porcentaje relativo al control. (a b c: letras iguales, no diferencia significativa: $p > 0,05$, test de Mann-Withney).

El tamaño de las raíces también es reducido de forma significativa en todas las estaciones cuando ensayamos con las soluciones de hoja de jara a concentración 1, manteniéndose el efecto al disminuir la concentración en las estaciones de primavera, verano e invierno. Como se observa en la Figura 22, no se aprecian grandes diferencias estacionales significativas, salvo el valor producido en otoño, el cual se separa del resto.

Por último, el tamaño de los cotiledones es reducido de forma significativa en todas las estaciones cuando ensayamos con las soluciones de hoja de jara a concentración 1, perdiéndose el efecto al disminuir la concentración en todas las estaciones excepto en verano. Por su parte, como se observa en la Figura 22, tampoco se aprecian grandes diferencias estacionales significativas, excepto entre los valores que se dan en verano y los del resto de estaciones.

Si se analizan estos resultados como un único valor anual formado con la media de las doce poblaciones (Tabla 66), se puede establecer que: la solución acuosa de hojas no afecta al porcentaje de germinación; que se produce una reducción significativa en el nacimiento de cotiledones a la máxima concentración; que el tamaño de la raíz sufre una reducción significativa por parte de las soluciones de hoja, tanto a concentración 1 como $\frac{1}{2}$ y que el tamaño de cotiledones también es inhibido significativamente pero solamente a la máxima concentración.

IV.4.3.2.- Efecto alelopático de soluciones acuosas de hojarasca de C. ladanifer en semillas de R. crispus sembradas sobre papel.

IV.4.3.2.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de R. crispus en la estación de primavera.

En la Tabla 67 se observa el escaso efecto de las soluciones de hojarasca sobre la germinación en esta estación, encontrándose inhibición significativa (M-W; $p < 0.05$) únicamente a la máxima concentración con las soluciones procedentes de las poblaciones de Hervás, Azuaga y Albuquerque. Por el contrario, todas las soluciones afectan negativamente el nacimiento de cotiledones, a excepción de la solución de Ponferrada. Los porcentajes de nacimiento de cotiledones van desde el 21% en Hervás hasta el 89% en Destriana. Al ensayar con concentración $\frac{1}{2}$, el efecto de inhibición desaparece en todas las localidades a excepción de Puerto de Galis y Albuquerque.

Por su parte, el tamaño de las raíces es reducido significativamente (M-W; $p < 0.05$) en prácticamente todas las localidades, manteniéndose este efecto a concentración $\frac{1}{2}$ en la mayoría de ellas. El tamaño de los cotiledones también es significativamente reducido, aunque de forma más moderada, con las soluciones acuosas procedentes de la mayoría de las poblaciones, y se mantiene al ensayar a concentración $\frac{1}{2}$ en siete de las nueve que presentan inhibición.

Tabla 67: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojarasca de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de primavera. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% L. raíz		% L. cotiledones	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Ponferrada	103	104	98	100	43*	77*	95	94*
Destriana	107	102	89*	103	58*	79*	91*	93*
Ricobayo	97	104	66*	103	65*	91*	100	108
El Cubo	102	103	52*	102	39*	71*	90*	106
Hervás	85*	90	21*	63	51*	66*	81*	94*
V. del Fresno	93	100	53*	87	50*	80*	105	91*
Alburquerque	86*	89	63*	63*	48*	85*	74*	91*
Hornachos	98	97	82*	89	74*	99	87*	100
Azuaga	86*	97	41*	84	43*	82*	72*	101
Cazalla de la S.	96	100	86*	99	104	110	81*	91*
La Nava de la C.	94	96	72*	96	84*	108	87*	100
Puerto de Galis	88	96	64*	82*	83*	99	78*	85*

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

IV.4.3.2.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de verano.

En los ensayos de germinación realizados con soluciones de hojarasca recogida en verano (Tabla 68) se observa que, al contrario que en el resto de estaciones, la mayoría de localidades inhiben fuertemente la germinación, llegando a reducirse la germinación, como en el caso de Puerto de Galis, al 7%. Con seis de las soluciones acuosas de hojarasca, aún se mantiene un fuerte efecto al reducir la concentración a la mitad. El nacimiento de cotiledones se inhibe casi totalmente cuando se ensaya con solución de hojarasca a concentración 1 procedentes de todas las localidades, excepto en Ponferrada. Al disminuir la concentración a

la mitad, en ciertas localidades se reduce su efecto, aunque en la mayoría de los casos se mantiene una fuerte inhibición significativa (M-W; $p < 0.05$).

Tabla 68: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojarasca de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de verano. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% L. raíz		% L. cotiledones	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Ponferrada	90	100	75	94	108	118	81*	82*
Destriana	76	100	22*	96	57*	81*	58*	80*
Ricobayo	86*	89	48*	40*	96	85*	73*	69*
El Cubo	49*	86	0*	33*	8*	59*	54*	69*
Hervás	43*	88	6*	30*	22*	81*	52*	76*
V. del Fresno	81	86	17*	51*	60*	102	69*	75*
Alburquerque	24*	33*	0*	5*	6*	6*	0*	61*
Hornachos	8*	34*	0*	3*	6*	10*	0*	61*
Azuaga	13*	28*	0*	2*	6*	6*	0*	0*
Cazalla de la S.	17*	24*	0*	2*	6*	6*	0*	0*
La Nava de la C.	20*	19*	0*	0*	6*	6*	0*	0*
Puerto de Galis	7*	18*	0*	0*	8*	26*	0*	0*

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

Por su parte, los parámetros que miden el desarrollo de las plántulas, tamaño de raíz y tamaño del cotiledón, también se ven fuertemente afectados negativamente. Se aprecia inhibición significativa en todas las localidades cuando se ensaya a concentración 1 y se mantiene en la mayoría de las localidades cuando se ensaya a 1/2.

Cabe destacar los porcentajes obtenidos en las localidades de Puerto de Galis, Cazalla, La Nava, Hornachos, Azuaga y Alburquerque, en las cuales se obtienen los valores más bajos de germinación y en el que apenas se desarrollan las plántulas incluso a $\frac{1}{2}$.

IV.4.3.2.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de R. crispus en la estación de otoño.

En la Tabla 69 se observa claramente como las soluciones acuosas de hojarasca de jara obtenidas en otoño no presentan efecto alguno, a ambas concentraciones, ni sobre la germinación ni sobre el nacimiento de cotiledones en semillas de *R. crispus*.

Por el contrario, el tamaño de las raíces se reduce significativamente (M-W; $p < 0.05$) con las soluciones procedentes de cuatro de las doce localidades, manteniéndose el efecto en tres de ellas al reducir la concentración.

Del mismo modo, el tamaño de los cotiledones también es ligeramente reducido, aunque de forma significativa, en El Cubo, Valverde del Fresno y La Nava. Curiosamente, al reducir la concentración a $\frac{1}{2}$, aumenta el número de localidades cuya solución de hojarasca inhibe de forma significativa el tamaño de los cotiledones, pasando de tres a siete poblaciones

Tabla 69: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojarasca de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de otoño. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% L. raíz		% L. cotiledones	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Ponferrada	104	105	101	91	107	105	113	88*
Destriana	104	107	108	14	100	90	94	80*
Ricobayo	106	110	105	108	93	95	98	100
El Cubo	107	102	96	95	82*	88*	107	105
Hervás	107	98	99	85	87*	108	112	108
V. del Fresno	99	105	97	108	81*	88*	91*	96
Alburquerque	106	111	87	78	108	109	88	98
Hornachos	101	111	93	106	100	111	92	84*
Azuaga	99	105	80	72	86	89	83*	80*
Cazalla de la S.	102	101	100	100	105	90	91	78*
La Nava de la C.	104	106	80	78	76*	60*	97	82*
Puerto de Galis	107	107	85	100	102	107	81*	84*

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

IV.4.3.2.4.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de invierno.

Como se observa en la Tabla 70, las soluciones de hojarasca en esta estación ejercen un reducido efecto negativo sobre la mayoría de los parámetros medidos. Sólo el tamaño de las raíces se ve inhibido de forma significativa (M-W; $p < 0,05$) en cuatro de las doce localidades, perdiéndose el efecto en dos de ellas al reducir la concentración.

Tabla 70: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados con soluciones acuosas, a dos concentraciones, de hojarasca de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de invierno. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% L. raíz		% L. cotiledones	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Ponferrada	101	104	101	106	89	90	100	99
Destriana	89	99	93	102	65*	89	103	111
Ricobayo	98	96	93	93	93	107	105	107
El Cubo	102	97	93	99	55*	77*	108	108
Hervás	96	97	95	94	85*	88	100	103
V. del Fresno	94	99	79	104	52*	76*	110	100
Alburquerque	96	98	96	99	106	100	102	104
Hornachos	99	101	98	103	106	107	95	97
Azuaga	96	99	98	101	96	92	104	107
Cazalla de la S.	95	98	88	93	98	92	104	108
La Nava de la C.	95	97	90	88	94	102	95	100
Puerto de Galis	93	98	85	93	101	112	104	106

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

En resumen, destacar, que nuevamente el parámetro más afectado con las soluciones de hojarasca es el tamaño de la raíz, aunque en menor medida que con las soluciones de hojas. Las dos únicas poblaciones, cuyas soluciones acuosas inhiben significativamente en las cuatro estaciones este parámetro son El Cubo y Valverde del Fresno.

IV.4.3.2.5- Efecto alelopático estacional de soluciones acuosas de hojarasca de *C. ladanifer* en semillas de *R. crispus* sembradas en papel.

En la Tabla 71 se reflejan estacionalmente los resultados obtenidos al realizar la media de las doce poblaciones en los porcentajes de los distintos parámetros analizados cuando se utilizan las soluciones de hojarasca.

Tabla 71: Porcentajes estacionales de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíces y longitud de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre papel y regados con soluciones acuosas de hojarasca de *C. ladanifer*. Los resultados muestran la media de doce localidades distribuidas de N-S peninsular y son expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación		% Cotiledones		% L. raíz		% L. cotiledones	
	1	1/2	1	1/2	1	1/2	1	1/2
Primavera	95	98	66*	89	63*	89*	87*	96*
Verano	43*	59*	14*	30*	33*	51*	31*	48*
Otoño	104	106	94	96	98	95	99	93*
Invierno	96	98	92	98	89	96	103	102
Total	84	90	66*	78	71*	83*	82*	86*

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

Respecto al porcentaje de germinación (Tabla 71), se observa inhibición significativa únicamente en la estación de verano, tanto a concentración 1 como 1/2, encontrándose diferencias significativas entre los porcentajes de todas las estaciones (M-W; < 0.05) excepto entre primavera e invierno (M-W; > 0.05) (Figura 23).

Por su parte, el nacimiento de cotiledones es inhibido de forma significativa en las estaciones de primavera y verano cuando ensayamos a concentración 1, manteniéndose un fuerte efecto al disminuir la concentración en la estación de verano. Además, como se observa en la Figura 23, existen diferencias significativas entre todos los porcentajes

estacionales, excepto entre los de otoño e invierno, produciéndose en verano una reducción significativamente mayor en la presencia de cotiledones que en el resto de estaciones.

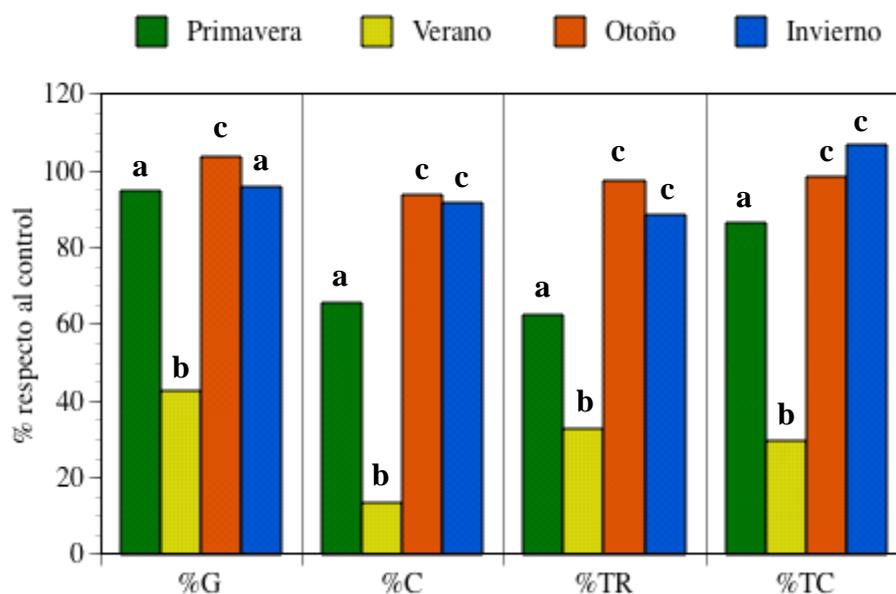


Figura 23: Porcentajes estacionales de germinación (%G), nacimiento de cotiledones (%C), longitud de raíces (%TR) y longitud de cotiledones (%TC) de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre papel y regados con soluciones acuosas de hojas de *C. ladanifer*. Los resultados muestran la media de 12 localidades distribuidas de N-S peninsular y son expresados como porcentaje relativo al control. (a b c: letras iguales, no diferencia significativa: $p > 0,05$, test de Mann-Whitney).

El tamaño de las raíces también es reducido de forma significativa en las estaciones de primavera y verano cuando ensayamos con las soluciones de hojarasca de jara a concentración 1, manteniéndose el efecto en ambas estaciones al reducir la concentración a la mitad. Por otro lado, se aprecian diferencias estacionales significativas entre los valores porcentuales de todas las estaciones excepto entre otoño e invierno. Así, el efecto de

inhibición que se produce en verano es significativamente mayor que el que se produce en primavera, y este que el de otoño e invierno (Figura 23).

Por último, el tamaño de los cotiledones es reducido de forma significativa en las estaciones de primavera y verano, cuando ensayamos con las soluciones de hojarasca de jara a concentración 1, manteniéndose el efecto en ambas estaciones al reducir la concentración a la mitad, e incluso inhibiendo de forma significativa en la estación de otoño. Por su parte, como se observa en la Figura 23, las diferencias estacionales significativas son patentes entre todas las estaciones excepto entre otoño e invierno. En verano, el tamaño de los cotiledones se ve reducido de forma significativamente mayor que en el resto de estaciones.

Si se analizan estos resultados como un único valor anual y con la media de las 12 poblaciones (Tabla 71), se puede establecer que: la solución acuosa de hojarasca no inhibe significativamente la germinación; que existe inhibición significativa en el nacimiento de cotiledones a la máxima concentración; y que tanto el tamaño de raíz como de cotiledones se reduce significativamente a las dos concentraciones ensayadas.

IV.4.3.3.- Efecto alelopático de soluciones acuosas de hoja de C. ladanifer en semillas de R. crispus sembradas en suelos.

Con el objeto de aproximarnos más a las condiciones naturales de germinación, se utilizaron suelos como sustrato de siembra. Para ello, las mismas soluciones acuosas utilizadas para regar las semillas sembradas sobre papel se utilizaron en los ensayos con suelos. Estos suelos fueron recogidos en cada población de jara seleccionada, pero fuera de la influencia de *C. ladanifer*. Se analizó estacionalmente durante un año el porcentaje de germinación, nacimiento de cotiledones y tamaños de raíz y cotiledón de las plántulas crecidas en los bioensayos, expresando los resultados como porcentaje referido al control.

IV.4.3.3.1- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de primavera.

Como se observa en la Tabla 72, en la estación de primavera sólo encontramos efecto negativo sobre la germinación cuando se ensaya con muestras recogidas en la localidad de Ponferrada (M-W; $p < 0.05$). El nacimiento de cotiledones es reducido significativamente en tres de las doce localidades. Pero son los parámetros que hacen referencia al desarrollo de la plántula los más afectados de forma general. Así, en cinco poblaciones se produce inhibición del tamaño de las raíces (M-W, $p < 0.05$) y en diez se inhibe el tamaño de los cotiledones. Cabe destacar los porcentajes obtenidos en la localidad de Ponferrada cuyos valores son los más bajos en todos los parámetros cuantificados.

Tabla 72: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelo control y regados con soluciones acuosas de hojas de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de primavera. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Ponferrada	17*	0*	10*	0*
Destriana	93	86	102	90*
Ricobayo	101	40*	42*	75*
El Cubo	100	90	97	85*
Hervás	90	89	96	97
V. del Fresno	106	104	79*	87*
Alburquerque	90	94	93	87*
Hornachos	106	82	69*	75*
Azuaga	92	90	101	90*
Cazalla de la S.	98	97	104	99
La Nava de la C.	93	89*	89*	86*
Puerto de Galis	96	99	95	83*

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

IV.4.3.3.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de verano.

En la estación de verano existe efecto negativo, tanto en la germinación como en el nacimiento de cotiledones, únicamente cuando ensayamos con muestras recogidas en las localidades de Puerto de Galis y Albuquerque (Tabla 73). Al igual que ocurre en el resto de ensayos, los parámetros referentes al desarrollo de la plántula son los más afectados negativamente en la mayoría de las localidades. Siete son las poblaciones cuyas soluciones acuosas reducen significativa el tamaño de las raíces; y excepto en Ricobayo y Albuquerque, el tamaño de los cotiledones se inhibe significativamente con las soluciones procedentes de todas las poblaciones. Cabe destacar los porcentajes de la localidad de Puerto de Galis, cuyos valores son los más bajos de todos los parámetros medidos en esta estación.

Tabla 73: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelo control y regados con soluciones acuosas de hojas de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de verano. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Ponferrada	92	92	98	91*
Destriana	102	102	80*	91*
Ricobayo	103	106	79*	95
El Cubo	91	96	75*	80*
Hervás	101	101	90*	88*
V. del Fresno	99	96	77*	76*
Albuquerque	75*	74*	88*	97
Hornachos	90	86	111	86*
Azuaga	101	102	97	83*
Cazalla de la S.	93	93	99	72*
La Nava de la C.	105	108	107	85*
Puerto de Galis	41*	6*	24*	0*

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

IV.4.3.3.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de otoño.

En la Tabla 74 se observa como las soluciones acuosas de hojas de jara procedentes de las doce localidades y recogidas en la estación de otoño no afectan a la germinación de semillas de *R. crispus* sembradas sobre suelo control, además del escaso efecto en el resto de parámetros. Así, el nacimiento de cotiledones es inhibido únicamente en dos de las doce localidades, el tamaño de las raíces presenta una ligera inhibición aunque significativa (M-W, $p < 0.05$) en cinco de las doce poblaciones y el tamaño de los cotiledones en seis, no encontrándose ningún porcentaje por debajo del 73%.

Tabla 74 : Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelo control y regados con soluciones acuosas de hojas de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de otoño. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Ponferrada	102	101	79*	85*
Destriana	116	110	91	98
Ricobayo	95	92	87*	91
El Cubo	92	87	104	103
Hervás	99	95	83*	86*
V. del Fresno	103	104	104	90*
Alburquerque	93	83*	98	83*
Hornachos	107	109	73*	100
Azuaga	103	103	10	101
Cazalla de la S.	92	83*	109	87*
La Nava de la C.	101	98	82*	93
Puerto de Galis	97	91	106	86*

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

IV.4.3.3.4.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de invierno.

Cuando se ensaya con soluciones de hojas obtenidas en la estación de invierno (Tabla 75), los porcentajes tanto de germinación como de nacimiento de cotiledones no se reducen significativamente en ninguna de las doce poblaciones. Además, el tamaño de las raíces es ligeramente reducido de forma significativa en sólo dos de ellas. Por su parte, el tamaño de los cotiledones es inhibido significativamente en un mayor número de localidades, siete en concreto, aunque con porcentajes que no bajan del 82%.

Tabla 75: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelo control y regados con soluciones acuosas de hojas de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de invierno. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Ponferrada	99	98	116	85*
Destriana	104	92	104	86*
Ricobayo	92	84	77*	82*
El Cubo	104	100	110	83*
Hervás	98	94	111	87*
V. del Fresno	100	104	91*	104
Alburquerque	98	98	107	97
Hornachos	99	99	109	90*
Azuaga	102	101	93	98
Cazalla de la S.	99	99	103	97
La Nava de la C.	101	101	105	88*
Puerto de Galis	98	96	103	111

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

Si se comparan los resultados obtenidos en estas experiencias con los obtenidos cuando se siembra sobre papel y se riegan con estas mismas soluciones (Tablas 62 - 70), cabe destacar que en los suelos las soluciones son menos activas. Aunque hay inhibición en el tamaño de raíces y de cotiledones, el número de poblaciones donde se observa inhibición es menor que cuando se siembra sobre papel. Esta diferencia es acrecentada en las estaciones de otoño e invierno, pues sobre papel el tamaño de las raíces es inhibido prácticamente en todas las localidades. Por el contrario, cuando se siembra sobre suelo, solamente hay inhibición en cinco localidades en la estación de otoño y en dos durante el invierno.

IV.4.3.3.5.- Efecto alelopático estacional de soluciones acuosas de hoja de C. ladanifer en semillas de R. crispus sembradas sobre suelo control.

En la Tabla 76 se reflejan estacionalmente los resultados obtenidos al realizar la media de las 12 poblaciones en los porcentajes de los distintos parámetros analizados en los ensayos. Respecto al porcentaje de germinación y nacimiento de cotiledones, no se observa inhibición significativa en ninguna de las cuatro estaciones.

Tabla 76: Porcentajes estacionales de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíces y longitud de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelos control y regadas con soluciones acuosas de hojas de *C. ladanifer*. Los resultados muestran la media de doce localidades distribuidas de N-S peninsular y son expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Primavera	90	80	82	80*
Verano	92	89	86*	79*
Otoño	100	97	95	93*
Invierno	99	97	102	92*
Total	95	91	92	86*

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

Por su parte, las raíces ven reducida significativamente su longitud únicamente cuando se ensaya con las muestras recogidas en verano. El tamaño de los cotiledones es el parámetro más afectado negativamente en las cuatro estaciones, aunque no se observan diferencias significativas entre los porcentajes estacionales (K-W; $p > 0.05$) (Figura 24).

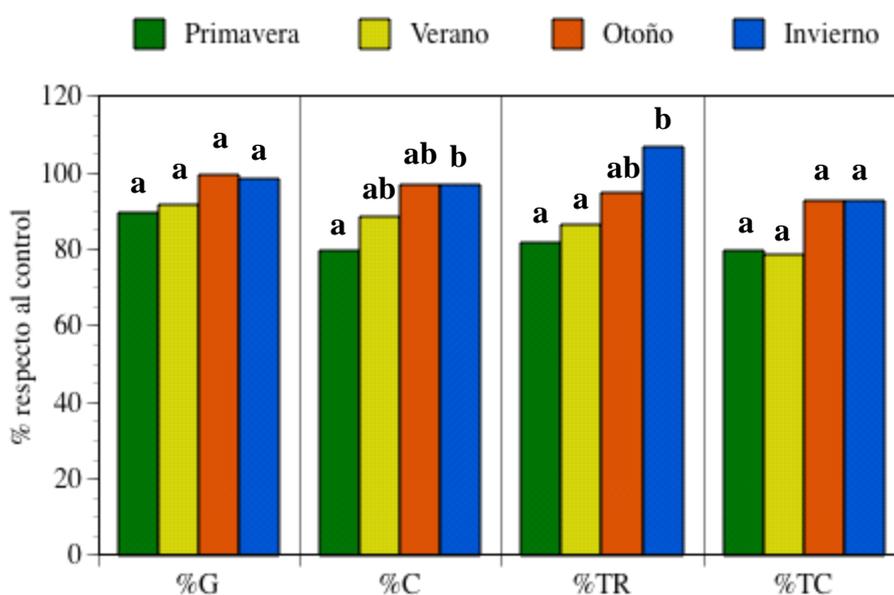


Figura 24: Porcentajes estacionales de germinación (%G), nacimiento de cotiledones (%C), longitud de raíces (%TR) y longitud de cotiledones (%TC) de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelos control y regados con solución acuosa de hoja. Los resultados muestran la media de 12 localidades distribuidas de N-S peninsular y son expresados como porcentaje relativo al control. (a b c: letras iguales, no diferencia significativa: $p > 0,05$, test de Mann-Withney).

IV.4.3.4.- Efecto alelopático de soluciones acuosas de hojarasca de C. ladanifer en semillas de R. crispus.

Al igual que en los cinco subapartados anteriores, los resultados que a continuación se exponen provienen de experiencias en las cuales se utiliza suelo como sustrato de siembra.

IV.4.3.4.1.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de R. crispus en la estación de primavera.

En esta estación (Tabla 77), al igual que ocurriera en los ensayos con solución de hoja, se aprecia una disminución significativa (M-W; $p < 0.05$) de la germinación únicamente cuando se ensaya con muestras de hojarasca recogidas en la localidad de Ponferrada.

El nacimiento de cotiledones se ve reducido significativamente en tres de las doce localidades, pero nuevamente son los parámetros referentes al desarrollo de la plántula, y en concreto el tamaño de los cotiledones, los que se ven afectados negativamente de forma más general. De tal manera que son cuatro las poblaciones en las que se produce una reducción significativa en el tamaño de las raíces.

Por último, el tamaño de cotiledones es inhibido significativamente (M-W; $p < 0.05$) en todas las poblaciones, excepto en Cazalla de la Sierra. Cabe destacar, una vez más, los porcentajes obtenidos en la localidad de Ponferrada, cuyos valores son los más bajos en todos los parámetros cuantificados.

Tabla 77: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelo control y regados con soluciones acuosas de hojarasca de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de primavera. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Ponferrada	31*	17*	27*	75*
Destriana	105	100	110	86*
Ricobayo	99	83*	53*	75*
El Cubo	100	99	101	89*
Hervás	101	103	111	91*
V. del Fresno	108	109	110	87*
Albuquerque	95	95	89*	79*
Hornachos	96	79*	73*	67*
Azuaga	97	93	108	82*
Cazalla de la S.	98	94	96	95
La Nava de la C.	95	93	107	90*
Puerto de Galis	93	99	106	81*

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

IV.4.3.4.2.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de verano.

En la estación de verano se ha encontrado un fuerte efecto negativo, tanto en la germinación como en el nacimiento de cotiledones, al ensayar con muestras de hojarasca recogidas en las localidades de Puerto de Galis, Hornachos, Azuaga y Albuquerque (Tabla 78). Por su parte, el tamaño de las raíces sólo es inhibido cuando se ensaya con muestras procedentes de Puerto de Galis y Destriana. En este caso, el parámetro más afectado negativamente en mayor número de localidades es el tamaño de los cotiledones, donde en once de las doce poblaciones se produce inhibición significativa (M-W; $p < 0,05$). Cabe

destacar los porcentajes obtenidos en la localidad de Puerto de Galis, cuyos valores son los más bajos en todos los parámetros medidos en esta estación, al igual que ocurriera en los ensayos con solución de hoja (Tabla 73).

Tabla 78: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelo control y regados con soluciones acuosas de hojarasca de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de verano. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Ponferrada	104	99	112	93*
Destriana	107	107	90*	88*
Ricobayo	99	100	112	89*
El Cubo	90	85	102	61*
Hervás	104	104	106	81*
V. del Fresno	107	106	116	86*
Alburquerque	44*	41*	109	89*
Hornachos	67*	67*	107	72*
Azuaga	39*	37*	105	97
Cazalla de la S.	93	93	107	79*
La Nava de la C.	91	92	110	80*
Puerto de Galis	56*	0*	12*	0*

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

IV.4.3.4.3.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de otoño.

Cuando se ensaya con soluciones de hojarasca recogida en la estación de otoño (Tabla 79), los porcentajes tanto de germinación como de nacimiento de cotiledones no muestran efecto negativo significativo (M-W; $p > 0.05$) en ninguna de las doce localidades. El tamaño de las raíces es ligeramente reducido de forma significativa únicamente en Hornachos. Por su parte, el tamaño de los cotiledones presenta una ligera pero significativa inhibición en seis de las doce localidades.

Tabla 79: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelo control y regados con soluciones acuosas de hojarasca de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de otoño. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Ponferrada	101	100	109	88*
Destriana	108	119	94	92
Ricobayo	98	104	95	90
El Cubo	97	90	111	101
Hervás	107	107	94	84*
V. del Fresno	110	111	106	91*
Alburquerque	102	101	109	98
Hornachos	101	99	75*	79*
Azuaga	107	106	109	100
Cazalla de la S.	92	83	110	89*
La Nava de la C.	100	101	103	95
Puerto de Galis	95	86	90	80*

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

IV.4.3.4.4.- Efecto sobre la germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de raíz y cotiledones de semillas de *R. crispus* en la estación de invierno.

En la Tabla 80 se observa como la germinación y el nacimiento de cotiledones no son afectados negativamente por ninguna de las doce soluciones acuosas de hojarasca. Cabe destacar también, el escaso efecto en el resto de parámetros. Así, el tamaño de las raíces se reduce significativamente (M-W; $p < 0.05$) sólo al ensayar con muestras procedentes de la localidad de Puerto de Galis. Por su parte, el nacimiento de cotiledones presenta una ligera aunque significativa inhibición en cinco de las doce localidades, no encontrándose ningún porcentaje por debajo del 85%.

Tabla 80: Porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíz y de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelo control y regados con soluciones acuosas de hojarasca de *C. ladanifer* recogidas en doce localidades durante la estación de invierno. Datos expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Ponferrada	97	99	109	89*
Destriana	99	96	110	93*
Ricobayo	93	92	110	89*
El Cubo	106	107	110	107
Hervás	111	109	109	85*
V. del Fresno	99	104	105	98
Alburquerque	98	98	99	99
Hornachos	101	103	106	102
Azuaga	102	101	96	108
Cazalla de la S.	102	100	102	108
La Nava de la C.	103	99	93	91*
Puerto de Galis	103	102	87*	97

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

Al igual que ocurriera con las experiencias realizadas sobre suelo control y regadas con soluciones acuosas de hojas, cuando estos suelos son regados con soluciones de hojarasca, el efecto es menor que cuando se ensaya sobre papel, siendo igualmente más evidente en las estaciones de otoño e invierno.

IV.4.3.4.5.- Efecto alelopático estacional de soluciones acuosas de hojarasca de C. ladanifer en semillas de R. crispus sembradas sobre suelo control.

En la Tabla 81 se expresan los valores estacionales de cada parámetro al regar con soluciones acuosas de hojarasca.. Como puede observarse, la germinación únicamente es inhibida de forma significativa en la estación de verano. Lo mismo sucede con el nacimiento de cotiledones, encontrando diferencias estacionales significativas entre los valores de este parámetro en verano y el resto de estaciones (Figura 25).

Por su parte, el tamaño de las raíces no se ve afectado negativamente por las soluciones de hojarasca de ninguna estación. Nuevamente el tamaño de los cotiledones es el parámetro afectado negativamente de forma más generalizada, produciéndose inhibición significativa en primavera, verano y otoño. Además, encontramos diferencias significativas entre todos los valores estacionales excepto entre primavera y verano, siendo la inhibición en estas estaciones significativamente mayores que en otoño, y ésta a su vez a los valores obtenidos en invierno (Figura 25).

Como se puede observar del análisis global de los datos (Tabla 81), nuevamente el único parámetro que es inhibido, en este ensayo a lo largo del año, es el tamaño de los cotiledones.

Tabla 81: Porcentajes estacionales de germinación, nacimiento de cotiledones, longitud de raíces y longitud de cotiledones de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelos control y regadas con soluciones acuosas de hojarasca de *C. ladanifer*. Los resultados muestran la media de doce localidades distribuidas de N-S peninsular y son expresados como porcentaje relativo al control.

	% Germinación	% Cotiledones	% L. raíz	% L. cotiledones
Primavera	93	89	93	83*
Verano	83*	78*	103	77*
Otoño	102	102	105	91*
Invierno	101	101	105	98
Total	95	92	102	87*

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

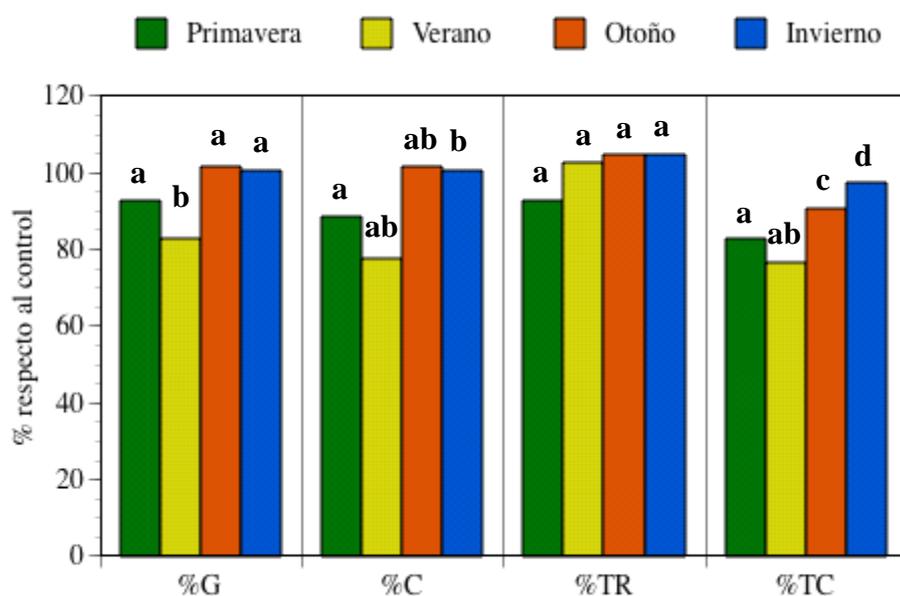


Figura 25: Porcentajes estacionales de germinación (%G), nacimiento de cotiledones (%C), longitud de raíces (%TR) y longitud de cotiledones (%TC) de semillas y plántulas de *R. crispus*. Ensayos realizados sobre suelos control y regados con solución acuosa de hojarasca. Los resultados muestran la media de 12 localidades distribuidas de N-S peninsular y son expresados como porcentaje relativo al control. (a b c d: letras iguales, no diferencia significativa; $p > 0,05$, test de Mann-Whitney).

V.- Discusión

Muchos compuestos del metabolismo secundario de las plantas pueden actuar como aleloquímicos; es el caso de ácidos fenólicos, terpenoides, alcaloides, esteroides, poliacetilenos, etc (Rice, 1984; Waller, 1987; Inderjit y Dakshini, 1995). Estos compuestos los podemos encontrar en varios órganos de la planta, como hojas, tallos y raíces, sin embargo, su mera presencia no establece alelopatía (Putnam y Tang, 1986; Heisey, 1990). Entre otras cosas, para que exista alelopatía, estos compuestos generalmente deben llegar al suelo, lugar donde pueden ejercer su acción. Hasta que esto sucede, los compuestos pueden sufrir una serie de alteraciones, ya sean derivadas de los factores bióticos (microorganismos) que transformen o degraden los compuestos, como abióticos (temperatura, luz, características edáficas, etc.). En este sentido, las experiencias realizadas en este trabajo intentan abordar el segundo aspecto.

En *Cistus ladanifer*, trabajos anteriores han demostrado el potencial alelopático que presenta el exudado secretado por sus hojas y han identificado alguno de los compuestos que lo conforman, entre ellos los flavonoides. De los ocho flavonoides aislados en el exudado, sólo la apigenina 4' (O) metil, kaempferol 3 (O) metil y kaempferol 3,7 di(O) metil presentan actividad alelopática, relacionada principalmente con la disminución en el tamaño de la raíz y los cotiledones (Chaves y col., 1998, 2001a). Posteriormente 11 compuesto, con una menor proporción en el exudado, fueron aislados e identificados (Chaves y col., 2001b). En bioensayos realizados con semillas de *Rumex crispus* se puso en evidencia que el metilpropionato y el ácido butírico inhiben fuertemente la germinación incluso a concentraciones muy bajas; los otros 9 afectan principalmente al desarrollo de la plántula (Chaves y col., 2001b).

Por otro lado, se ha demostrado, que las condiciones climáticas a las que puede estar sometida una especie, alteran la capacidad fitotóxica de los compuestos implicados en la alelopatía, influyendo en su síntesis y pudiendo afectar también a su actividad (Chaves y Escudero, 1999). Son pocos los estudios sobre el tema, aunque algunos trabajos muestran el aumento en la fitotoxicidad de ciertos ácidos fenólicos al someterlos a ambientes con temperaturas e intensidades lumínicas altas (Glass, 1976; Hauson y col., 1983; Bhowmik y

Doll, 1983; Einhellig y Eckrich, 1984). El objetivo principal de este trabajo es contribuir al estudio del fenómeno alelopático, centrándonos principalmente en la influencia que ejercen sobre éste las distintas condiciones climáticas en las que se produce la interacción.

En condiciones naturales, la temperatura, el fotoperiodo y la pluviosidad siguen un comportamiento marcadamente estacional. Por tanto, la actividad de los aleloquímicos presentes en el exudado de *C. ladanifer* puede verse modificada a lo largo del año. Para comprobar esta hipótesis, en primer lugar se hicieron ensayos bajo condiciones controladas, experimentando con diferentes temperaturas e intensidades lumínicas para aproximarnos así a las condiciones naturales.

Cuando se realizan los ensayos de fitotoxicidad, alternando condiciones de fotoperiodo corto y largo con temperaturas altas y constantes, se pone en evidencia la variabilidad de la toxicidad de los compuestos ensayados al variar las condiciones ambientales del ensayo. Hay que tener en cuenta, que las temperaturas altas, por sí solas, reducen de forma significativa el tamaño de las raíces y de los cotiledones. Por tanto, para cuantificar la actividad de cada compuesto bajo los distintos tratamientos, los resultados se expresan como porcentajes referidos al control.

La germinación es débilmente afectada por la mayoría de los compuestos a excepción del ácido butírico y el metilpropionato, los cuales presentan un fuerte efecto de inhibición. Las condiciones climáticas afectan a la actividad de los distintos compuestos de manera diferente, intuyéndose un comportamiento muy heterogéneo en la actividad de estos compuestos ante la influencia de las condiciones climáticas sobre la germinación de semillas de *R. crispus*. En general, cuando las experiencias se realizan bajo tratamientos con fotoperiodo corto, existe un mayor número de compuestos que inhiben la germinación, como son el ácido ferúlico, ácido hidrocínámico, ácido oxálico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, ácido 3-hidroxi-butírico y azuleno.

Por su parte, la actividad de estos compuestos sobre el nacimiento de cotiledones tampoco sigue un patrón común de comportamiento. A pesar de ello existen una serie de

compuestos que presentan una inhibición significativamente mayor bajo temperaturas altas con fotoperiodo largo (TA-FL) que bajo el resto de condiciones, como son el ácido hidrocínámico, ácido metilmalónico, ácido p-anísico, ácido 3-hidroxibutírico, azuleno e incluso el ácido butírico.

Todos los compuestos, en la mayoría de los tratamientos, muestran un gran efecto de inhibición sobre la longitud de las raíces, aunque a temperatura constante con fotoperiodo corto (TC-FC) existen compuestos que no inhiben este parámetro. En concreto, el ácido cinámico es activo a concentración 10^{-3} M en todos los tratamientos, mientras que a 10^{-5} M lo es únicamente bajo temperatura constante con fotoperiodo largo (TC-FL). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Einhellig (2002), el cual observa que el ácido cinámico inhibe el tamaño de las raíces de ciertas especies entre las concentraciones 10^{-3} y 10^{-4} M. Por tanto, podríamos concluir que la combinación de estas dos variables, temperatura constante y fotoperiodo largo, potencian la actividad de este compuesto, ya que bajo estas condiciones, a concentración 10^{-5} M también se reduce significativamente el tamaño de las raíces.

Por otra parte, los ensayos realizados por Einhellig y Eckrich (1984) ponen de manifiesto que el ácido ferúlico es más activo en la inhibición de las raíces de soja cuando ésta era expuesta a temperaturas altas. Estos resultados coinciden con nuestras experiencias, pues el ácido ferúlico, a la concentración $0,5 \cdot 10^{-3}$ M, inhibe la longitud de la raíz solamente cuando está sometido a temperaturas altas, independientemente de la duración del fotoperiodo.

Sobre la acción de los compuestos en la longitud de los cotiledones, se observa una gran influencia de las condiciones climáticas, de tal manera que a temperatura constante con fotoperiodo largo (TC-FL), la mayoría de los compuestos presentan inhibición y a temperatura alta con fotoperiodo corto (TA-FC) desaparece. Esto nos sugiere la posibilidad que el fotoperiodo largo active la capacidad inhibidora de la mayoría de los compuestos.

El efecto de todos estos compuestos realmente es determinado cuando actúan en conjunto, siendo más efectivos que cuando actúan por separado. Li y col. (1993) habían descrito este comportamiento sinérgico en ciertos ácidos fenólicos como ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido cinámico. Esta sinergia implicaría que no son necesarias altas concentraciones de estos compuestos para que sean activos, ya que un compuesto en sí podría potenciar la acción de otro. Muchos de ellos han sido identificados en el suelo a bajas concentraciones (Blum y col., 1989a; Lyu y col., 1990; Lehman y col., 1994; Inderjit y Dakshini, 1991, 1992) pudiendo compensar, este sinergismo, la baja concentración presente en el medio.

La acción inhibitoria conjunta no significa que los compuestos tengan el mismo modo de acción, siendo sus mecanismos de interferencia con los procesos fisiológicos probablemente diferentes (Einhellig, 1995). De la misma manera, la respuesta de las mezclas de estos compuestos a la temperatura y fotoperiodo no tiene por qué ser la misma que cuando actúan por separado.

Cuando se ensaya con distintas mezclas de los compuestos anteriormente utilizados, se aprecia un notable incremento del efecto fitotóxico de los mismos, siendo en la mayoría de las mezclas significativamente mayor bajo los tratamientos con fotoperiodo largo. El efecto negativo, sobre la longitud de las raíces con estas condiciones, es claramente mayor que con el resto de parámetros. Al reducir la concentraciones de los compuestos a la mitad, se sigue manteniendo la inhibición significativa de todas las mezclas. Estos mismos resultados son obtenidos cuando se ensaya con extractos acuosos derivados de distintas especies (Steinsiek y col., 1982; Bhowmik y Doll, 1983), demostrándose que el efecto alelopático puede ser alterado con un fotoperiodo mayor y potenciándose aún más con temperaturas altas.

Se está ampliando el conocimiento sobre la función y el modo de acción de los aleloquímicos. Autores como Pandey (1996) o Jäderlund y col., (1996) defienden que la presencia de estos compuestos hace que la planta consuma menos agua, provocando una disfunción en las raíces. La acción de los compuestos fenólicos podría estar implicada en la

bajada de la integridad de la membrana, alteración de las vías enzimáticas, limitación en la captación de nitrógeno e incluso disminución en la producción de clorofila (Gallardo y col., 1998).

Una vez comprobada que la actividad de los compuestos de naturaleza fenólica puede ser dependiente de los parámetros temperatura y luz, se procedió a la identificación de otros compuestos que constituyen un alto porcentaje del exudado, los cuales podrían tener actividad alelopática. Con la utilización de diferentes técnicas cromatográficas y mediante RMN se identificaron cuatro compuestos de naturaleza terpénica. Estos compuestos son los siguientes diterpenos: **D1**. Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; **D2**. Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; **D3**. Ácido oxocatívico; **D4**. Ácido labdanólico.

Dentro del amplio grupo de compuestos naturales conocidos como terpenos, existen referencias sobre estudios que atribuyen a monoterpenos y sesquiterpenos actividad fitotóxica. (Fischer, 1991; Cutler, 1992; Vaughn y Spencer, 1993).

Por su parte, los diterpenos ejercen una amplia variedad de funciones tanto estructurales, hormonales, como de defensa. En este sentido, encontramos diterpenos con actividad fungicida, insecticida (Croteau y Jonson, 1985; Seigler, 1998) y nematocida (Chitwood, 1992). Pero, hasta la fecha, son escasos los estudios alelopáticos que se centran en el efecto de los diterpenos sobre el desarrollo de las plantas.

Los bioensayos realizados para comprobar la fitotoxicidad de los diterpenos identificados en *C. ladanifer* ponen de manifiesto que, todas las moléculas ensayadas presentan actividad fitotóxica, reduciendo en más de un 80% la capacidad de elongación de los coleoptilos a concentración 10^{-3} M. Al reducir la concentración, la actividad de todos los diterpenos disminuye. Con todo ello, el compuesto D3 provoca una inhibición cercana al 50% al ensayar a 10^{-4} M.

En general, los ensayos realizados sobre la elongación de coleoptilos revelan una fuerte actividad de los compuestos a concentraciones altas y una reducción progresiva de la

actividad al disminuir la concentración de las mismas. Por tanto, la actividad potencial de los cuatro diterpenos es evidente, confirmándose su posible implicación como aleloquímicos en condiciones naturales.

La actividad de los cuatro diterpenos también fue estudiada a otro nivel, cuantificando el efecto de los mismos sobre parámetros de germinación y desarrollo de plántulas. En estos bioensayos, el posible efecto sobre estos parámetros nos da una visión más cercana y real de la actividad de estas moléculas como posibles agente alelopáticos en el medio natural y su posible utilización como herbicida natural (Macías y col., 1999; Inderjit y Nilsen, 2003).

En nuestro caso, se encontró una gran dificultad a la hora de purificar los diterpenos de *C. ladanifer*, debido a la naturaleza resinosa del exudado. De tal manera que la cantidad disponible de compuestos puros limitó la realización de los bioensayos de actividad fitotóxica (STS) previamente programados con mayor número de especies diana y mayor número de concentraciones. Es por ello que, en estos ensayos, sólo se probó la actividad fitotóxica de los compuestos D1, D3 y D4.

Respecto al efecto de los tres diterpenos sobre la germinación de las especies diana, cabe destacar que el comportamiento es similar al del herbicida comercial en todas las especies ensayadas excepto sobre el berro, cuya germinación es inhibida por el D3 y D4 a todas las concentraciones excepto a 10^{-5} M, efecto este que no se consigue con el Logram.

El efecto de los diterpenos a 10^{-3} M sobre en el tamaño de las raíces de todas las especies, es incluso mayor que el que produce el herbicida testigo a esta concentración. Al reducir la concentración a 10^{-4} M, el efecto del diterpeno desaparece mientras que el del herbicida comercial se mantiene en la mayoría de las especies, poniendo de manifiesto la mayor eficacia del herbicida sobre este parámetro. Curiosamente, los compuestos D1 y D3 también ejercen inhibición sobre el tamaño de las raíces del berro, aunque en este caso, el efecto se produce al ensayar con la concentración más baja, 10^{-6} M.

El efecto sobre la longitud de los cotiledones presenta un comportamiento muy similar al que se produce sobre las raíces; fuerte inhibición del D4 a 10^{-3} M y comportamiento heterogéneo para el resto de compuestos y semillas.

En general, los ensayos STS de fitotoxicidad nos revelan principalmente que los parámetros indicadores del desarrollo de las plántulas, longitud de raíz y cotiledones, son muy sensibles a la actividad de los diterpenos utilizados en los ensayos. Destacar el fuerte efecto de D4 a la concentración 10^{-3} M. La pérdida de actividad al reducir la concentración a 10^{-4} M y siguientes, nos sugiere que este compuesto no parece un buen candidato a ejercer esta fitotoxicidad en el medio natural, donde las concentraciones son mucho más bajas. Por el contrario, el D1 y D3, aparentemente con menos actividad, ejercen su inhibición sobre ciertas especies a bajas concentraciones, pudiendo actuar como aleloquímicos en un sistema natural.

Por otra parte, la síntesis de los fenoles encontrados en *C. ladanifer* se induce por el estrés hídrico y la intensidad lumínica (Chaves y col., 1997). En esta síntesis, cuando la planta está sometida a altas temperatura, se ven favorecidos determinados compuestos como son los flavonoides. En concreto, la velocidad de síntesis de los flavonoides con actividad alelopática como es el kaempferol 3,7 di(O) metil, es estimulada con las altas temperaturas (Chaves y col., 1997; Sosa y col., 2005). Estos parámetros climáticos coinciden en condiciones naturales con las estaciones de primavera y verano, y es cuando la planta secreta flavonoides en mayor cantidad (Chaves y col., 1997). Por el contrario, los resultados obtenidos en esta memoria revelan un comportamiento muy diferente para la síntesis de los diterpenos estudiados.

La cantidad media, de estos compuestos, en el exudado de la hoja de *C. ladanifer* es claramente mayor en la estación de invierno, encontrándose claras diferencias significativas con el resto de estaciones. Por el contrario, en las muestras de hojarasca, la mayor cantidad de los diterpenos cuantificados la encontramos durante la estación de verano. Estos datos, que a priori parecen contradictorios, pueden explicarse teniendo en cuenta que las hojas que

en la estación de invierno están en la planta son las mismas que con las altas temperaturas del verano caen al suelo formando la cubierta de hojarasca u hoja seca sobre el suelo.

En el suelo, a pesar de que las cantidades encontradas de los tres diterpenos son mínimas, al igual que ocurriera en la hojarasca, es durante el verano cuando mayor presencia de estos compuestos existe. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la incorporación de estos compuestos al suelo provenga de la deposición de hojarasca sobre el mismo, más que directamente de las hojas frescas por lixiviado de lluvia. Una vez desprendida la hoja en verano, la descomposición de la misma incorporaría estos compuestos al sustrato. La vía de incorporación de los diterpenos en el suelo, en este estudio, no está comprobada, pero teniendo en cuenta la baja solubilidad en agua de los mismos, parece razonable pensar que la incorporación sea vía degradación de hojarasca. Hay estudios que han demostrado la incorporación al suelo de aleloquímicos, sobre todo fenoles, mediante el lavado por lluvias (Nilsson y col., 1998), pero sin embargo hay otros autores (Coley, 1988), que sugieren que la inversión en metabolismo secundario por especies en ambientes pobres en nutrientes, típicamente con crecimiento lento y hojas de larga vida, ocurre una sola vez y la velocidad de renovación es lenta. Esto implicaría que la incorporación al suelo sería al descomponerse la hojarasca.

Es importante tener en cuenta el papel que está jugando la hojarasca como principal vía de incorporación de estos compuestos al medio. Los compuestos en la hojarasca pueden retardar la descomposición de la misma, contribuir a la acumulación de materia orgánica, así como alterar el ciclo del nitrógeno y suprimir la actividad saprofítica del suelo (Northup y col., 1995; Wardle y Lavelle, 1997). La hojarasca tiene un importante efecto "después de la vida", con lo cual es necesario considerarla para desarrollar una comprensión completa de cómo la biodiversidad afecta a los ecosistemas.

Destacar que la concentración de algunos de los compuestos presentes en el exudado de *C. ladanifer*, tales como los flavonoides, coincide con su mayor o menor presencia en el suelo (Sosa, 2005; Chaves y col., 2003), pero con los diterpenos no es así. Diferentes compuestos del exudado pueden diferir en su mecanismo de incorporación,

degradación e interacción en el suelo, como ha sido demostrado en otros estudios (Tatsumi y col., 1994; Alexander, 1994; Dao, 1987, Huang y col., 1999).

La cuantificación de los tres diterpenos en las doce poblaciones estudiadas a lo largo de la Península Ibérica reafirma este comportamiento. Nuevamente es durante la estación de invierno donde se produce un aumento en la secreción de los tres diterpenos en hoja, y es en verano cuando la cantidad de compuestos en la hojarasca es mayor. Estos resultados vendrían a reafirmar la idea de que la mayor incorporación de los posibles compuestos alelopáticos producidos por las hojas de *C. ladanifer* al medio de acción se produciría vía deposición a través de la hojarasca.

La variación cuantitativa de los diterpenos en el exudado de las jaras a lo largo del año, como se ha comprobado, sigue un marcado comportamiento estacional. Por tanto, la síntesis de estos compuestos podría estar inducida por factores climáticos estacionales como la temperatura y el estrés hídrico. Para comprobar esta hipótesis se realizaron ensayos en el laboratorio bajo condiciones controladas, donde jaras recogidas en el medio natural fueron sometidas a distintos tratamientos. Se combinaron altas y bajas temperaturas con estrés y sin estrés hídrico y los resultados revelaron que la síntesis de diterpenos en *C. ladanifer* se estimula a bajas temperaturas.

Como se observa en los resultados, el estrés hídrico no parece un factor determinante a la hora de modificar la síntesis de los diterpenos cuando el ensayo se realiza a baja temperatura. No así cuando se ensaya con altas temperaturas, donde las plantas sometidas a estrés hídrico disminuyen la cantidad de estos compuestos en las hojas. Por tanto, el estrés hídrico solamente determina la síntesis de los diterpenos, disminuyéndola, cuando la planta está sometida a altas temperaturas.

Es la temperatura la que parece jugar un papel fundamental a la hora de estimular la síntesis de los diterpenos, de tal manera que, al someter a las plantas a bajas temperaturas, indistintamente de las condiciones de humedad en las que se desarrollen, éstas presentan mayor cantidad significativa de compuestos que al inicio de la experiencia.

Los resultados obtenidos en laboratorio, bajo condiciones controladas, corroboran los obtenidos en condiciones naturales, confirmando el aumento de la síntesis de diterpenos en invierno, estación donde se alcanzan las temperaturas más bajas. Estos resultados, al igual que los obtenidos para la síntesis de los compuestos fenólicos en *C. ladanifer* (Chaves y col., 1997) reafirman la idea de la importancia de los factores climáticos en la síntesis de aleloquímicos. Estudios realizados por otros autores apoyan esta hipótesis, donde se ha demostrado que factores externos, tales como el clima (Mole y Joern, 1993), luz (Bryant y col., 1987), disponibilidad de agua (Gershenzon, 1984) sin olvidar la fertilidad del suelo (Northup y col., 1995) están implicados en la síntesis de los metabolitos secundarios.

En la mayoría de los ecosistemas existen grandes diferencias en las variables climáticas a lo largo del año. Esto puede ser importante al afectar a la variabilidad temporal de producción de metabolitos secundarios. Dicha variación temporal en compuestos afectaría a las interacciones bióticas en las que las plantas están involucradas. Esto significa que si una especie tolera un amplio margen en los valores de temperatura y precipitación, como es *C. ladanifer* que ocupa lugares en los que se dan 108 días de heladas y otros sin ninguno al año (Cabezas y Escudero, 1989); podría pensarse que su comportamiento alelopático puede variar dependiendo de las características climáticas del hábitat.

Para comprobar esta hipótesis y aproximarnos a las condiciones propias del fenómeno en campo, por un lado se cuantificó la actividad alelopática de suelos de jarales seleccionados en función de sus características climáticas, y posteriormente, se realizaron ensayos de germinación con distintas soluciones acuosas de la planta, procedentes de hojas y hojarasca. Se utilizó como diana una especie presente en el medio natural del ecosistema propio de la jara como es *R. crispus*.

Como se ha mostrado en los resultados de esta memoria, las experiencias se realizaron seleccionando previamente ocho poblaciones y posteriormente se volvieron a repetir las experiencias en doce nuevas poblaciones con características climáticas más extremas.

Entendiendo como distintas condiciones climáticas, las que se producen en las diferentes estaciones y las que soportan las distintas poblaciones seleccionadas, los suelos de jaral de las distintas poblaciones que se han seleccionado para este estudio, podrían presentar valores de inhibición diferentes en función de la composición de compuestos presentes en los mismos, y éstos a su vez en función de las condiciones climáticas a los que están sometidos.

En primer lugar, cuando se estudia el efecto inhibitor sobre los suelos de jaras, los resultados nos muestran un comportamiento muy heterogéneo, dependiendo de la estación y del parámetro medido. Así, en los suelos de las ocho poblaciones situadas en la provincia de Badajoz, localidades como Cornalvo y Valle de Santa Ana no presentan inhibición de ningún parámetro en ninguna estación. En otras como Hornachos e Higuera, la inhibición es significativa en todas las estaciones y parámetros medidos. Para el resto de localidades, la inhibición es mucho más variable, encontrando inhibición de algunos parámetros en ciertas estaciones y perdiéndose en otras.

Esta variabilidad en los resultados se hace más patente al analizar los datos obtenidos con las muestras recogidas en las doce localidades, pero en este caso el parámetro que mide el desarrollo de la planta y más concretamente la longitud de las raíces es el que presenta una inhibición significativa mayor.

A pesar de esta heterogeneidad, si analizamos en un conjunto los resultados, en ambas experiencias encontramos que existen diferencias significativas entre los valores de inhibición de las localidades. Además, en ambos casos, son los suelos recogidos en la estación de invierno los que menor efecto inhibitor presentan sobre los parámetros afectados, y los recogidos en las estaciones de primavera y verano los que más, inhibiéndose sobre todo el tamaño de la plántula.

Es de destacar que en estudios previos se ha puesto igualmente de manifiesto un comportamiento heterogéneo en la capacidad inhibitor de los suelos procedentes de jarales dentro de una misma población. Además, coincide que, es en la estación de primavera en la que mayor inhibición se produce (Sosa, 2003; Chaves y col., 2003).

La inhibición que muestran los suelos asociados a *C. ladanifer* puede ser debido a dos causas: competencia por nutrientes, al ser suelos muy deficitarios en nutrientes, o a la presencia de compuestos con actividad alelopática en los suelos.

Al estudiar las características edafológicas de los suelos de jarales (Alías, 2002) y compararlas con los suelos controles, se observa que no hay diferencias específicas entre los suelos que expliquen la inhibición en la germinación. La evolución a lo largo del año de las diferentes características edafológicas también es prácticamente la misma. Existen diferencias en el contenido de potasio que disminuye de forma más considerable en los suelos controles durante los meses de mayor precipitación. Este elemento es requerido por la vegetación en los primeros estadios de crecimiento. Teniendo en cuenta que en estos meses se produce la germinación de la mayoría de las especies herbáceas, esta disminución puede ser debida al mayor porcentaje de germinación en suelos controles que en jarales. Por otro lado, el pH disminuye en los suelos de jarales, pero esta disminución no es significativa como para poder deducir que el pH sea el factor responsable de la inhibición (Alías, 2002).

Entonces, la actividad alelopática estacional de estos suelos debería, en principio, corresponderse con una determinada composición estacional de compuestos fitotóxicos presentes en los mismos. En este caso, los mayores porcentajes de inhibición encontrados en la estación de primavera no corresponden con una mayor cantidad de diterpenos en el suelo, ya que la mayor cantidad de estos compuestos en este medio la encontramos en la estación de verano. Si tenemos en cuenta, el otro grupo de compuestos mayoritarios con actividad fitotóxica, los fenoles, la máxima concentración en los suelos también aparecen en verano (Sosa, 2003; Chaves y col., 2003) no existiendo una relación simple entre los niveles de germinación observados y el contenido de compuestos fitotóxicos.

Con los resultados obtenidos, tanto con los diterpenos como con los fenoles, no existe ningún compuesto al que se le pueda atribuir la acción de ser el responsable de la inhibición. No hay que olvidar que la actividad de compuestos puede verse alterada por la presencia de otros, presentando un comportamiento sinérgico en el cual la combinación de los mismos es importante. Algunos investigadores creen que "importantes inhibidores no

identificados" están actuando, además de los inhibidores identificados, en el efecto alelopático de una planta. Este comportamiento puede resultar de la acción de varios compuestos que actúan en combinación (Inderjit y Dakshini, 1995).

Además, numerosos estudios han demostrado que las características físicas, químicas y biológicas de los suelos influyen en la disponibilidad cualitativa y cuantitativa de los compuestos alelopáticos aumentando o disminuyendo su actividad (Dalton y col., 1989; Dao, 1987; Alexander, 1994; Tatsumi y col., 1994; Blum y Shafer, 1998; Huang y col., 1999; Schmidt y Ley, 1999). Un posible mecanismo de interferencia es el de adsorción. Fue demostrado por Dalton y sus colaboradores (1989), los cuales, tras incorporar exógenamente, a diferentes tipos de suelo, ciertos compuestos fenólicos entre ellos ácido ferúlico y ácido hidroxibenzoico, encontró adsorción de todos los compuestos y en todos los suelos, aunque la recuperación de los mismos variaba dependiendo del tipo de suelo, horizonte del mismo y tipo de grupo funcional presente en el anillo aromático del compuesto fenólico. Éste, junto con otros mecanismos, puede explicar la gran heterogeneidad presente en los valores obtenidos tanto en los ensayos de germinación como en la extracción de los compuestos presentes en el suelo.

En los ensayos realizados con las soluciones de hoja y hojarasca procedentes de las diferentes localidades, se aprecia la misma variabilidad en los resultados que los obtenidos en los ensayos sobre suelos, encontrando claras diferencias en los valores de los distintos parámetros entre las distintas localidades, sin apreciarse un patrón común de comportamiento. Por el contrario, el análisis estacional de estos resultados nos revela un comportamiento general de la actividad fitotóxica de las distintas soluciones. Así, son nuevamente las muestras recogidas en primavera las que presentan una mayor capacidad fitotóxica en todos los parámetros y fundamentalmente sobre la biomasa.

Al repetir por segunda vez las experiencias, ampliando a doce poblaciones los puntos de recogida de muestras y durante las cuatro estaciones, aparece mayor inhibición significativa con las soluciones recogidas en la estación de verano.

Destacar que las soluciones acuosas utilizadas en estos ensayos presentan un mayor efecto sobre los parámetros de desarrollo que sobre la germinación, sufriendo inhibición prácticamente en todas las estaciones. A pesar de ello, en los análisis comparativos se observan diferencias significativas entre estaciones, existiendo una mayor inhibición en las estaciones de verano y primavera que en el resto.

Por otro lado, se puede apreciar como al cambiar el sustrato de los ensayos, el comportamiento fitotóxico de las soluciones varía. Al realizar los ensayos sobre suelo control, el efecto sobre la germinación que se producía al regar con soluciones de hoja recogidas en verano desaparece, aunque se mantiene en los ensayos con hojarasca. Lo más significativo es la pérdida del efecto inhibitorio de estas soluciones sobre el tamaño de las raíces. Este parámetro era fuertemente inhibido en los ensayos sobre papel. Sobre suelo control este efecto desaparece, manteniéndose la inhibición sobre el tamaño de los cotiledones. Trabajos realizados por otros autores (Inderjit y Mallik, 1997; Inderjit y Weiner, 2001) resaltan la importancia del sustrato y la ecología química del suelo dentro de las interferencias planta-planta como elemento fundamental a la hora de explicar la estructura de las comunidades. Por tanto, las distintas características del suelo podrían alterar el comportamiento de los compuestos alelopáticos y explicar las diferencias encontradas en la inhibición de los distintos parámetros al cambiar de sustrato.

Es necesario hacer notar que cuando se realizó por primera vez las experiencias en las diferentes localidades, las soluciones de hojarasca mostraban mayor capacidad de inhibición que las procedentes de las hojas. Estudios realizados con *Rosmarinus officinalis* en Florida, mostraron que su hojarasca es más efectiva que la hoja en suprimir la germinación (Hunter y Menges, 2002), encontrándose un nuevo compuesto en la hojarasca, ceratiolín. Aunque éste es poco activo, se degrada rápidamente a ácido hidrocínámico, el cual tiene más actividad alelopática (Fischer, 1991).

Cuando se realizan posteriormente los ensayos con las doce localidades, este comportamiento no se vuelve a producir. Estas experiencias han sido realizadas en años

distintos por lo que las diferencias climáticas interanuales podrían intervenir en alguna medida en este comportamiento. 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. Sin embargo no podían correlacionar estas variables con los datos macroclimáticos disponibles, revelando solo algunas relaciones detectables. El efecto de las variables climáticas en plantas de larga vida son generalmente difícil de detectar, no así el efecto del microclima, como determinante de la producción de compuestos fenólicos. Esta variabilidad en la síntesis de compuestos probablemente sea atribuible a un conjunto de factores, tanto internos como externos. La variación temporal en los niveles de metabolitos secundarios, tanto dentro del año como entre años es importante para regular la variabilidad temporal de la interferencia de *E. hermaphroditum*, la naturaleza de su efecto en otros organismos y su impacto a largo plazo en la funcionalidad de los ecosistemas.

En resumen, destacar el comportamiento alelopático estacional de *C. ladanifer* en la mayoría de las localidades estudiadas, tanto en los ensayos realizados en suelo directamente como con las soluciones acuosas de hojas y hojarasca. Además este comportamiento fitotóxico de *C. ladanifer* es mayor en las estaciones de primavera y verano, siendo las altas temperaturas las que parecen determinar un papel importante en la alelopatía de esta especie. Este comportamiento estacional ha sido también encontrada en especies como : *Pseudotsuga menziesii*, *Picea engelmannii* y *Abies concolor*, *Ailanthus altissima*, *Juglans nigra*, *Hordeum vulgare* y *Pteridium aquilinum* (Heisey, 1990; De Scisciolo y col., 1990; Dolling y col., 1994; Oueslati y col., 2005).

Como se ha podido comprobar en esta memoria y en estudios anteriores, las condiciones climáticas y principalmente el parámetro temperatura podría jugar un papel muy importante en la interacción alelopática de *C. ladanifer*. Tenemos que la temperatura influye de una forma directa en:

- La síntesis de los compuestos pertenecientes al exudado de la planta que han podido ser aislados, tanto compuestos de naturaleza fenólica como terpénica. Son las altas temperaturas las que estimulan la síntesis de flavonoides y las bajas la síntesis de diterpenos.

- Influye en la capacidad fitotóxica de algunos compuestos y más concretamente de los fenoles estudiados. Respecto a los diterpenos, debido a la dificultad de conseguirlos puros, la influencia de la temperatura y el fotoperiodo en su actividad no ha podido ser cuantificada.

- La mayor actividad alelopática en los ensayos de todas las localidades, tanto en suelo como con las soluciones de hoja y hojarasca es en primavera y verano. Parece que las altas temperaturas que se producen en estas estaciones potenciarían la capacidad fitotóxica de la planta en el medio natural

Todo ello nos lleva a analizar las relaciones existentes entre los tres elementos conceptuales más importantes en este trabajo: compuestos del exudado, actividad del exudado y sus compuestos, y parámetros climáticos.

Estos resultados pueden constatarse si realizamos las correlaciones entre los parámetros climáticos de las diferentes localidades a lo largo del año con los valores de inhibición y la cantidad de diterpenos en hojas y hojarasca. Es necesario decir, que se ha ensayado con los parámetros climáticos temperatura, precipitación y diferentes índices climáticos, y solamente se obtiene una correlación significativa con R^2 mayor de 0,7 con los valores de temperatura. En las Figuras 1-9 se puede observar una alta correlación entre la temperatura y los valores de inhibición de algunas de las soluciones de jara utilizadas. De tal manera que a mayor temperatura, menor es el porcentaje del parámetro medido y por tanto mayor la inhibición del mismo. Concretamente, la correlación existente entre los parámetros de temperatura y los porcentajes de germinación, nacimiento de cotiledones y tamaño de los mismos cuando se riega con solución acuosa de hojarasca, presenta en todos los casos una R^2 mayor de 0,7.

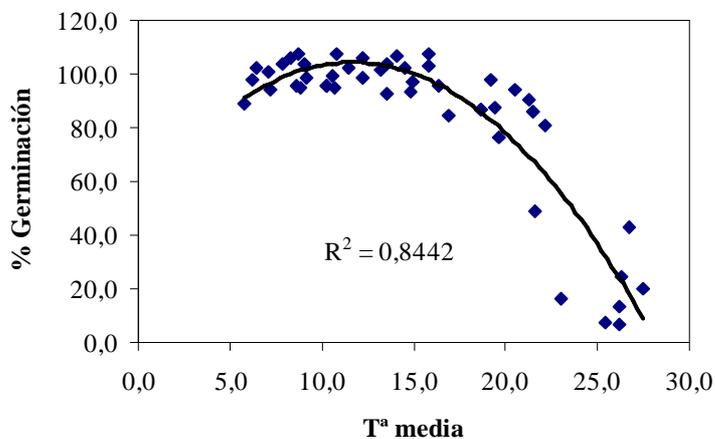


Figura 1: Gráfica de correlación entre la temperatura media y el porcentaje de germinación obtenido en los ensayos, al regar con soluciones acuosas de hojarasca procedente de doce poblaciones de *C. ladanifer*.

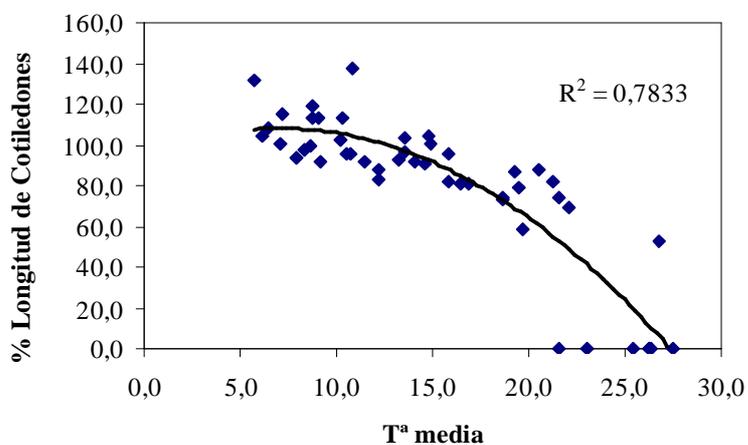


Figura 2: Gráfica de correlación entre la temperatura media y el porcentaje de longitud de cotiledones obtenido en los ensayos, al regar con soluciones acuosas de hojarasca procedente de doce poblaciones de *C. ladanifer*.

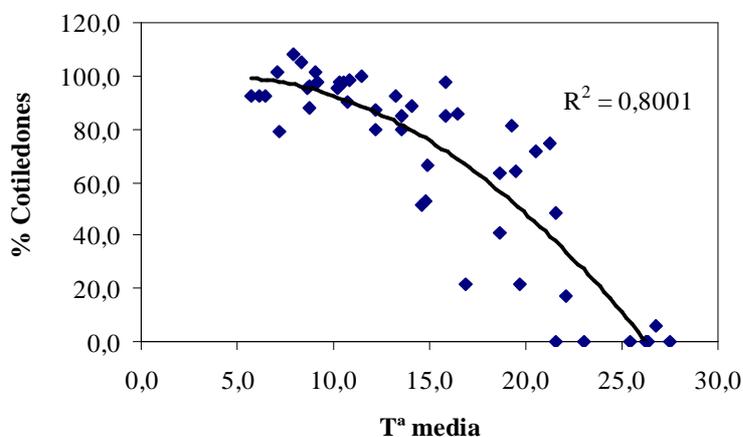


Figura 3: Gráfica de correlación entre la temperatura media y el porcentaje de cotiledones obtenido en los ensayos, al regar con soluciones acuosas de hojarasca procedente de doce poblaciones de *C. ladanifer*.

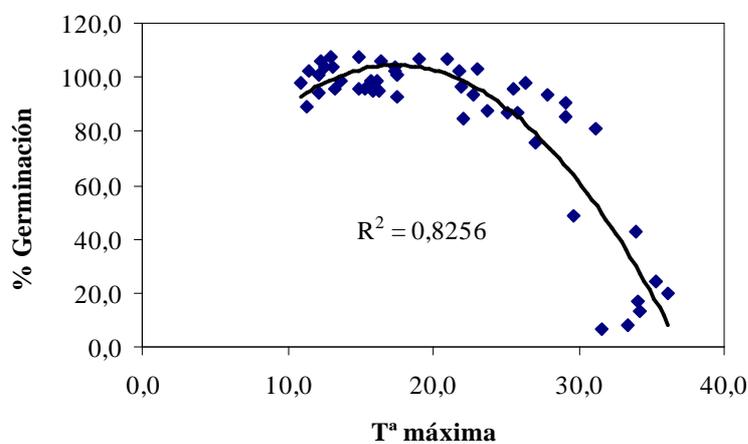


Figura 4: Gráfica de correlación entre la temperatura máxima y el porcentaje de germinación obtenido en los ensayos, al regar con soluciones acuosas de hojarasca procedente de doce poblaciones de *C. ladanifer*.

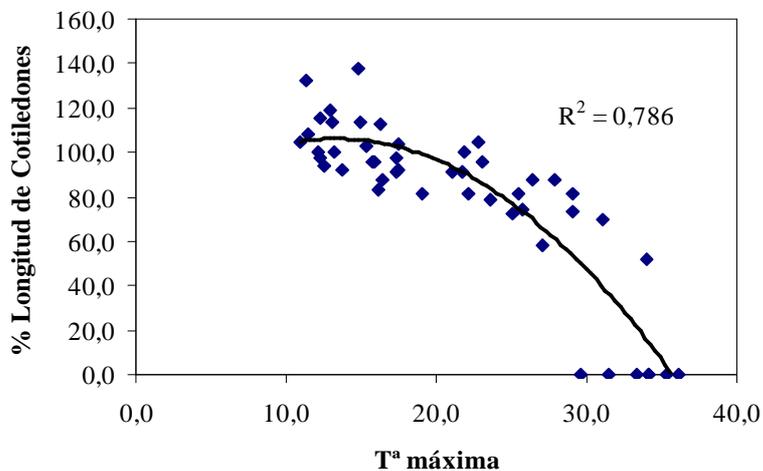


Figura 5: Gráfica de correlación entre la temperatura máxima y el porcentaje de longitud de cotiledones obtenido en los ensayos, al regar con soluciones acuosas de hojarasca procedente de doce poblaciones de *C. ladanifer*.

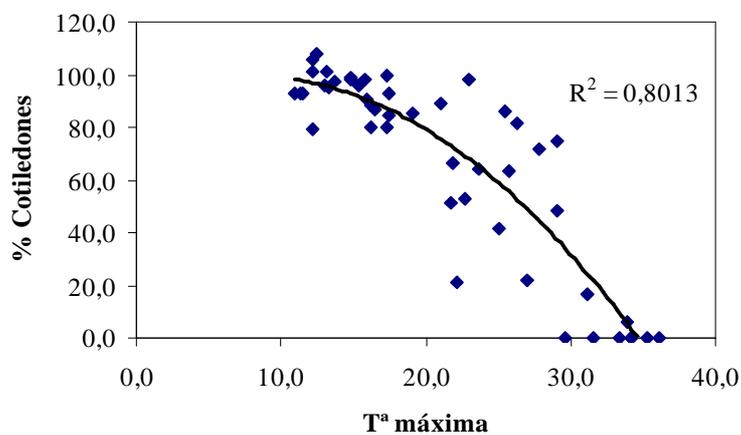


Figura 6: Gráfica de correlación entre la temperatura máxima y el porcentaje de cotiledones obtenido en los ensayos, al regar con soluciones acuosas de hojarasca procedente de doce poblaciones de *C. ladanifer*.

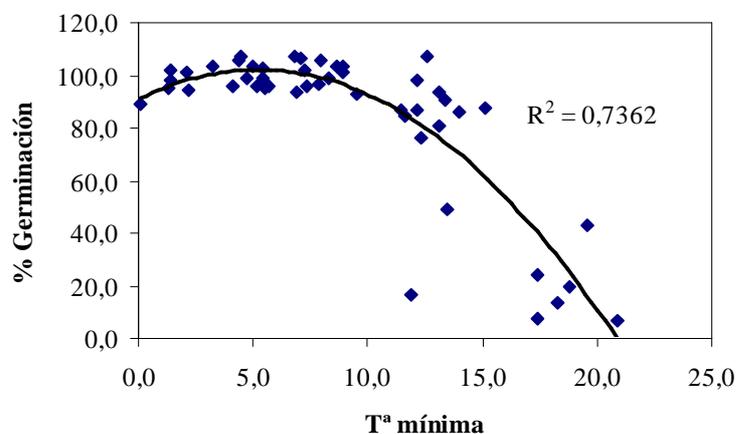


Figura 7: Gráfica de correlación entre la temperatura mínima y el % de germinación obtenido en los ensayos, al regar con soluciones acuosas de hojarasca procedente de doce poblaciones de *C. ladanifer*.

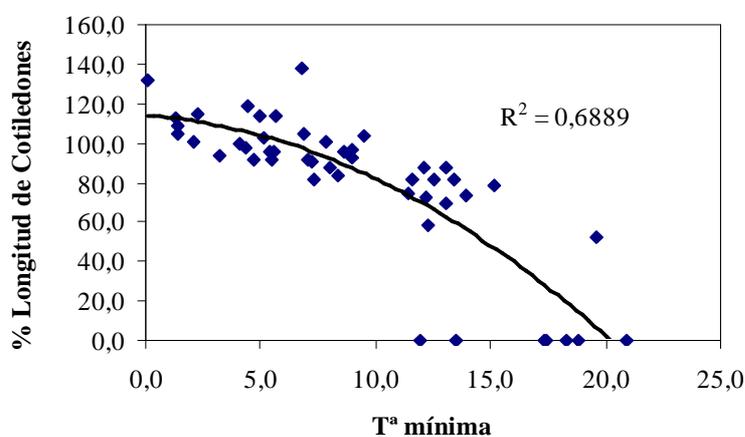


Figura 8: Gráfica de correlación entre la temperatura mínima y el porcentaje de longitud de cotiledones obtenido en los ensayos, al regar con soluciones acuosas de hojarasca procedente de doce poblaciones de *C. ladanifer*.

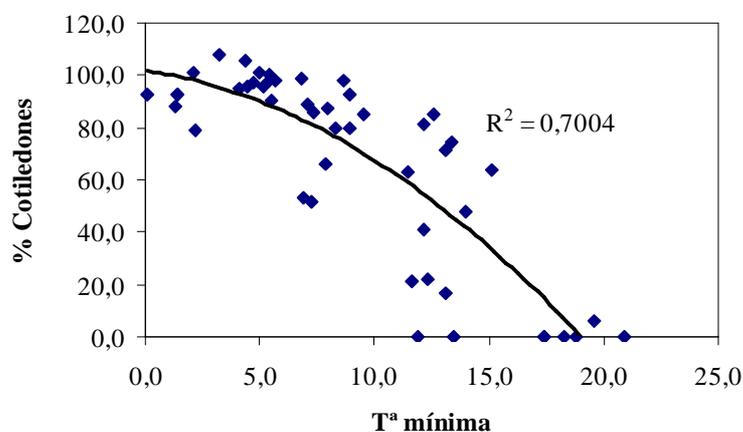


Figura 9: Gráfica de correlación entre la temperatura mínima y el porcentaje de cotiledones obtenido en los ensayos, al regar con soluciones acuosas de hojarasca procedente de doce poblaciones de *C. ladanifer*.

Lo mismo sucede pero a la inversa con la cantidad de algunos diterpenos analizados en las hojas (Figuras 10-12), siendo la cantidad de los diterpenos D2 y D3 la que mejor correlación muestra con la temperatura (mayor cantidad de compuestos a menor temperatura). El hecho que encontremos una correlación entre la temperatura y la cantidad de compuestos presentes en la hoja, pero no en la hojarasca, revela la influencia de la temperatura en la síntesis de estos compuestos. Las bajas temperaturas induciría la síntesis de los diterpenos en las hojas, condicionando la composición de la hojarasca presente en el suelo en los meses de más calor. Por tanto, algo que parece obvio como que la presencia de estos compuestos en la hojarasca depende de su síntesis cuando es hoja, queda justificado en los resultados de correlación obtenidos. O lo que es lo mismo, la temperatura no influye directamente en la cantidad de compuestos presente en la hojarasca sino que influye en la síntesis de los mismos cuando esta es hoja y conforma la parte viva de la planta.

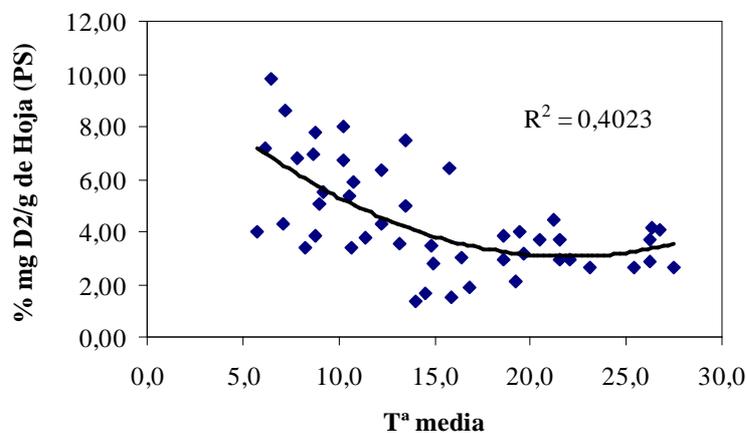


Figura 10: Gráfica de correlación entre la temperatura media y la cantidad de D2 presente en hojas procedentes de doce poblaciones de *C. ladanifer*.

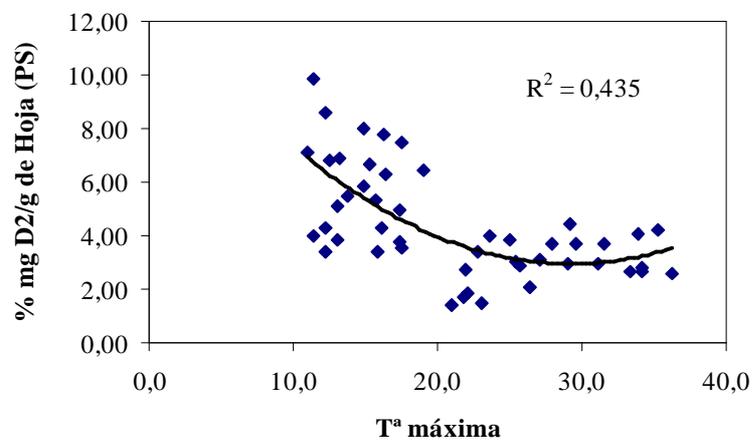


Figura 11: Gráfica de correlación entre la temperatura máxima y la cantidad de D2 presente en hojas procedentes de doce poblaciones de *C. ladanifer*.

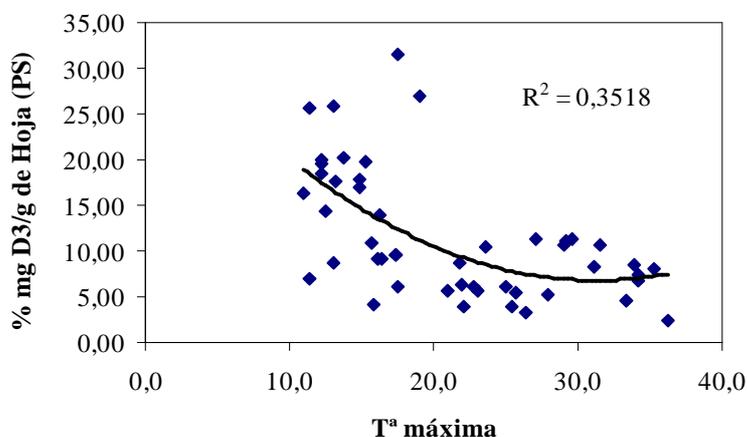


Figura 12: Gráfica de correlación entre la temperatura máxima y la cantidad de D3 presente en hojas procedentes de doce poblaciones de *C. ladanifer*.

Todo esto está relacionado también con el hecho de que las mayores correlaciones con la temperatura se produzcan con los valores de inhibición producidos por la hojarasca. Además se reafirma la idea de que la principal vía de incorporación de los compuestos implicados en la alelopatía de la jara es la hojarasca estando en concordancia con el hecho de que sea en verano cuando mayor es la presencia de los diterpenos en la hojarasca.

El hecho de que todos los ensayos de germinación con soluciones acuosas se realizaran bajo las mismas condiciones en el laboratorio y todos los valores obtenidos fueran referidos a sus controles, anularía la posible influencia de las condiciones climáticas sobre la actividad de las soluciones y los compuestos que la integran. En estos ensayos, por tanto, la acción de las condiciones climáticas viene determinada por la influencia de éstas en la secreción de los compuestos o composición de las muestras recogidas en cada localidad y en cada estación.

Por lo tanto, hay que tener en cuenta que en el medio natural, además de estar implicadas en la síntesis, las condiciones climáticas pueden estarlo también en la actividad de las soluciones, hecho este no cuantificado en nuestro estudio. Por tanto, decir que una determinada composición no parezca corresponder con un determinado efecto es una idea prematura teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, y sabiendo la compleja composición del exudado de *C. ladanifer*.

El hecho de que la síntesis mayoritaria de diterpenos en las hojas se produzca a bajas temperaturas (en la estación de invierno), y que el mayor efecto de las soluciones acuosas se produzca en primavera-verano tanto en hojas como hojarasca, no tiene porqué hacernos descartar la posible implicación de estos compuestos en la interacción alelopática de *C. ladanifer*.

En resumen, si relacionamos estos resultados con la composición de las soluciones en cada estación, no se observa un criterio común para que se de este comportamiento de inhibición. No podemos por tanto asignar un factor concreto al hecho de que se den determinados comportamientos sobre los parámetros medidos y por tanto debemos suponer que las variaciones estacionales en los porcentajes de inhibición, así como las diferencias entre las distintas localidades son debidas a una serie de factores que actuando conjuntamente dan como resultado este comportamiento aparentemente anárquico. Estos factores podrían ser: la composición cuantitativa de las distintas soluciones ensayadas, la composición cualitativa de los mismos y las condiciones climáticas a las que estuvieron sometidas las plantas de *C. ladanifer*.

VI.- Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en este estudio son las siguientes:

1.- Al ensayar con los compuestos identificados en el exudado de *Cistus ladanifer* L. bajo distintos tratamientos, alternando condiciones de fotoperiodo corto y largo con temperaturas altas y constantes, se pone en evidencia la variabilidad en la respuesta de fitotoxicidad de estos compuestos sobre la especie diana al modificar las condiciones de los ensayos. En general, existen un mayor número de compuestos que bajo fotoperiodo corto ejercen una mayor inhibición sobre la germinación. Por su parte, el nacimiento de cotiledones presenta una inhibición significativamente mayor bajo temperaturas altas con fotoperiodo largo. La acción de la mayoría de los compuestos sobre el tamaño de las plántulas es potenciada con el fotoperiodo largo.

Cuando se estudia el efecto de la interacción de estos compuestos bajo diferentes condiciones climáticas, se aprecia un notable incremento del efecto fitotóxico sobre los diferentes parámetros medidos, siendo significativamente mayor bajo los tratamientos con fotoperiodo largo, demostrándose que el efecto alelopático puede ser alterado por el fotoperiodo y potenciándose aún más con temperaturas altas. Este sinergismo implicaría que probablemente no es necesaria una alta concentración de estos compuestos para ser activos, ya que la presencia de ellos conjuntamente y bajo condiciones de temperatura alta con fotoperiodo largo puede potenciar su fitotoxicidad.

2.- Se han identificado cuatro nuevos compuestos de naturaleza terpénica mediante la utilización de diferentes técnicas cromatográficas y RMN. Estos compuestos son los siguientes diterpenos: D1. Ácido 6 β -acetoxi-7-oxo-8-labden-15-oico; D2. Ácido 7-oxo-8-labden-15-oico; D3. Ácido oxocátívico; D4. Ácido labdanólico.

En general, los ensayos realizados sobre la elongación de coleoptilos revelan una fuerte actividad de los compuestos a concentraciones altas y una reducción progresiva de la actividad al disminuir la concentración de los mismos. Por tanto, la actividad potencial de los

cuatro diterpenos es evidente, confirmándose su posible implicación como aleloquímicos en condiciones naturales.

3.- La cuantificación de los diterpenos en las hojas, hojarasca y suelo revela un marcado comportamiento estacional. En las hojas, la mayor cantidad de diterpenos es cuantificada en la estación de invierno, existiendo diferencias significativas con el resto de estaciones. Sin embargo, en hojarasca y suelo, es en verano cuando se detecta la mayor cantidad de estos compuestos. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la incorporación de estos compuestos al suelo provenga de la deposición de hojarasca sobre el mismo.

4.- Los resultados, en cámara de cultivo bajo condiciones controladas, revelan que la síntesis de diterpenos en *C. ladanifer* se estimula a bajas temperaturas. De tal manera que, indistintamente de las condiciones de humedad en las que se desarrollen los ensayos, las plantas expuestas a bajas temperaturas presentan mayor cantidad de diterpenos que al inicio de la experiencia.

Por su parte, el estrés hídrico modifica la síntesis de los diterpenos cuando el ensayo se realiza a altas temperatura, disminuyendo la cantidad de estos compuestos en las hojas.

Los resultados obtenidos en laboratorio, corroboran los obtenidos en condiciones naturales, confirmando el aumento de la síntesis de diterpenos en invierno, estación donde se alcanzan las temperaturas más bajas.

5.- Cuando se realizan los ensayos en suelos de *C. ladanifer*, y con las soluciones procedentes de hojas y hojarasca, con el objeto de aproximarnos a las condiciones naturales, se pone en evidencia la heterogeneidad existente en la respuesta alelopática entre los diferentes puntos de muestreo. No existe una clara relación entre las diferentes características

climáticas de las localidades estudiadas y el comportamiento alelopático que llevan asociado, aunque sí se aprecia en todas las poblaciones comportamiento estacional en la actividad alelopática. En este sentido, las diferencias existentes entre los valores de los parámetros climáticos de cada estación, sí son relevantes para determinar el comportamiento alelopático de *C. ladanifer*. De esta forma, en todos los ensayos realizados, la mayor inhibición significativa se produce sobre el desarrollo de las plántulas y en primavera-verano, estaciones donde se alcanzan las temperaturas más altas.

6.- Existe una alta correlación entre la temperatura y los valores de inhibición de las soluciones de hoja y hojarasca de jara, llegando a superar con las soluciones de hojarasca una R^2 mayor de 0,7. En esta correlación se aprecia que a mayor temperatura mayor es la inhibición en los ensayos realizados, corroborando la importancia de la temperatura en la respuesta alelopática de *C. ladanifer*.

Lo mismo sucede, pero a la inversa, con la cantidad de los diterpenos D2 y D3 analizados en las hojas, encontrando mayor cantidad de compuestos a menor temperatura. Estos datos apoyan los obtenidos en condiciones controladas, donde se puso de manifiesto que son las bajas temperaturas las responsables del aumento en la síntesis de estos compuestos

En síntesis, con los resultados obtenidos hasta ahora junto con los aportados en esta memoria, se puede concluir que uno de los factores determinantes en el comportamiento alelopático de *C. ladanifer* es la temperatura.

VII.- Bibliografía

- ABRAHIM, D., BRAGUINI, W.L., KELMER-BRACHT, A.M., ISHII-IWAMOTO, E.L. (2000) *Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth and mitochondrial respiration in maize*. J. Chem. Ecol. 26: 611-624.
- ACHNINE, L., MATA, R., IGLESIAS-PRIETO, R., LOTINA-HENNSEN, B. (1998) *Impairment of photosystem II donor side by the natural product odoratol*. J. Agric. Food Chem. 46: 5313-5317.
- AGRAWAL, A.A., TUZUN, S., BENT, E. (1999) *Induced plant defences against pathogens and herbivores*. APS Press, St Paul.
- ALEXANDER, M. (1994) *Biodegradation and Bioremediation*. San Diego, USA. Academic Press.
- ALÍAS, J.C. (2002). *Efecto de las variables ecológicas en la actividad de los compuestos alelopáticos de Cistus ladanifer L.* Trabajo de licenciatura. Universidad de Extremadura.
- ALÍAS, J.C., SOSA T., ESCUDERO J.C., CHAVES N. (2006) *Autotoxicity against germination and seedling emergence in Cistus ladanifer L.* Plant and Soil 282: 327-332
- AN, M. (2001) *Phytotoxicity of Vulpia residues: Dynamics of alleochemicals during decomposition of vulpia residues and their corresponding phytotoxicity*. J. Chem. Ecol. 27: 395-409.
- APPEL, H.M. (1993) *Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation*. J. Chem. Ecol. 19: 1521-1552.
- BAAS, W.J. (1989) In H. Lambers; M.L. Cambridge; H. Konings y T.L. Pons (eds) *Causes and Consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants*. pp: 313-340. SPB Academic Publishing, The Hague.

- BAIS, H.P., VEPACHEDU, R., GILROY, S., VIVANCO, J.M. (2003) *Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions*. Science 301: 1377-1380.
- BAKER, G.A. y O'DOWD, D.J. (1982) *Effects of parent plant density on the production of achene type in the annual Hypochaeris glabra*. Journal of Ecology. 70: 201-215.
- BALAKUMAR, T., VICENT, H.B., PALIWAL, K. (1993) *On the interaction of UV-B radiation (280-315 nm) with water stress in crop plants*. Physiol. Plantarum 87:217-222.
- BALLESTER, A., VIEITEZ, A.M. y VIEITEZ, E. (1982) *Allelopathic potential of Erica vagans, Calluna vulgaris, Daboecia cantabrica*. J. Chem. Ecol. 8: 851-857.
- BANKOVA, V., IVANOVA, P., CHRISTOV, R., POPOV, S., DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.T. (1995) *Secondary metabolites of Ceratophyllum demersum*. Hydrobiologia 315: 59-61.
- BARAZANI, O. y FRIEDMAN, J. (2000) *Effect of exogenously applied L-tryptophan on allelochemical activity of plant growth promoting rhizobacteria*. J. Chem. Ecol. 26: 343-350.
- BAZIRAMAKENGA, R., LEROUX, G.D., SIMARD, R.R., NADEAU, P. (1997) *Allelopathic effects of phenolic acids on nucleic acid and protein levels in soybean seedlings*. Can. J. Bot. 75: 445-450.
- BEGON, M., HARPER, J.L., TOWNSEND, C.R. (1990) *Ecology: individual populations and communities*. Blackwell. Boston.
- BELL, E.A. (1980). *The possible significance of secondary compounds in plants*. pp 11-21, in E.A. Bell and B.V. Charlwood (eds.). Secondary plant products. Springer-Verlag, New York.

- BELZ, R. y HURLE, K. (2005) *Differential exudation of two benzoxazinoids: One of determining factors for seeding allelopathy of Triticeae species*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 250-261.
- BEWLEY, J.D. y BLACK, M. (1994) *Seeds: Physiology of development and germination*. Second Edition. Plenum Press. New York.
- BERENBAUM, M.R. (1983) *Coumarins and caterpillars: A case for coevolution*. Evolution, 37: 163-179.
- BHOWMIK, P.C. y DOLL, J.D. (1983) *Growth análisis of corn and soybean response to allelopathic effects of weed residues at various and photosynthetic flux densities*. J. Chem. Ecol. 9: 1263-1280.
- BLACK, C.A. (1973) *Soil-plant relationships*. Scientific Publishers. Jodhpur, India.
- BLUM, U. y SHAFER, S.R. (1998). *Microbial populations and phenolic acids in soil*. Soil Biol. Biochem. 20: 793-800.
- BLUM, U., GERIC, T.M., WEED, S.B. (1989). *Effects of mixture of phenolic acids on leaf area expansion of cucumber seedling grown in different pH Portsmouth AI soil materials*. J. Chem. Ecol. 15(10): 2413-2423.
- BLUM, U. (1996) *Allelopathic interactions involving phenolic acids*. J. Nematol. 28: 259-267
- BOLAÑOS, M.M. y GUINEA, E. (1949) *Jarales y jaras*. Ares, Madrid.
- BRAUN-BLANQUET, MOLINIER, R., WARNER, H. (1941) *Prodome des groupements vegetaux*. Montpellier, Francia.
- BRUNN, S.A., MUDAY, G.K., HARWORTH, P. (1992) *Auxin transport and the interations of phytotropins*. Plant Physiol. 98, 101.

- BRYANT, J.P., CHAPIN, F.S., KLEIN, D.R. (1983) *Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory*. Oikos 40: 357-368.
- BRYANT, J.P., CHAPIN, F.S., 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.
- CALLAWAY, R.M. (1995) *Positive interactions among plants*. Bot. rev. 61: 306-349.
- CALERA, M.R., ANAYA, A.L., GAVILANES, M. (1995) *Effect of phytotoxic resin glycoside on activity of H-ATPase from plasma membrane*. J. Chem. Ecol. 21: 289-297.
- CARRAL, E.V. (2002) *Trend in allelopathy research over six-year period analysis (1995-2000)*. In Allelopathy: from molecules to Ecosystems. Ed. M. Reigosa & N. Pedrol) pp. 299-304.
- CASTELLANO, D. (2002) *Optimization of allelopathic bioassays. Application in the search for natural herbicides*. Ph.D. Thesis, Universidad de Cádiz, España.
- CEN, Y.P. y BORNMAN, J.F. (1993) *The effect of exposure to enhanced UV-B radiation on the penetration of monochromatic and polychromatic UV-B radiation in leaves of Brassica napus*. Physiol. Plantarum 87:249-255.
- CHAPIN, F.S., BLOOM, A.J., FIELD, C.B., WARING, R.H. (1997) *Plant responses to multiple environmental factors*. BioScience 37: 49-57.
- CHAVES, N., ESCUDERO, J.C., GUTIERREZ-MERINO, C. (1993) *Seasonal variation of exudate of Cistus ladanifer*. J. Chem. Ecol. 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*. PhD Thesis. Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain.
- CHAVES, N. y ESCUDERO, J.C. (1997) *Allelopathic effect of Cistus ladanifer on seed germination*. Fun. Ecol. 11: 432-440.
- CHAVES, N., ESCUDERO, J.C., GUTIÉRREZ-MERINO, C. (1997) *Role of ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of Cistus ladanifer exudate*. J. Chem. Ecol. 23(3): 579-603.
- CHAVES, N., RÍOS, J.L., GUTIÉRREZ, C., ESCUDERO, J.C., OLÍAS, J.M. (1998) *Analysis of secreted flavonoids of Cistus ladanifer L. by high-performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry*. J. Chrom. A. 799: 111-115.
- 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., ESCUDERO, J.C. (2001a) *Plant growth inhibiting flavonoids in exudate of Cistus ladanifer and in associated soils*. J. Chem. Ecol. 27: 623-631.
- CHAVES, N., SOSA, T., ALÍAS, J.C., ESCUDERO, J.C. (2001b) *Identification and effects of the interaction of phytotoxic compounds from exudate of Cistus ladanifer leaves*. J. Chem. Ecol. 27: 611-621.
- CHAVES, N., SOSA, T., ALÍAS, J.C., ESCUDERO, J.C. (2003) *Germination inhibition of herbs in Cistus ladanifer L. soil: Possible involvement of allelochemicals*. Allelopathy Journal. 11(1): 31-42.
- CHIAPUSIO, G., SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M., REIGOSA, M.J. GONZÁLEZ, L., PELLISSIER, F. (1997) *Do germination indices adequately reflect allelochemicals effects on the germination process?* J.Chem. Ecol. 23: 2445-2454.

- CHITWOOD, D.J. (1992) *Nematicidal compounds from plants*, in *Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture* (H.N. nirr and D.S. Seigler, eds.) Plenum Press, New York. pp. 185-204.
- CHOU, C.H. y KOU, Y.L. (1986) *Allelopathic research of subtropical vegetatio in Taiwan. Allelopathic exclusion of understorey by Leucaena leucophylla (Lam) de Wit*. J. Chem. Ecol. 12: 1431-1448.
- COLEY, P. (1988) *Growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivory defense*. Oecologia. 74: 531-536.
- CROTEAU, R. y JOHNSON, M.A. (1985) *Biosynthesis of terpenoid wood extractives*, in *Biosynthesis and Biodegradation of wood components* (T. Higuchi, ed.). Academic Press, Orlando. pp.379-439.
- CUTLER, H.G. (1992) *Herbicidal compounds from higher plants*, in *Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture* (H.N. nirr and D.S. Seigler, eds.) Plenum Press, New York. pp. 205-226.
- DALTON, B.R. (1989) *Physicochemical and biological processes affecting the recovery of exogenously applied feluric acid from tropical forest soils*. Plant and Soil 115: 13-22.
- DALTON, B.R. (1999) *The occurrence and behaviorof plant phenolic acids in soil environments and their potential involvement in allelochemical interference interactions: Methodological limitations in establishing conclusive proof of allelopathy*, pp. 57-74, in Inderjit, K.M.N. Dakshini and F.L. Chester (eds.). Principles and Practices in Plant Ecology. Allelochemicals Interactions CRC Press. Boca Raton, Florida.
- DALTON, B.R., BLUM, U., WEED, S.B. (1983) *Allelophatic substance in ecosystems: Effectiveness of sterile soil components in altering recovery of ferulic acid*. J. Chem. Ecol 9: 1185-1201.

- DALTON, B.R., WEED, S.B., BLUM, U. (1987) *Plant phenolic acids in soils: a comparison of extraction procedures*. Soil Sci. Soc. Am. J., 51, 1515.
- DALTON, B.R., WEED, S.B., BLUM, U. (1989) *Differential sorption of exogenously applied ferulic, p-coumaric, p-hydroxybenzoic, and vanillic acids in soil*. Soil Sci. Soc. Amer. J. 53: 757-762.
- DAO, T.H. (1987) *Sorption and mineralization of plant phenolic acids in soil*. In: G.R. Waller (Editor), *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 358-370.
- DATTA, S. C. y CHATTERJEE, A. K. (1980). *Allelopathy in Polygonum orientale: inhibition of seed germination and seedling growth of mustard*. Comp. Physiol. Ecol., Vol. 5, No. 2, pp. 54 to 59.
- DE SCISCILO, B., LEOPOLD, D.J., WALTON, D.C. (1990) *Seasonal patterns of juglone in soil beneath Juglans nigra and influence of J. nigra on understory vegetation*. J. Chem. Ecol. 16(4): 1111-1130.
- DELGADO, J.A. y SERRANO, J.M. (2001) *Heat shock, mass-dependent germination and seed yield as related components of fitness in Cistus ladanifer*. Environ. Exp. Bot. 46: 11-20.
- DEWICK, P.M. (1988) *Isoflavonoids*, in *The Flavonoids. Advances in Research since 1980*, J.B. Harborne (ed.) Chapman and Hall, New York. pp. 125-209
- DOLLING, A., ZACKRISSON, O., NILSSON, M.C. (1994) *Seasonal variation in phytotoxicity of bracken (Pteridium aquilinum)*. J.Chem. Ecol. 20(12): 3163-3173.
- EINHELLIG, F.A. y ECKRICH (1984) *Interactions of temperature and ferulic acid stress on grain sorghum and soybeans*. J. Chem. Ecol. 10: 161-170.
- EINHELLIG, F.A. (1995) *Allelopathy: current status and future goals*. in *Allelopathy: Organisms processes and application*, pp.1-24. Inderjit, K.M.N. Dakshini, M and Einhellig, F.A. American Chemical Society, Washington. USA.

- EINHELLIG, F.A. (2002) *The physiology of allelochemicals action: clues and views*. Allelopathy: from Molecules to Ecosystems, eds. Science Publishers. pp: 1-24.
- ELAKOVICH, S.D. y YANG, J. (1996) *Structures and allelopathic effects of Nuphar alkaloids: Nupharolutine and 6,6'-dihydroxythiobinupharidine*. J. Chem. Ecol. 22: 2209-2219.
- ESSEMBERG, M. (2001) *Prospects for strengthening plant defense through phytoalexin engineering*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 59: 71-81.
- FEENY, P. (1990) *Theories of plant chemical defense: A brief historical survey*. Symp. Hung. Biol. 39: 167-175.
- FISCHER, N.H. (1991) *Plants terpenoids as allelopathic agents*, in Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids (J.B. Harbone and F.A. Tomás Barderán, eds.) Phytochemical Society of Europe. 31: 377-398.
- FRANCISCO-ORTEGA, J., ELLIS, R.H., GONZÁLEZ-FERIA, E., 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*. Biodi. Cons. 3: 341-353.
- FRANCO, J.A. (1971) *Flora de Portugal (Continente e Açores) Vol I y II. Umbeliferae*. Lisboa.
- FRIEBE, A., ROTH, U., KUCK, P. (1997) *Effects of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones on activity of plasma membrane H⁺ ATPase*. Phytochem. 44: 979-983.
- FUTUYMA, D.J. y KEESE, M.C. (1992) *Evolution and coevolution of plants and phytofagous arthropods*. Herbivores: Their interations with Secondary Metabolites. Ed. G.A. Rosenthal & M.R. Berenbaum, San Diego. 2: 439-475.

- GALLARDO, T.M., MARTIN B.B., MARTIN D.F. (1998) *Inhibition of water fern Salvinia minima by cattail (Typha domingensis) extracts and by 2-chlorophenol and salicylaldehyde*. J. Chem. Ecol 24(9): 1483-1490.
- GALLET, C. (1994) *Allelopathic potential in bilberry- Spruce Forests: Influence of Phenolic compounds on spruce seedlings*. J. Chem. Ecol. 20 (5).
- GARCÍA-MARQUEZ y ESCUDERO (1991). *Influencia de diferentes temperaturas sobre la germinación de Cistus ladanifer*. III Jornadas de Ecología Terrestre. León.
- GARCÍA-MARTÍN, D. y GARCÍA-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 levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress, in phytochemical adaptation to stress* (B.N. Timmermann; C. Steelink y F.A. Loewus, eds.). Recent avances in Phytochemistry, Vol.18, pp: 273-320. Plenum, New York.
- GERSHENZON, J. y CROTEAU, R. (1992) *Terpenoids*. in Herbivores : their interation with secondary plants metabolites, 2nd edn. Ed.G.A. Rosental & M.R.Berembaun, pp. 1165-209. Academic Press, San Diego.
- GLASS, A.D.M. (1976) *Mechanisms of regulation of plant growth*. Eds. R. L. Bieleski. pp.159-164. Royal Society of New Zeland, Wellington.
- GNIAZDOWSKA, A. y BOGATEK, R. (2005) *Allelopathic interactions between plants*. Acta Phys. Plantarum. 27: 395-407.
- 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. D.G.S.F.A. XXIX a XXXII: 62-105.
- GONZÁLEZ, V.M., SOUTO, X.C., REIGOSA, M.J. (1997) *Weed controlby Capsicum annum*. Allelopathy J. 4: 101-110.

- GRAY, R.J. y HARBORNE, J.B. (1994) *A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993*, *Phytochemistry*, 37,19.
- GROSS, G.G. (1981) In E.E. Conn (ed) *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*. *Bot. Rev.* 60:373-425.
- GUTTERMAN, Y. (1994b) *Seed dispersal and germination strategies of *Spergularia diandra* compared with some other desert annual plants inhabiting the Negev desert of Israel*. *Israel J. Plant Sci.* 42: 261-274.
- GUTTERMAN, Y. (1994c). *Long-term seed influences on seed germinability of the desert annual, *Mesembryanthemum nodiflorum* L.* *Israel J. Plant Sci.* 42: 197-205.
- HALE, M.G. (1978) *Root exudates and exudation*, pp. 163-203, in Y.R. Demmergues. *Interactions between Nonpathogenic Soil Microorganisms and Plants*. Elsevier Science Publishers, New York.
- HALE y MOORE (1989) *Allelochemicals stress*, pp.117-127, in M. G. Halle and D. M. Orcutt. *The Physiology of Plants under Stress*. John Wiley & Sons, New York.
- HANCOCK C., BARLOW, H., LACEY, H. (1964) *The East Malling Coleoptile Straight Growth Test Method*. *J. Exp. Bot.* 166-176.
- HARBORNE, J.B. (1986). *Recent advances in chemical ecology*. *Nat. Prod. Per.*, 3, 323-344.
- HARBORNE, J.B. (1988) *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press. London.
- HARPER, J.L. (1975) *Allelopathy*. *Quarterly Review in Biology*.50: 493-495-

- HARTMANN, T. (1985) *Prinzipien des pflanzlichen sekundär Stoffwechsels*. Plant Systematic and Evolution. 150, 15-30.
- HASLAM, E. (1986) *Secondary metabolism-Fact or fiction*. Nat. Prod. Rep., 3, 217-249.
- HAUSON, A.D., DITZ, K.M., SINGLETARY, G.W., LELAND, T.J. (1983) *Gramine accumulation in leaves of barley grown under high temperature stress*. Plant Physiol. 71: 896-904.
- HERRERA, C.M. (1984) *Tipos morfológicos y funcionales en plantas del matorral mediterráneo del sur de España*. Studia Oecologica, V (7-34).
- HEISEY, R.M. (1990) *Evidence of allelopathy by Tree-of-heaven (Ailanthus altissima)*. J. Chem. Ecol. 16: 2039-2055.
- HRAZDINA, G. y JENSEN, R.A. (1992) *Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways*. Rev. Plant. Physiol. Plan. Mol. Biol. 43, 241-267
- HUANG, P.M., WANG, M.C., WANG, M.K. (1999) *Catalytic transformation of phenolic compounds in the soils*, pp. 287-306, in Inderjit, K.M.N. Dakshini and F.L. Chester (eds.). Principles and Practices in Plant Ecology. Allelochemicals Interactions CRC Press. Boca Raton, Florida.
- HUNTER, M.E. Y MENGES, E.S. (2002) *Allelopathic effects and root distribution of ceratiola ericolides on seven rosemary scrub species*. American Journal of Botany. 89: 1113-1118.
- INDERJIT y DAKSHINI, K.M.M. (1991) *Hesperetin 7-rutinoside (hesperidin) and taxifolin 3-arabinoside as germination and growth inhibitors in the soils associated with the weed, Pluchea lanceolata (DC) C.B. Clarke (Asteraceae)*. J. Chem. Ecol 17: 1585-1591.
- INDERJIT y DAKSHINI, K.M.M. (1992) *Formononetin 7-O-glucoside, an additional inhibitor from the soil associated with the weed, Pluchea lanceolata (DC) C.B. Clarke (Asteraceae)*. J. Chem. Ecol. 18: 713-718.

- INDERJIT y DAKSHINI, K.M.M. (1994) *Allelopathic effects of Pluchea lanceolata* (Asteraceae) on characteristics of foru soils and growth of mustard and tomato. Am J. Bot. 81: 799- 804.
- INDERJIT y DAKSHINI, K.M.M. (1995) *Quercetin and quercetrin from Pluchea lanceolata and their effect on growth of asparagus bean*. In pp. 86-95, Inderjit, K.M.N. Dakshini and F.A. Einhellig (eds.). *Allelopathy: organisms, processes, and applications*. American Chemical Society, Washington, DC.
- INDERJIT y DAKSHINI, K.M.M. (1996) *Allelophatic potential of Pluchea lanceolata: comparative study of cultivated fields*. Weed Sci. 44: 393-396.
- INDERJIT, DAKSHINI, K.M.M., FOY, C.I. (1999) *Principles and practices in plant ecology. Allelochemicals interactions*. CRC Press. Boca Ratón. Florida.
- INDERJIT. (1996) *Plant Phenolics in Allelopathy*. The Botanical Review 62 (2): 186-202.
- INDERJIT y MALLIK, A.U. (1996) *Growth and physiological responses of black spruce (Picea mariana) to sites dominated by Ledum groenlandicum*. J. Chem. Ecol. 22: 575-585
- INDERJIT y MALLIK, A.U. (1997) *Effect of phenolic compounds on selected soil properties*. Forest Ecology and Management. 92: 11-18.
- INDERJIT y MALLIK, A.U. (2001) *Can Kalmia angustifolia interferente to black spruce (Picea mariana) be explained by allelopathy?* Forest Ecol. Manage. 5518: 1-10.
- INDERJIT y NISHIMURA, H. (1999) *Effect of anthraquinonesemodin and phscion on availability of selected soil inorganic ions*. Annals Applied Biol. 135: 425-429.
- INDERJIT y WESTON, L.A. (2000) *Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses?* J. Chem. Ecol. 26; 2111-2118.

- INDERJIT y ASAKAWA, C. (2001) *Nature of interference potential of hairy (Vicia villosa R.) to radish (Raphanus sativus L.): does allelopathy play any role?* Crop Prot. 20: 261-265.
- INDERJIT y WEINER, J. (2001) *Plant allelochemicals interference or soil chemical ecology?* Perspectives in Plant Ecology. 4: 3-12.
- INDERJIT y NILSEN, E. (2003) *Bioassays and field studies for Allelopathy in terrestrial plants: Progress and Problems.* Crit. Rev. Plan. Sci. 22: 221-238.
- INDERJIT y CALLAWAY, M.M. (2003) *Experimental designs for the study of Allelopathy.* Plant and Soil. 256: 1-11.
- INDERJIT. (2005) *Soil Microorganisms: An important determinant of allelopathic activity.* Plant Soil. 274: 227-236.
- JACOBS, M. y RUBERY, P.H. (1988) *Naturally occurring auxin transport regulators.* Science. 241, 346.
- JÄDERLUND, A., ZACKRISSON, O., NILSSON, M.C. (1996) *Effects of bilberry (Vaccinium myrtillus L.) litter on seed germination and early seedling growth of four boreal tree species.* J. Chem. Ecol. 22(5): 973-986.
- JARVIS, B. (2000) *The role of nature products in evolution.* Recent Advances in Phytochemistry. Elsevier Science, 1-24.
- JONES, C.G. y FIRN, R.D. (1991) *On evolution of plant secondary chemical diversity.* Phil. Trans. Royal soc. London. Ser. B, 333. 273-280.
- JOSE, S., GILLESPIE, A.R. (1998) *Allelopathy in black walnut (Juglans nigra L.) alley cropping. II. Effects of juglone on hydroponically grown corn (Zea mays L.) and soybean (Glycine max L. Merr.) growth and physiology.* Plant Soil 203: 199-205
- KARLBURTJI, K.L., MOSJIDIS, J.A., MAMOLOS, A.P. (2001) *Allelopathic plants. 2. Lespedeza cuneata.* Allelopathy J. 8: 41-50.

- KATO-NOGUCHI, H. (1999) *Effect of light-irradiation on allelopathic potential of germinating maize*. *Phytochemistry*, Vol. 52: 1023-1027.
- KOBAYASHI, K. (2004) *Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil*. *Weed Biol. Management*. Vol. 4: 1-7.
- KROLLMANN, P. y GÜLZ, P. (1983) *Seed lipids from Cistus L*. *Zafanzenphysiol*. 116: 469-474.
- KUITERS, A.T. (1989) *Effects of phenolic acids on germination and early growth of herbaceous woodland plants*. *J. Chem. Ecol*. 15: 467-479
- KUULUVAINE, T. (1994) *Gap disturbance, reound microtopography, and the regeneration dynamics of boreal coniferous forest in Finland*. *Ann. Zool. Fenn*. 31:35-51.
- LAMBERS, H., CHAPIN III, F.S., PONS, T.L. (1998) *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, New York
- LARCHER, W. (1977) *Ecofisiología vegetal*. Ed. Omega. Barcelona.
- LEHMAN, M.E., BLUM, U., GERIG, T.M. (1994) *Simultaneous effects of ferulic and p-coumaric acids on cucumber leaf expansion in split-root experiments*. *J. Chem. Ecol*. 20: 1773-1782.
- LESHEM, Y.Y., KUIPER, P.J.C., ERDEI, L., LURIE, S., PERL-TREVES, R. (1998) *Do Selye's mammalian "GAS" concept and "co-stress" response exist in plants* In Csermely P (ed) *Stress of Life: Fron Molecules to Man: Annals of the New York Academy of Sciences* 851: 199-208.
- LEVITT, J. (1980) *Responses of plants to environmental stresses (2 Vol)* Academia Press, New Cork.

- LI, J., INOUE, M., NISHIMURA, H., MIZUTANI, J., TSUZUKI, E. (1993) *Interactions of trans-cinnamic acid, its related phenolic allelochemicals, and abscisic acid in seedling growth and seed germination of lettuce*. J. Chem. Ecol 19(8): 1775-1787.
- LICHTENTHALER, H.K. (1996) *Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants*. J. Plant Physiol. 148: 4-14
- LICHTENTHALER, H.K. (1998) *The stress concept in plants: An introduction*. In Csermely P (ed) *Stress of Life: From Molecules to Man: Annals of the New York Academy of Sciences*. 851: 187-198
- LINDROTH, R.L. y BATZLI, G.O. (1984) *Plant phenolics as chemical defenses: effects of natural phenolics on survival and growth of prairie voles (Microtus ochrogaster)*. J. Chem. Ecol. 10: 229-244.
- LOPES-BORGES, A.E. (1988) *Estudo da bio-ecologia de Cistus ladanifer L. (Esteva)-sua importancia em Portugal*. Instituto Nacional de Investigaçao Agrária. Estação Forestal Nacional.
- LYU, S.W., BLUM, U., GERIC, T.U., O'BRIEN, T.E. (1990) *Effects of mixtures of phenolic acid on phosphorus uptake by cucumber seedlings*. J. Chem. Ecol. 16(8): 2559-2567.
- MACÍAS, F.A., GALINDO, J.C.G., MASSANET, J.M., RODRIGUEZ-LUIS, F., ZUBIA, E. (1993) *Allelochemicals from Pilocarpus goudotianus leaves*. J. Chem. Ecol 19(7): 1371-1379.
- MACÍAS, F.A., MOLINILLO, J.M.G., VARELA R.M., TORRES, A., GALINDO, J.C.G (1999) *Bioactive compounds from the genus Helianthus*. Recent advances in allelopathy Vol.1. Servicio de publicaciones UCA. pp. 121-167
- MACÍAS, F.A., CASTELLANO, D., MOLINILLO, J.M.G. (2003) *Search for a Standard Phytotoxic Bioassay for Allelochemicals. Selection of Standard Target Species*. J. Agric. Food. Chem. 48: 2513-2521.

- MACÍAS, F.A., MARÍN, D., OLIVEROS-BASTIDAS, A., CASTELLANO, D., SIMONET, A.M., MOLINILLO, J.M.G. (2005) *Structure-Activity relationship (SAR) studies of benzoxacinones, their degradation products and analoges. Phytotoxicity on standard target species (STS)*. Journal of Agricultural and food Chemistry 53: 538-548.
- MALATO-BELÍZ, J., ESCUDERO, J.C., BUYOLO, J. (1992) *Application of traditional indios and of diversity to an ecotonal area of different bioceones*. The state of the art in Vegetario Science. pp.75. Toledo, España.
- MALLIK, A.U. (2002) *On the question of paradigm in the science of Allelopathy*. Allelopathy: from Molecules to Ecosystems, eds. Sceience Publishers, pp: 289-297.
- MATÍAS SÁNCHEZ, M. D. (1990) *Análisis de la estructura espacio-temporal de comunidades vegetales en campos abonados de los Arribes del Duero*. Tesis doctoral Facultad de Biología. Área de Ecología. Universidad de Salamanca.
- MICHELSEN, A., SCHMIDT, I.K., JONASSON, S., DIGHTON, J., JONES, H.E., CALLAGHAN, T.V. (1995) *Inhibition and growth, and effects on nutrient uptake of artice graminoids by leaf leachates extracts-allelopathy or resource competition between plants and microbes?* Oecologia. 103: 407-418.
- MILBORROW, B.V. (1984) *Inhibitors*. pp. 77-110, M.B. Wilkins (ed.). Advanced Plant Physiology. Pitman Publishing, London.
- MIYAMOTO, K., UEDA, J., YAMADA, K., HASEGAWA, K. (1997) *Inhibition of abscisión ob bean petiole explants by Lipidimoide*. J. Plant Growth Regul. 16: 7-9.
- MOLE, S. y JOERN, A. (1993) *Foliar phenolics of Nebraska sandhillsprairie graminoids: between-years, seasonal and interspecific variation*. J.Chem. Ecol. 19: 1861-1874.

- MOLISCH, H. (1937) *Der einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathic*. (Gustav Fischer, Jena)
- MOTHES, K. (1966) *Biogenesis of alkaloids and the problem of chemotaxonomy*. Lloydia, 29. 156-172.
- MULLER, C.H. (1969) *Allelopathy as a factor in ecological process*. Vegetatio 18: 348-357.
- NAVAREZ, D.C. y OLOFSDOTTER, M. (1996) *Relay seeding technique for screening allelopathic rice (Oryza sativa)*. In Proceeding of the 2nd International Weed Control Congress, pp. 1285-1290.
- NICOLAI, V. (1988) Phenolic and mineral content of leaves influences decomposition in European forest ecosystems. Oecologia, 75: 575-579.
- NILSSON, M.C., GALLET, C., 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.
- NORTHUP, R., YU, Z., DAHLGREN, R.A., VOGT, K.A. (1995) *Polyphenol control of nitrogen release from pine litter*. Nature. 337: 227-229.
- NUÑEZ, E. (1989) *Ecología del jaral de Cistus ladanifer L.* PhD Thesis. Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain.
- OLIVA, A., LAHOZ, E., CONTILLO, R., ALIOTA, G. (1999) *Fungistatic activity of Ruta graveolens extract and its allelochemicals*. J. Chem. Ecol. 25: 519-526.
- OLIEROS, A.J. (2006) *Estudios aleloquímicos en las gramíneas. Benzoxacinoïdes como aleloquímicos*. PhD Thesis. Universidad de Cádiz. España.
- OUESLATI, O., BEN-HAMMOUDA, M., GHORBAL, M.H., GUEZZAH, M., KREMER, R.J. (2005) *Barle autotoxicity as influenced by varietal and seasonal variation*. Journal of Agronomy and Crop Science. 191(4): 249-254.

- PANDEY, D.K. (1996) *Phytotoxicity of sesquiterpene lactone parthenin on aquatic weeds*. J. Chem. Ecol. 22: 151-160.
- PASCUAL, T., VARA, A., URONES, J.G., SAN FELICIANO, A. (1972) *Estudio de la gomorresina de Cistus ladanifer L.* Quimica. 68: 727-732.
- PASCUAL, T., URONES, J.G., BASABE, P. (1974) *Flavonoides del Cistus ladanifer L.* An Quim. 70: 155-157.
- PASCUAL, T., URONES, J.G., GONZALEZ, M. (1977) *Terpenoides monohidroxilados de la gomorresina de Cistus ladaniferus L.* An. Quim. 73: 1024-1028.
- PASCUAL, T., URONES, J.G., BASABE, P., AUBANELL, F.H. (1979) *Componentes minoritarios de Cistus ladaniferus L.: Lactosas.* An. Quim. 75: 335-340.
- PASCUAL, T., BELLIDO, I.S., BASABE, P., URONES, J.G. (1982) *Labdane diterpenoids from Cistus ladaniferus L.* Phytochemistry. 21(4): 899-901.
- PÉREZ-GARCÍA, F. (1997) *Germination of Cistus ladanifer seed in relation to parent material.* Plant Ecology. 133: 57-62.
- PÉREZ-GARCÍA, F. y PITA-VILLAMIL, J.M. (1999) *Ecofisiología de la germinación de las jaras (Cistus spp.).* Red Quercus. Servicios Informativos Ambientales S. L.
- POLITYCKA, B. (1997) *Free and glucosylated phenolic, phenol β -glucosyltransferase activity and membrana permeability in cucumber roots affected by derivatives of cinnamic and benzoic acids.* Acta Physiologiae Plantarum. 19: 311-312.
- POLITYCKA, B. (1998) *Phenolics and the activities of β -glucosydase in cucumber roots as affected by phenolic allelochemicals.* Acta Physiologiae Plantarum. 20: 405-410.
- PRAMANIK, M.H.R. (2000) *Effects of temperature and photoperiod on phytotoxic root exudates of cucumber (Cucumis sativus) in hydroponic culture.* J. Chem. Ecol. 26, 1953-1967.

- PRASAD, M.N.V., RENGEL, Z. (1998) *Plant acclimation and adaptation to natural and anthropogenic stress*. In Csermely P (ed) *Stress of Life: From Molecules to Man*: Annals of the New York Academy of Sciences 851: 216-223.
- PROKSCH, P. y GÜLZ, P.G. (1984) *Methylated flavonoids from Cistus ladanifer and Cistus palhinhae and their taxonomic implications*. *Phytochemistry*, 23(2): 470-471.
- PROKSCH, P., GÜLZ, P.G., BUDZIKIEWICZ, H. (1980) *Further oxygenated compounds in the essential oil of Cistus ladanifer L (Cistaceae)*. *Naturforsch.* 35c: 529-532.
- PUTNAM, A.R. y TANG, C.S. (1986) *Allelopathy: State of the science*. pp. 1-19 in A. R. Putnam & C.S.Tang (eds.), *The science of allelopathy*. John Wiley, New York.
- REIGOSA, M.J., SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M., GONZÁLEZ, L. (1999) *Ecophysiological approach in allelopathy*. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 577-608.
- RICE, E.L. (1965) *Inhibition of nitrogen fixing and nitrifying bacteria by seed plants. II. Characterization and identification of inhibitors*. *Physiologia Plantarum*. 18:255-268.
- RICE, E.L. (1984) *Allelopathic*. Academic Press, Orlando, Florida.
- RIMANDO, A.M., OLOFSDOTTER, M., DUKE, S.O. (2001) *Searching for rice allelochemicals: an example of bioassay-guided isolations*. *Agronomy Journal* 93: 16-20.
- RIVAS-GODAY y RIVAS-MARTINEZ, P. (1967) *Matorrales y tomillares de la Península Ibérica comprendidos en la clase Ononodo-Rosmarinetea*. Madrid.
- ROBINSON, T. (1980) *The Organic constituents of Higher Plants*, 4th ed. Cordus. Press. North Amherst. MA.

- ROBLES, C. y GARZINO, S. (1999) *Autotoxic and allelopathic potentials of Cistus albidus L.* Phytochemistry. 322: 677-685.
- ROBLES, C. y GARZINO, S. (2000) *Intraspecific variability in the essential oil composition of Cistus manpeliensis leaves.* Phytochemistry. 53: 71-75.
- ROMAGNI, J.G., ALLEN, S.N., DAYAN, F.E. (2000) *Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species.* J. Chem. Ecol. 26: 303-314.
- ROSCHINA, V.V. (2001) *Molecular-cellular mechanisms in pollen allelopathy.* Allelopathy J. 8: 11-28.
- ROSENTHAL, G.A. (1982) *Plant Nonprotein Amino and Imino Acids.* Accademic Press, New York.
- ROVIRA, A.D. (1969) *Plant root exudates.* Bot. Rev. 35: 35-37.
- RYAN, P.R., DELHAIZE, E., JONES, D.L. (2001) *Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots.* Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular biology 53: 527-560.
- SALISBURY, F.D. y ROSS, C.V. (1994) *Fisiología vegetal.* Grupo editorial Iberoamericana, Mexico.
- SCHMIDT, S.K. y LEY, R.E. (1999) *Microbial competition and soil structure limit the expression of allelochemicals in nature.* pp. 339-352, in Inderjit, K.M.N. Dakshini and F.L. Chester (eds.). Principles and Practices in Plant Ecology. Allelochemicals Interactions CRC Press. Boca Raton, Florida.
- SEIGLER, D.S. (1998) *Plant Secondary Metabolism.* Kluwer academic Publishers, Norwel (USA).
- SELMAR, D. (1992) *Die Metabolisierung Cyanogener Verdingungen.* Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. Braunschweig.

- SIMMS, E.L. y RAUSHER, M.D. (1987) *Costs and benefits of plant resistance to herbivory*. Am. Nat. 130: 570-581.
- SMITH, A.E. y MARTIN, L.D. (1994) *Allelopathic Characteristics of three cool-season grass species in the forage ecosystem*. Agronomy Journal. 86: 243-246.
- 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., GUTIÉRREZ-MERINO, C. (2004) *Inhibition of mouth skeletal muscle relaxation by flavonoids of Cistus ladanifer L.: a plant defense mechanism against herbivores*. J. Chem. Ecol. 30: 1087-1101.
- SOSA, T., ALÍAS, J.C., ESCUDERO, J.C., CHAVES, N. (2005) *Interpopulational variation in flavonoid composition of Cistus ladanifer L. exudate*. Biochemical systematics and ecology. 33: 353-364.
- STAMP, N.E., YANG, Y., OSIER, T.P. (1997) *Respose of an insect predator to prey fed multiple allelochemicals under representative thermal regimes*. Ecology. 78: 203-214.
- STENLID, G. (1970) *Flavonoid as inhibitors of the formation of adenosine triphosphate in planta mitochondria*. Phytochemistry. 9: 2251.
- STENLID, G. (1976) *Effects of substituents in the A-ring on the physiological activity of flavones*. Phytochemistry, 15, 911.
- STEINSIEK, J.W., OLIVER, L.R., COLLINS, F.C. (1982) *Allelopathic potential of wheat (Triticum aestivum) straw on selected weed species*. Weed science. 30: 495-497.
- SUMNER, L., MENDES, P., DIXON, R. (2003) *Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era*. Phytochemistry. 62: 817-836.

- SUTFELD, R., PETEREIT, F., NAHRSTODT, A. (1996) *Resorcinol in exudates of Nuphar lutea*. J. Chem. Ecol. 22: 2221-2231.
- TAKABAYASHI, J. y DICKE, M. (1996) *Plant carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants*. Trends in Plant Science. 1: 109-113.
- TATSUMI, K., FREYER, A., MINARD, R.D., BOLLAG, J.M. (1994) *Encyme-mediated coupling of 3,4-dichoroaniline and ferulic acid*. Enviromental Science and Technology. 28: 210-215.
- THEIS, N. y LERDAU, N. (2003) *The Evolution of Function in Plant secondary Metabolites*. J. Plant Sci. 164: 93-102.
- TUKEY, H.B. (1970) *The leaching of substances from plants*. Rev. Plant Physiol. 21: 305-324.
- VACURA, V. (1967) *Root exudates of plants. III. Efects of temperature and "cold Shock" on the exudation of various compounds from seeds and seedlings of maice and cucumber*. Plant soil. 27: 319-327.
- VAUGHN, S.F. y SPENCER, G.F. (1993) *Volatile monoterpenes as potential parent structures for new herbicides*. Weed Sci. 41: 114-119.
- VALBUENA, L., TARREGA, R., LUIS, E. (1992) *Influence of heat on seed germination of Cistus laurifolius and Cistus ladanifer*. International Journal of wildland fire. 2 (1): 15-20.
- VILES, A.L. y REESE, R.N. (1996) *Allelopathic potential of Echinacea angustifolia*. D.C. Environmental and Experimental Botany. 36(1): 39-43.
- VIVANCO, J.M., BAIS, H.P., STERMITZ, T.R., THELEM, G.C., CALLAWAY, R.M. (2004) *Biogeochemical variation in community response to root allelochemistry: novel weapons and exotic invasion*. Ecology Letters. 7: 285-292.

- VOGTH, T. y GÜLZ, P.G. (1991) *Isocratic column liquid chromatographic separation of a complex mixture of epicuticular flavonoid aglycones and intracellular flavonol glycosides from Cistus laurifolius L.* J. Chrom. 537: 453-459.
- WALLER, G.R. (1987) *Allelochemicals: Role in agriculture and forestry.* ACS Symposium Series 330. American Chemical Society, Washington, DC.
- WARDLE, D.A., AHMED, M., NICHOLSON K.S. (1991) *Allelopathic influence of Nodding Thistle (Carduus nutans L.) seed on germination and radicle growth of pasture plants.* New Zealand Journal of Agricultural Research. 34: 185-191.
- WARDLE, D.A. y LAVELLE, P. (1997) *Linkages between soil biota, plant litter quality and decomposition.* Driven by Nature. CAB international, pp.107-124.
- WARING, R.H., McDONALD, A.J.S., LARSSON, S., ERICSSON, T., WIREN, A., ARWIDSSON, E., ERICSSON, A., LOHAMMAR, T. (1985) *Differences in chemical composition of plants grown at constant relative growth rates with stable mineral nutrition.* Oecologia. 66: 157-160.
- WATERMAN, P.G. y MOLE, S. (1989) *Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plants.* Insect-Plant Interaction. 11: 107-134. CRC Press, Boca Raton, FL.
- WHITTAKER, R.H. y FEENY, P.P. (1970) *Allelochemicals: chemical interactions between plants.* Science. 171: 757-770.
- WHITE, C.S. (1994) *Monoterpenes: their effect on ecosystem nutrient cycling.* J. Chem. Ecol. 20: 1381-1406.
- WILLIAMS, D.H. y STONE, M.J. (1989) *Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?* J. Nat. Prod. 52: 1189-1208.
- WINK, M. (1987) *Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids.* Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol 4 (F. Constabel and I.K. Vasil, eds.), 17-42, Academic Press, San Diego, CA.

- WINK, M. (1999) *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Annual plant Reviews. Vol 2. Sheffield Academic Press.
- 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.
- WU, H., PRATLEY, J., LEMERLE, D., HAIG, T., AN, M. (2001) *Screening methods for the evaluation of crop allelopathic potential*. Botanical Reviews. 67: 403-415.
- ZHANG, G., ZHANG, W., LIAN, B., GU, L. (1999) *Insecticidal effects of extracts from two rice varieties to brown plant hopper Nilaparvata lugens*. J. Chem. Ecol. 25: 1843-1853.
- ZOBEL, A.M., CLARKE, P.A., 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.
- ZOBEL, A.M. y LYNCH, J.M. (1997) *Extrusion of UV-A absorbing phenolics in Acer spp. in response to UV and freezing temperature*. Allelopathy Journal. 4: 269-276.

"Los organismos vivos necesitan recursos para desarrollarse y crecer; parte de estos son utilizados para la producción de metabolitos secundarios relacionados con las estrategias defensivas. Así, ciertas plantas pueden liberar sustancias químicas que afectan el crecimiento o la distribución de otros organismos vegetales; esta interacción recibe el nombre de alelopatía.

Los esfuerzos en estudiar el efecto alelopático entre plantas puede ayudar a comprender las complejas interacciones que se producen entre ellas, revirtiendo en la comprensión de la dinámica de los ecosistemas"

