

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
Director Catedrático: F. MAYOR ZARAGOZA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA VEGETAL
Director Catedrático: L. RECALDE MARTINEZ

“BIOSINTESIS DE TERPENOS EN PINOS”

por

M. MONTEOLIVA, A. FUNES, E. GARCIA-PEREGRIN, M. F. ZAFRA y M. HENARES

Ars. Pharm. X, 285 (1969)

1.—INTRODUCCION

La biosíntesis de los terpenos en pinos transcurre en sus primeras fases de acuerdo con el esquema aparentemente universal, para todos los seres vivos, y que partiendo del acetato se llega a “Isopreno activo” o isopentenil-pirofosfato. Los trabajos que han conducido al esclarecimiento de esta vía metabólica son numerosos, encontrándose amplias revisiones en la bibliografía, por lo que prescindimos de considerarlos aquí.

A partir de este isopreno activo se derivan por distintas vías metabólicas y en muy diversos tejidos y seres vivos toda la gama de poliprenos (esteroles, carotenoides, terpenos, caucho, etc.).

Limitándonos a la biosíntesis de terpenos, nos encontramos con un trabajo de RUZICKA (1953) en que este autor postula que los terpenos derivarían de la ciclización del geraniol pasando por un intermediario común. SUKHOV (1957) estudia la incorporación del anhídrido carbónico marcado en árboles de *P. sylvestris*. Sus resultados señalan que la radioactividad se incorpora en parte a los terpenos, desapareciendo posteriormente, por lo que considera que los terpenos no son productos finales del metabolismo de las plantas, sino que tienen un metabolismo activo.

SANDERMAN y cols. (1960) estudian la incorporación de precursores marcados en la oleorresina de *P. jeffreyi*. Con MVA-2-¹⁴C obtienen n-heptano no radiactivo. El empleo de acetato-1-¹⁴C origina n-heptano radiactivo, situándose los carbonos marcados en posiciones pares. Consideran que el hidrocarburo procede directamente de la condensación del acetato y no es producto de la degradación de los terpenos.

STANLEY (1961) estudia la incorporación del MVA marcado en terminales de rama y cortes de tejidos de *P. attenuata* (que contiene un 98 % de alfa-pineno en su esencia). Aunque la incorporación de la radioactividad a este terpeno es muy baja, lo que hace presuponer dificultad de penetración del MVA a los lugares de síntesis, admite que la vía biosintética es similar a la demostrada para otros poliprenos. Se estudia la acción de los efectos sobre esta vía metabólica.

SANDERMANN (1962) y SANDERMANN y BRUNS (1962) estudian la incorporación del MVA-2-¹⁴C en *P. nigra* y *P. pinea*. En *P. nigra* el alfa-pineno y en *P. pinea* el limoneno, aparecen marcados en posiciones (determinadas por degradación química) que indican que la ciclización es esteroespecífica y más de acuerdo con una sustitución electrofílica que con un mecanismo de adición. El mismo mecanismo opera en la biosíntesis de la tujona (SANDERMANN y SCHWEERS, 1962).

VALENZUELA y cols. (1966) estudian los intermediarios fosforilados en la biosíntesis de terpenos en *P. radiata*. Con acículas aisladas demuestran la incorporación del fósforo radiactivo en el ATP, PP-MVA y Iso-PP. Con MVA marcado obtuvieron PP-MVA, P-MVA e Iso-PP radiactivos empleando un extracto de plántulas de *P. radiata*. Estos autores sugieren que el inmediato precursor de los terpenos cíclicos es el neril-PP en lugar del geranil-PP aceptado anteriormente. VALENZUELA y CORI (1967) apoyan esta hipótesis demostrando que por hidrólisis ácida el neril-PP forma alfa-terpineol a una velocidad cincuenta veces mayor que a partir el geranil-PP.

BEYTA y cols. (1969) trabajando con un sistema soluble de plántulas de *P. radiata* encuentran que el 6-7 % de la radiactividad del MVA se incorpora a diversos prenoles (isopentenol, dimetilalilalcohol, nerol y geraniol). El sistema requiere Mg ++ o Mn + y grupos -SH. Cerca del 1 por ciento de la radiactividad se encuentra fuertemente unida a las proteínas. Esta puede ser extraída con butanol y está asociada a prenoles de 15 átomos de carbono.

En general la incorporación de la radiactividad del MVA a los monoterpenos es muy baja en todos los trabajos citados, hecho que puede explicarse, tanto por la dificultad del MVA o sus metabolitos fosforilados para llegar a los lugares de síntesis como por las derivaciones que tienen lugar hacia otras vías metabólicas (carotenos, fitol, etc.) (WIECKOWSKI y GOODWIN, 1967).

Los componentes terpénicos volátiles de los pinos son en su gran mayoría hidrocarburos acíclicos, monocíclicos y bicíclicos de 10 átomos de carbono. Con frecuencia se encuentra en cantidades minoritarias derivados oxigenados y ésteres. De la excelente revisión de MIROV (1961) de la composición de las oleorresinas del centenar de especies que constituyen el género *Pinus* se deduce que el monoterpeno más ampliamente repartido es el alfa-pineno (se encuentra en casi todas las especies). Le sigue el beta-pineno (en 52 especies), limoneno (30), D3-careno (21) y menos frecuentes el beta-felandreno (10), terpinoleno (10), mirceno (7), canfeno (5), ocimeno (3), p-cimeno (2), alfa-tujeno (2). En algunas especies aparecen hidrocarburos alifáticos no derivados del isopreno: n-undecano en 10 especies y el n-heptano en 7.

La introducción de la cromatografía gaseosa al análisis de las oleorresinas y la extensión del análisis a tejidos del árbol no cambia sustancialmente este cuadro, pues los componentes mayoritarios siguen siendo los mismos y solo la mayor sensibilidad del método hacen que se amplíen para cada especie el número de los componentes de su esencia.

BANNISTER y cols. (1959) estudian la oleorresina de *P. attenuata*, *P. radiata* y de sus híbridos, encontrando que la composición de estos últimos es intermedia a la de los primeros.

WILLIAMS y BANNISTER (1962) someten al análisis cromatográfico la oleorresina de 22 especies distintas de pinos, encontrando el alfa-pineno en todas (en *P. sabiniana* sólo en trazas), el beta-pineno en 21, el mirceno en 19, el beta-fe-

landreno en 13, el canfeno en 12, el D3-careno en 5, limoneno en 11, el alfa-felandreno en 4, y el p-cimeno en 2.

OGNYANOV y cols. (1964) identifican en hojas de *P. sylvestris* alfa-pineno, canfeno, beta-pineno, mirceno, limoneno, ocimeno y p-cimeno. No encuentran D3-careno, ni alfa- y beta-felandreno.

BLIGHT y McDONALD (1964) estudian el valor que tiene la cromatografía gaseosa en el análisis de las oleorresinas. Estudian la variación del principal componente (D3-careno en *P. muricata* y alfa-pineno en *P. radiata*) en función de la altura de la incisión en el árbol y en repetidos análisis a lo largo de un año. Encuentran una gran constancia en estos componentes, siendo la desviación standard máxima del 1,5 %. VALENZUELA y cols. (1966) analizan hojas, brotes y olerresina de *P. radiata*, encontrando alfa-pineno, beta-pineno, limoneno, beta-felandreno, canfeno, D3-careno, sabineno y mirceno. En plántulas de esta especie sólo encuentran alfa- y beta-pineno.

HANOVER (1966 a y b) analizan los monoterpenos de *P. monticola*. Elige la corteza por considerarla más adecuada para el análisis genético. Identifica alfa- y beta-pineno, canfeno, D3-careno, limoneno y mirceno. No encuentra diferencias en la composición terpénica en árboles genotípicamente iguales, aunque crezcan en tres ambientes diferentes, por lo que supone que la composición es estable frente a factores ambientales. Sin embargo hay una fuerte diferencia entre las esencias procedentes de tejidos de diferente edad. Según este autor la herencia es aditiva para cada terpeno (excepto para el canfeno).

SMITH (1967) estudia las oleorresinas de ocho especies de pinos. Identifica n-heptano, n-nonano, n-undecano, alfa- y beta-pineno, canfeno, D3-careno, sabineno, alfa- y beta-felandreno, mirceno, limoneno, terpinoleno, gammaterpineno. En *P. washoensis* y *P. contorta* identifica también alfa-tujeno. No encuentra variaciones geográficas, aunque en todas las especies, excepto el *P. jeffrey*, tienen apreciable variación local. Si encuentra considerables diferencias entre especies. Los análisis realizados en muestras tomadas pasado un año de las primeras, indican que la composición es constante. La composición de los híbridos es, según este autor, intermedia, sólo cualitativamente. El gamma-terpineno identificado por el autor en trazas en diversas especies es también identificado en la oleorresina de *P. sylvestris* por BARDYSHEV y cols. (1968).

ZAVARIN y cols. (1967) estudian la oleorresina de *P. torreyana* de dos poblaciones diferentes y encuentran diferencias entre ambas por su diferente contenido en limoneno y beta-felandreno. Además de estos terpenos identifican alfa- y beta-pineno, mirceno, n-heptano, n-undecano y n-nonano.

ANDERSON y cols. (1969) estudian la oleorresina de *P. monticola*, *P. lambertiana*, *P. ponderosa* y *P. jeffrey* e identifican alfa- y beta-pineno, canfeno, D3-careno, mirceno, limoneno, alfa- y beta-felandreno, gamma-terpineno, terpinoleno, n-undecano, n-heptano y n-nonano.

2.—PARTE EXPERIMENTAL

2.1.—MATERIAL Y METODOS

2.1.1.—Semillas

Varias muestras de semillas han sido empleadas para nuestro estudio:

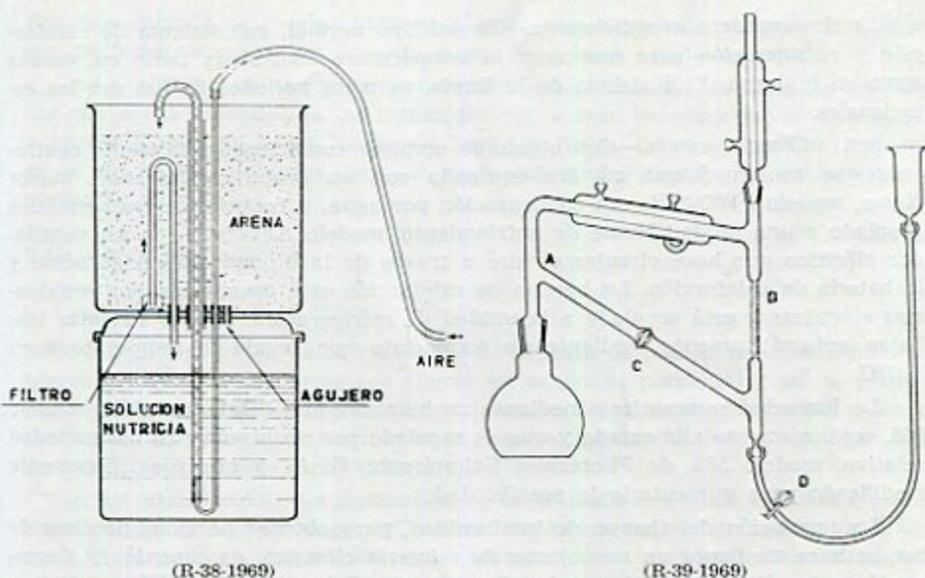
- a) *P. pinaster*, cosecha de 1965, procedente de Coca (Segovia, España); pureza = 97 %; fuerza germinativa = 80 %.
- b) *P. pinaster*, cosecha de 1965, procedente de Calasparra, Murcia, España; pureza = 97,3 %; fuerza germinativa = 80 %.
- c) *P. pinaster*, cosecha de 1965, procedente de Sierra de Cazorla (Jaén, España); pureza = 97 %; fuerza germinativa = 91 %.
- d) *P. pinaster*, semillas elegidas de árboles seleccionados como grandes productores de miera y procedentes de Coca (Segovia, España).

Todas las semillas fueron obtenidas por intermedio de los Servicios Forestales del Ministerio de Agricultura español.

2.1.2.—Arboles

Todas las muestras de hojas y ramas de las diferentes especies de pinos ensayadas proceden de diversas zonas forestales próximas a Granada, a fin de poder realizar los análisis dentro de las 24 horas siguientes a su obtención.

- a) Pinar de "La Peza".—Masa arbórea aparentemente homogénea de *P. pinaster* de 6 años de edad. Altitud media de 1.500 metros. Pluviosidad deficiente, pues la media anual apenas supera los 500 m.m. con un reparto desigual a lo largo del año, ya que la precipitación media en los meses de Junio, Julio y Agosto es inferior a 10 m.m. por mes. La temperatura media anual es de 10°C, con mínima de 1°C y máxima de 20°C.
- b) Pinar de "Huétor Santillán".—Próximo geográficamente al anterior y como éste procedente de repoblación. Es algo más viejo (10 años) y se diferencia fundamentalmente por ser una plantación mixta, en la que se encuentran todas las especies que se estudian en este trabajo. Sus características climatológicas son semejantes al pinar de "La Peza". (Nicolás A., Gandullo J. M., 1967).
- c) Pinar de "Tello".—Se encuentra en la ladera sur de Sierra Nevada (los anteriores están en la ladera norte), próximo a Lanjarón, y está constituido por un gran número de especies de coníferas (más de 100) sembradas hace 30-35 años con semillas importadas y con fines de aclimatación. Altitud media de 2.000 metros. Pluviosidad media anual de 800 m.m. El período seco comprende los meses de Junio, Julio, Agosto y Septiembre, en que el valor caído en estos cuatro meses es inferior a 100 m.m. Las temperaturas oscilan enormemente entre el período estival (30-40°C) y el período invernal en que bajan entre 0° y -9°C. (Elorrieta, 1964).



(R-38-1969)

(R-39-1969)

2.1.3.—Cultivo de plántulas

a) *Estratificación en las semillas.*—Se ha empleado para ello un refrigerador comercial del tipo horizontal en el que se mantiene la temperatura a 5°C con oscilaciones de grado y medio en más o menos. Las semillas se introducen en botes de plástico mezcladas con arena de cuarzo y de la forma siguiente:

En el fondo del bote se coloca una capa de arena humedecida con la cantidad de agua necesaria y de unos 3-4 cm. de espesor. Sobre ésta se coloca una simple capa de semillas de pino. A continuación otra capa de arena humedecida del mismo espesor, una nueva capa simple de semillas y así sucesivamente. Se termina con una capa de arena humedecida. Se deja un espacio de aire de unos 6 cm. de altura y se cierran los botes herméticamente para prevenir las pérdidas de humedad.

La estratificación se mantiene en estas condiciones durante seis semanas.

b) *Germinación.*—Las semillas previamente estratificadas, como se ha indicado, se colocan en cubetas de plástico de 25 × 25 × 25 cm. conteniendo 6 kgrs. de arena de cuarzo humedecida y cubiertas con tela de plástico para evitar pérdidas de humedad. Cuando comienzan a aparecer las hojas cotiledonares se descubren las cubetas.

Varias son las condiciones en que se han ensayado la germinación de las semillas:

b.1.) *Invernadero caliente.*—Consiste en una nave de estructura metálica con paredes y techo de material plástico en el que las condiciones de temperatura y luminosidad son prácticamente iguales al aire libre. Solamente están protegidas de la lluvia.

b.2.) *Invernadero acondicionado.*—Es del tipo normal, con sistema de calefacción y refrigeración para mantener la temperatura controlada tanto en verano como en invierno. Está aislado de la lluvia, pero los períodos de luz son los estacionales.

b.3.) *Cámara estufa.*—Con objeto de emplear condiciones totalmente controladas, se construyó una cámara equipada con un grupo refrigerador, marca Nume, modelo PWC-33H, con condensación por agua, y compresor semihermético acoplado a una unidad Nume de enfriamiento, modelo AFI-T-42, con un ventilador eléctrico que hace circular el aire a través de la unidad de refrigeración y la batería de calefacción. La batería de calefacción está constituida por resistencias eléctricas y está acoplada a la unidad de refrigeración. Ambos sistemas trabajan automáticamente mediante un termostato que regula la temperatura en $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

La humedad se mantiene mediante un humidificador "Defensor AG", modelo 505, continuamente alimentado y que es regulado por un higrómetro de humedad relativa, modelo 585, de Filotécnica Salmoiraghi, S. A., y que fue ligeramente modificado para aumentarle la sensibilidad.

La regulación del tiempo de luminosidad, para obtener períodos precisos de luz, se hace mediante un mecanismo de relojería eléctrico, de conexión y desconexión automática, acoplado a tubos fluorescentes Sylvania GRO-LUX que emiten a una longitud de onda favorable para el crecimiento de las plántulas.

Las condiciones generales establecidas en esta cámara son: temperatura ambiental = 20°C ; humedad 75-85 %; pH en la arena humedecida = 5,5. El fotoperíodo se indicará en cada caso.

Además de la germinación en arena de cuarzo lavada, se ha ensayado la vermiculita y la tierra de jardín.

c) Cultivo de las plántulas

c.1.) *Cultivo en arena.*—Una vez que aparecen las hojas cotiledonares, la arena se riega con una solución nutritiva diluida al 50 %. Expresado en p.p.p.m. la solución nutritiva contiene: N = 200; P = 80; K = 235,5; Mg = 50; S = 91; Cu = 0,05; Zn = 0,05; Mn = 0,5; B = 0,05, y Fe = 4. El regado se hace en cantidad suficiente para mantener la humedad deseada.

c.2.) *Cultivo hidropónico automático.*—Se han seguido las indicaciones de Eaton y Bernardin con algunas modificaciones para su mejor funcionamiento. Consiste en hacer un agujero de 1 mm. de diámetro que une ambos compartimentos, y que actúa como dispositivo de seguridad, permitiendo el completo drenado de la solución nutritiva en el período comprendido entre dos sucesivos regados. Veinticinco kgrs. de arena lavada se colocan en el aparato (véase gráfica n.º 1) y se siembran 200 semillas, ya estratificadas, mediante una plantilla normalizada que permite una correcta distribución y exacto contaje. Encima se coloca una capa de arena humedecida y se cubre con un plástico transparente. Se deja estar varios días y después se conecta al dispositivo de aire a presión para que se inicie la irrigación automática.

c.3.) *Cultivo directo en tierra.*—Se ha ensayado colocar las semillas en tierra cubriéndolas con una capa de arena y tomando la humedad por subirrigación.

Por este método se pueden obtener plantas con verticilos de verdaderas hojas, con perfecta sobrevivencia durante meses y en buen estado de salud.

c.4.) *Cultivo en tierra con trasplante.*—Las semillas germinadas en cubetas con arena humedecida, se transplantaron a macetas conteniendo una mezcla a partes iguales de arena, tierra de jardín y turba. En el trasplante se pierde el 50 % de las plántulas, pero el resto continúa viviendo indefinidamente en perfectas condiciones.

2.1.4.—Métodos analíticos

A) *Obtención de la esencia*

A.1.) *Preparación de la muestra.*—Si se trata de plántulas cuyos tejidos son blandos, basta con cortarlas con tijeras en pequeñas porciones y así se introducen en el matraz de destilación. Si se trata de hojas o ramas se trituran en un molino de café y una vez trituradas se pasan al matraz de destilación. Si se trata de miera se introduce directamente en el matraz.

A.2.) *Destilación.*—La destilación de la muestra se realiza en un dispositivo, modificación al Neo-clevenger, y que se encuentra esquematizado en la gráfica n.º 2. A la muestra, introducida en el matraz (de 10 a 50 grs., según su riqueza en esencia), se le agrega 30-60 ml. de agua destilada. Se ajusta el matraz al aparato de destilación y por el embudo se agrega agua (manipulando el clip (d) y la llave (c)) a fin de que el nivel de ésta se encuentre igualado en (a) y (b). (b) es un tubo de vidrio capilar calibrado, en el que 1 mm. de altura equivale a 1,1 microlitro de esencia. Igualados los niveles, se cierra el clip (d) y se deja abierta la llave (c). Se hace circular agua helada por los refrigerantes y se calienta el matraz mediante un pequeño hornillo eléctrico. El agua que destila en el matraz arrastra la esencia, que se acumula en la parte superior del capilar, retornando el agua al matraz. Este proceso se mantiene durante tres horas, pasadas las cuales se desconecta el hornillo y se deja que enfíe el aparato. Después, se cierra la llave (c) y se abre el clip (d). Entonces, subiendo y bajando el embudo, se consigue que toda la esencia extraída se introduzca en el capilar. Midiendo los mm. ocupados por ésta se puede calcular el contenido en componentes volátiles de la muestra analizada. Posteriormente y desconectando el refrigerante vertical, se agrega un volumen determinado de hexano, donde se disuelve la esencia, ayudándose con subidas y bajadas del embudo. De esta solución y con ayuda de una jeringa, se toman fracciones para su análisis posterior.

Con pequeñas cantidades de esencia, este procedimiento no es cuantitativo, obteniéndose rendimientos muy bajos (aproximadamente del 40 %), debido a que parte de la esencia se queda adherida a las paredes de los tubos de vidrio y no pasa al capilar. Se procedió a prescindir de la lectura directa en el capilar. Se redujo el tiempo de destilación a dos horas y media, luego se introduce en el matraz de destilación 0,5 ml. de hexano y se continúa la destilación media hora más. El hexano agregado sirve para lavar las paredes de los tubos y acumula la esencia sobre el tubo capilar. Pero como la esencia se encuentra disuelta en el hexano, no permite por su volumen deducir el contenido de la esencia en la muestra. La determinación cuantitativa hay que hacerla por cromatografía gaseosa, comparando con gráficas establecidas con soluciones patrones. En estas

condiciones y aún para pequeñas cantidades de esencia, la recuperación es del 80-90 %.

A.3.) *Obtención de ácidos resínicos.*—En algunos casos se realizó el análisis de los ácidos resínicos y para su obtención se procedió como sigue: terminada la destilación y se conecta a un dispositivo de Dean-Stark (con llave de purga) para determinación de humedad. Se agrega tolueno, y se pone en marcha el aparato, purgando repetidas veces el agua que destila junto al tolueno, y dando por terminada la operación cuando se observa que el tolueno no arrastra más agua. El contenido del matraz se filtra por papel y el residuo se lava varias veces con tolueno y las soluciones se filtran. Se reúnen los filtrados, se destilan para reducirlos a un volumen pequeño y por último se termina de evaporar hasta sequedad en una cápsula de vidrio, pequeña, colocada sobre una platina regulada a 70°C.

Los ácidos resínicos pueden purificarse posteriormente por diversos procedimientos. En nuestros ensayos nos ha resultado suficiente disolver el residuo en éter sulfúrico, agregar carbón activo filtrado después del papel. La solución queda incolora. Para la separación por capa fina o por cromatografía gaseosa, se procedió a la metilación de la solución anterior, empleando diazometano, según el método de Zinkel y Rowe, modificado por RIFFER y ANDERSON (1966).

B. Cromatografía de capa fina

Se ha empleado un equipo DESAGA con placas de vidrio de 20 × 20 cm. y la técnica general de preparación de placas según STAHL.

Adsorbentes:

Para aceites esenciales: Kieselgel G; Aluminium oxide G, (III).

Para ácidos resínicos: Silicagel G con nitrato de plata.

Espesor de la capa = 0,25 mm.

Temperatura interior de la cubeta = 18-20°C.

Distancia recorrida por el frente = 10-12 cm.

La muestra, disuelta en hexano se coloca en el punto de partida con micropipeta, bien en "punto", bien en "línea" de un cm.

Disolventes empleados para el desplazamiento:

Para las esencias se ensayaron numerosos disolventes y mezclas de ellos, eligiéndose (por su capacidad de diferenciación entre beta- y alfa-pineno) los siguientes:

- a) benceno sobre Aluminium oxide G, actividad III
- b) acetato de etilo/hexano (15/85) sobre Kieselgel G, y
- c) benceno/etanol (95/5) sobre Kieselgel G.

Para los ácidos resínicos, la fase móvil empleada fue el éter sulfúrico (libre de peróxidos) con éter de petróleo (p.e. 30-60°) al 10 %.

Revelado:

Para las esencias se empleó, bien los vapores de yodo, bien la vainillina sulfúrica con la siguiente modificación: Primero se pulveriza una solución de ácido sulfúrico en alcohol etílico al 20 %, e inmediatamente después la solución

de vainilla al 1 % en acetona. Calentando durante 10 minutos a 110°C aparecen las manchas correspondientes con distintas coloraciones.

Para los ácidos resínicos metilados se empleó una solución de ácido sulfúrico en éster al 20 %. Después de pulverizar esta solución se tiene en la estufa durante 15 minutos a 110°C. La observación de las manchas se hace a la luz ultravioleta, para lo que se empleó una lámpara "Hanovia-Chromatolite" que emite a 260 milimicras.

C) Cromatografía en papel

Esta técnica se ha empleado para la identificación y cuantificación de los metabolitos intermediarios en la biosíntesis de terpenos. Los papeles cromatográficos usados son: Schleicher & Schull 2043 b y Whatmann n.º 1, cortados bien en tiras o en hojas, según el número de muestras ensayadas a la vez.

Cromatografía ascendente en cubetas herméticamente cerradas, con la fase móvil depositada en el fondo de la cubeta y a una temperatura de 18-20°C. La cantidad de muestra colocada en el origen fue de 25 microlitros, bien en "punto", bien en "línea" de 1 cm. El tiempo de desarrollo depende de la fase móvil empleada.

Fase móvil:

Dada la variedad de los posibles metabolitos intermediarios a identificar en los ensayos de incubación realizados, hubo necesidad de emplear para la misma muestra diferentes fases móviles. Son las siguientes:

disolventes)	proporción (v/v)	tiempo de desarrollo (horas)
1) n-butanol/ácido fórmico/agua	77/10/13	12
2) t-butanol/ácido fórmico/agua	20/ 5/ 8	10
3) t-alcohol amílico/ácido acético/agua	4/ 1/ 2	8
4) ácido isobutírico/amoníaco/agua	22/ 1/10	10
5) metanol/amoníaco/agua	6/ 1/ 3	7
6) n-propanol/amoníaco/agua	6/ 3/ 1	10
7) isopropanol/isobutanol/amoníaco/agua	40/20/ 1/39	12

Revelado:

Los papeles desarrollados se secan en vitrina a temperatura ambiente y para el revelado de las manchas se siguen tres procedimientos:

a) Nucleótidos.—Por observación al ultravioleta con luz monocromática a 260 milimicras.

b) Esteres fosforilados.—Por revelado específico, bien con el reactivo de Rosenberg (1959), bien con la mezcla ácidoperclórico/ácido clorhídrico N/molibdato amónico al 4 %/agua (5/10/25/60).

c) Metabolitos marcados isotópicamente con C-14.—Las tiras cromatográficas, desarrolladas y secadas, se pasan por un detector, marca Actigraph III, modelo 1002, que nos identifica y determina a la vez, la posición y la radiactividad de las manchas.

D) *Cromatografía gaseosa*

D.1.) *Análisis de los componentes volátiles de la oleorresina.*—Para todas las experiencias se ha utilizado un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer, modelo F-7, equipado con un registrador Hitachi-Perkin-Elmer 159 y empleando el detector de ionización de llama.

Las columnas ensayadas y las condiciones de trabajo, han sido las siguientes:

a) Columna Perkin-Elmer con fase estacionaria de Carbowax 20 M al 10 % sobre Chromosorb G, lavado al ácido y tratado con dimetil-clorosilano 88/100.

b) Columna Perkin-Elmer "R" con fase estacionaria de propilen-glicol (UCON LB-50 X) al 4 % sobre Chromosorb G, lavado al ácido y tratado con dimetil-clorosilano 88/100.

c) Columna Perkin-Elmer DC-550 con fase estacionaria de aceite de fenil-silicona al 15 % sobre Celite-545, 60/100.

Condiciones de trabajo con cada columna

	a) 95°C	b) 150°C	c) 150°C
temperatura del horno	105 "	200 "	190 "
temperatura del bloque inyección	105 "	180 "	180 "
temperatura del detector	105 "	180 "	180 "
flujo de nitrógeno	20 ml./m.	26 ml./m.	50 ml./m.
flujo de aire	40 " "	40 " "	80 " "
flujo de hidrógeno	18 " "	20 " "	45 " "
Volumen de la muestra inyectada	0.2 micol.	0.2 microl.	0.2 microl.
Velocidad de la carta	1cm./m.	1 cm./m.	1 cm./m.
Atenuación	800	40	

Los tiempos de retención de cada componente volátil de la oleorresina, se han definido comparándolos con patrones preparados por nosotros. La cuantitativa se ha realizado midiendo las áreas de los picos (en función de las alturas y la base de los mismos).

D.2.) *Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos resinicos.*—Se ha empleado el mismo equipo cromatográfico anterior. Columna Perkin-Elmer EGS, con fase estacionaria de etilen-glicol-succinato al 20 % sobre Chromosorb G, 88/100, lavado al ácido y tratado con dimetilclorosilano.

Las condiciones de trabajo con esta columna fueron las siguientes:

temperatura del horno	180°C
temperatura del bloque de inyección	200 "
temperatura del detector	210 "
flujo de gas portador	95 ml./m.
flujo de hidrógeno	55 " "
flujo de aire	92 " "
Volumen de la muestra inyectada	2 microlitros
Velocidad de la carta	0.5 cm./m.
Atenuación	32, 64 y 100

D.3.) *Análisis de los componentes volátiles marcados.*—Para la radiocromatografía gaseosa, se ha empleado un radiocromatógrafo Perkin-Elmer, modelo RGC-170, constituido por un reactor de flujo gaseoso y un contador proporcional.

Se ha utilizado en dos formas:

- a) Para la medida de la actividad total de una muestra por inyección directa, y
- b) Conectado al cromatógrafo F-7 para la detección y medida de las fracciones previamente separadas.

E) *Otros métodos analíticos*

E.1.) *Espectrofotometría en el ultravioleta.*—Se ha empleado el modelo DB de la casa Beckman, con registro gráfico.

E.2.) *Espectrofotometría en el infrarrojo.*—Los ensayos realizados lo han sido con un espectrofotómetro Perkin-Elmer IR, modelo 137. Se han sustituido las células normales por células de 1 mm. de espesor y 4 microlitros de capacidad. Su uso es necesario debido a que las muestras analizadas eran muy pequeñas. Se obtuvieron en estas condiciones los espectros de los diferentes patrones en solución en tetracloruro de carbono. Los mismos patrones se inyectaron en el cromatógrafo de gases F-7 (cada uno por separado) y se recogieron los picos correspondientes por "splitting", refrigerando el dispositivo de recogida con aire líquido. Se obtuvieron idénticos espectros a los obtenidos directamente con las soluciones patrones.

Este sistema ha sido empleado, junto a los valores de retención, para la identificación de los picos en los cromatogramas de las muestras analizadas.

E.3.) *Manometría.*—En los ensayos realizados se ha empleado un Warburg, modelo VI-85 "B. Braun", con manómetros tipo DK/w y matraces de reacción Ia. En todas las operaciones se han seguido las instrucciones de UMBRETT y cols. (1949).

E.4.) *Determinación de clorofila.*—Se ha seguido el método espectrofotométrico de MacKinney (en PAECH y TRACEY, 1955).

E.5.) *Experiencias con homogenados.*

a) *Preparación de los extractos.*—Una determinada cantidad de material (recientemente recolectado y pesado) se tritura en un mortero de vidrio rodeado de hielo, y agregando tampón Tris-ClH, 0,5 pH = 7,9, con el objeto de evitar el descenso del pH cuando los ácidos contenidos en las estructuras de la planta se liberan. La temperatura durante toda la operación debe ser inferior a 5°C. La proporción final entre planta/tampón es de 1/1. Los extractos así obtenidos se filtran a través de una tela, escurriendo si es necesario y recogiendo en un vaso rodeado de hielo. El pH debe de permanecer constante, por lo que ha de ser corregido a lo largo de la operación.

b) *Diálisis de los extractos.*—Los extractos se colocan en un tubo de diálisis que se sumerge en un vaso lleno de tampón tris-ClH 0.005 M, pH = 7,9 (aproximadamente 500 ml.). El tampón se cambia a la media hora, a la hora, hora y media y finalmente se deja estar dos horas más.

c) **Reacción enzimática.**—Se llevan a efecto incubando los extractos a 37°C en periodos de tiempo variables y con la adición de diferentes sustancias coenzimáticas y cofactores metálicos. La reacción se para inactivando los enzimas por calefacción a 90°C durante 3-4 minutos. El precipitado se centrifuga a temperatura ambiente a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos.

d) **Análisis de los productos de la reacción.**—Este se realiza como se indica en los anteriores apartados.

e) **Preparación del mevalónico a partir de su lactona.** El MVA es suministrado al estado de lactona en solución bencénica. Para transformarlo en sal, el benceno es evaporado, y el residuo se trata con un volumen de potasa que supere el equivalente en lactona. El pH es aproximadamente de 10. Se mantiene a 37°C durante 30 minutos, con lo cual la lactona pasa a mevalonato potásico. Se conserva a -20°C hasta su uso. Antes de su empleo es conveniente que la solución de mevalonato potásico se tenga a 37°C durante 30 minutos.

f) **Protocolo general para las reacciones enzimáticas.**—En los primeros ensayos empleando el MVA marcado con dilución, los intermediarios marcados no fueron detectados radiográficamente. Por consiguiente se empleó para todos los casos el MVA (2-¹⁴C y 1-¹⁴C) sin dilución isotópica. En general el protocolo de los ensayos enzimáticos responde al siguiente esquema:

Extracto	2,0 ml.
ATP (80 microM./ml.)	0,3 "
MgCl ₂ (120 microM./ml.)	0,1 "
MgCl ₂ (120 microM./ml.)	0,1 "
MVA marcado (2 microM./ml.)	0,1 "

Eventualmente el sistema puede contener otros cofactores (u omitirse algunos de los indicados). Las circunstancias especiales de los ensayos se especifican en las correspondientes tablas de resultados. La mezcla de incubación generalmente se completa a 3,0 ml. con tampón Tris-ClH 0,5 y pH = 7,9. La cantidad de MVA adicionada es función de su actividad específica.

F) *Procedencia de los estándares y reactivos*

Estandards: alfa-pineno, beta-pineno, canfeno, limoneno, p-cimeno y terpineoleno de la firma Dragoco (Alemania); limoneno, canfeno, p-cimeno y 4-terpineol de la firma Koch-Light (Inglaterra); sabineno, D₂-careno, beta-felandreno y ácido abiótico de la firma Fluka (Suiza); geraniol, esencia de sabinina, linalol, citronelol y dipenteno de la firma "Destilerías Granadinas" (Granada, España).

Disolventes y adsorbentes.—Para cromatografía en papel, capa fina, gaseosa y para espectrofotometría infrarroja de las firmas Merck, BPH y Riedel y de calidad "especiales para cromatografía".

Productos marcados: MVA (1- y 2-¹⁴C) de la firma "The Radiochemical Centre" de Amersham; acetato sódico 1-¹⁴C y ¹⁴CO₂Ba de la Junta de Energía Nuclear (Madrid).

Coenzimas y efectores: De las firmas Sigma, Nutritional Biochemicals, Boehringer y Riedel.

Los restantes reactivos proceden de diversas firmas nacionales y de calidad "reactivos pro análisis".

2.2. TABLAS Y GRAFICAS

2.2.1. Ensayos previos.—Establecimiento de técnicas

TABLA N.º 1

Germinación y cultivo de semillas de *P. pinaster*.—Cubetas en invernadero acondicionado.—Temperatura = 12 horas a 19°C y 12 horas a 30°C

origen de semillas	estratificación	substrato	n.º de semillas sembradas	% germinación	edad plántula rec.	P. S. a 60°C
Coca	67 días	arena	200	53,0	21 días	13,0 %
"	82	vermiculit	200	22,5	33	11,6
"	82	arena	200	58,0	12	12,0
"	82	vermiculit	200	24,0	—	—
"	65	arena	200	56,0	—	—
"	65	vermiculit	200	22,0	—	—
"	67	arena	600	80,0	25	12,2
"	65	"	600	38,1	42	10,1
Calasparra	62	"	600	36,5	33	11,9
"	60	"	600	61,2	32	12,8
"	60	"	800	85,6	28	11,6
"	58	"	600	87,2	31	11,9
"	54	"	900	91,8	36	11,3
"	54	"	850	89,7	27	13,4
"	53	"	900	86,0	25	13,3
"	51	"	800	85,2	20	11,4
"	54	"	1.000	87,8	21	11,9
"	54	"	910	83,5	26	12,2
"	54	"	950	92,0	30	10,6
"	52	"	750	71,7	40	12,7
"	55	"	800	65,6	37	9,6
"	58	"	900	79,2	43	14,8
"	26	"	570	78,1	51	10,5
"	27	"	930	82,6	35	11,9
"	24	"	860	64,7	31	11,4

TABLA N.º 2

Germinación y cultivo de semillas *P. pinaster* en arena.—Cubetas en cámara estufa. Temperatura constante de 20°C.—Fotoperíodo de 12 horas luz

origen de las semillas	estratificación en días	edad de la plántula en la recolección	% de peso seco a 60°C
Cazorla	54	22	11.1
"	55	23	10.6
"	53	15	16.8
"	53	30	16.5
"	54	25	14.4
"	57	30	12.9
"	58	24	11.7
"	51	23	11.7
"	53	22	12.1
"	54	21	12.1
"	55	36	22.5
"	47	15	18.1
"	49	15	18.1
"	42	15	16.9
"	46	10	19.6
"	46	24	19.9
"	36	20	15.3
"	34	10	19.2
"	36	21	14.5
"	33	8	18.5

TABLA N.º 3

Germinación y cultivo de semillas de *P. pinaster* en tierra.—Invernadero acondicionado.—Temperatura de 19°C por 12 horas y de 30°C por otras 12 horas

origen de las semillas	estratificación en días	edad de la plántula al recolectar	% de peso seco a 60°C
Calasparra	30	73	27.8
"	43	60	27.8
"	44	54	22.9
"	47	55	25.0
"	47	45	25.4
"	55	59	15.4
"	59	55	16.6
Cazorla	45	17	15.8
"	45	23	13.9
"	51	45	13.9
"	51	18	12.2

TABLA N.º 4

Cultivos hidropónicos.—Diseño de las experiencias

N.º	Tratamiento Variante	Proporción de la dosis total, en % de la dosis						dosis total m.eq./l.
		NO ₃	SO ₄ /2	PO ₄ /3	K	Ca/2	Mg/2	
1	N	33.3	11.1	11.1	11.1	22.2	11.1	15
2	S	11.1	33.3	11.1	11.1	22.2	11.1	15
3	P	11.1	11.1	33.3	11.1	22.2	11.1	15
4	K	11.1	22.2	11.1	33.3	11.1	11.1	15
5	Ca	11.1	22.2	11.1	11.1	33.3	11.1	15
6	Mg	11.1	22.2	11.1	11.1	11.1	33.3	15
7	Mx(1)	11.1	22.2	33.3	11.1	11.1	11.1	15
8	Mx(2)	11.1	22.2	33.3	11.1	11.1	11.1	30
9	Mx(3)	11.1	22.2	33.3	11.1	11.1	11.1	45
10	Mx(4)	11.1	22.2	33.3	11.1	11.1	11.1	60

TABLA N.º 5

Cantidades en m.eq./l. (de acuerdo con las proporciones de la dosis total en los tratamientos)

m.eq./l.		Tratamientos									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NO ₃ ⁻	Ca ⁺⁺	3.330	—	1.665	—	1.665	1.665	—	—	—	—
	K ⁺	—	—	—	1.665	—	—	—	—	—	—
NHA ₄ ⁺	Cl ⁻	1.665	1.665	—	—	—	—	1.665	3.330	4.995	6.660
	Mg ⁺⁺	1.665	1.665	1.665	1.665	1.665	3.330	1.665	3.330	4.995	6.660
SO ₄ ⁼	Ca ⁺⁺	—	3.330	—	1.665	1.665	—	1.665	3.330	4.995	6.660
	K ⁺	1.665	1.665	4.995	1.665	1.665	1.665	4.995	9.990	14.985	19.980
PO ₂ H ₂ ⁻	NH ₄ ⁺	1.665	1.665	—	—	—	—	1.665	3.330	4.995	6.660
	K ⁺	1.110	1.110	—	2.775	1.110	1.110	—	—	—	—
Cl ⁻	Ca ⁺⁺	—	—	1.665	—	1.665	—	—	—	—	—
	Mg ⁺⁺	—	—	—	—	—	1.665	—	—	—	—
K ⁺	PO ₂ H ₂ ⁻	0.555	0.555	1.665	0.555	0.555	0.555	1.665	3.330	4.995	6.660
	Cl ⁻	1.110	1.110	—	2.775	1.110	1.110	—	—	—	—
Ca ⁺⁺	NO ₃ ⁻	—	—	—	1.665	—	—	—	—	—	—
	SO ₄ ⁼	3.330	—	1.665	—	1.665	1.665	—	—	—	—
Mg ⁺⁺	Cl ⁻	—	3.330	—	1.665	1.665	—	1.665	3.330	4.995	6.660
	SO ₄ ⁼	—	—	1.665	—	1.665	—	—	—	—	—
m.eq./l. de cada elemento	Cl ⁻	1.665	1.665	1.665	1.665	1.665	3.330	1.665	3.330	4.995	6.660
		—	—	—	—	—	1.665	—	—	—	—
m.eq./l. de cada elemento		15	15	15	15	15	15	15	30	45	60

TABLA N.º 6

Cantidades de la solución stock, expresadas en ml., necesarias para preparar 15 litros de cada tratamiento

	Tratamiento									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NO ₃ K	—	—	—	25,3	—	—	—	—	—	—
(NO ₃) ₂ Ca.H ₂ O	45,6	—	22,8	—	22,8	22,8	—	—	—	—
Cl NH ₄	13,4	13,4	—	—	—	—	13,4	26,8	40,2	53,6
SO ₄ H ₂ K	11,4	11,4	34,2	11,4	11,4	11,4	34,2	68,1	102,1	136,2
SO ₄ Mg.7H ₂ O	30,8	30,8	30,8	30,8	30,8	61,2	30,8	61,2	92,4	123,2
Cl K	12,4	12,4	—	32,0	12,4	12,4	—	—	—	—
Cl ₂ Ca	—	—	13,9	—	13,9	—	—	—	—	—
Cl ₂ Mg	—	—	—	—	—	25,3	—	—	—	—
SO ₄ Ca.2H ₂ O	—	4.290	—	2.145	2.145	—	2.145	4.290	6.435	8.580
Cl ₃ Fe	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Sol.Hoagland	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5

Nota.—La cantidad de sulfato cálcico está expresada en gramos del producto que se ha de añadir para preparar 15 litros de tratamiento.

TABLA N.º 7

Rf de los terpenos utilizados como patrones en cromatografía en capa fina, empleando diferentes adsorbentes y fases móviles

terpeno	Adsorbente y fase móvil		
	Aluminum Oxido G benceno	Kieselgel G hexano	Kieselgel G benceno/etanol
alfa-pineno	0,79	0,97	0,78
beta-pineno	0,81	0,95	0,89
limoneno	0,83	0,97	0,87
terpinoleno	0,81	—	0,66
canfeno	0,20	—	—
para-cimeno	0,09	—	0,66

TABLA N.º 8

Cromatografía gaseosa.—Tiempos de retención de diferentes patrones y disolventes y en diferentes columnas y condiciones

compuesto	Columna Perkin-Elmer DC 550			
	tiempo de retención a 130°C	Rf (para alfa-pineno = 1,00)		
		a 110°C	a 130°C	a 115°C
alfa-pineno	3,95 m.	1,00	1,00	1,00
canfeno	4,40 "	1,14	1,10	1,13
sabineno	4,54 "	—	—	—
beta-pineno	5,10 "	1,36	1,32	1,29
D3-careno	5,30 "	—	—	1,35
limoneno	6,70 "	1,84	1,68	1,57
para-cimeno	7,00 "	1,86	1,75	1,57
beta-felandreno	7,53 "	—	—	1,74
terpinoleno	9,40 "	2,50	2,30	2,00
4-terpineol	16,80 "	4,50	4,30	3,45
hezano	0,95 "	—	—	—
acetato de etilo	1,10 "	—	—	—
cloroformo	1,20 "	—	—	—
benceno	1,30 "	—	—	—
tetracloruro de carbono	1,35 "	—	—	—

TABLA N.º 9

Rf (en relación a alfa-pineno) de los patrones en otras columnas y diferentes condiciones de trabajo

temperatura	Columna "R"			Carbowax 20 M	
	150°C			160°C	95°C
	26	30	40	26	20
flujo, ml./m.					
Compuesto:					
alfa-pineno	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
canfeno	1,14	1,13	1,13	1,13	—
sabineno	1,26	1,26	1,12	1,23	—
beta-pineno	1,29	1,29	1,27	1,28	1,54
D3-careno	1,44	—	—	—	—
limoneno	1,66	1,70	1,59	1,59	2,01
beta felandreno	1,77	—	—	—	2,42
terpinoleno	2,15	2,25	—	—	2,84
p-cimeno	1,77	—	1,72	1,72	—
4-terpineol	4,88	—	3,00	—	—
geraniol	6,74	—	5,00	—	—

TABLA N.º 10

Proporcionalidad entre el área del pico y la cantidad de alfa-pineno inyectada

dilución de la solución	50%	40%	30%	20%	10%	5%	1%
cantidad inyectada (1)	1	1	1	1	1	1	1
área (cm. ²)	7,7	6,4	5,6	4,7	2,7	1,12	0,3

TABLA N.º 11

Proporcionalidad entre la respuesta obtenida y la atenuación aplicada al detector

atenuación aplicada	100	200	400	800	1.600	3.200
área del pico (cm. ²)	5,1	2,4	1,1	0,6	0,32	0,16
atenuación x área	510	480	440	480	512	512

TABLA N.º 12

Rf de los distintos metabolitos del MVA y derivados fosfóricos de la adenosina en los líquidos de desarrollo empleados: Según referencias bibliográficas (:).
Encontrado por nosotros (.)

	1	2	3	4	5	6	7
MVA (:)	.75	.80—.85	.74	.66	.79	—	—
(.)	.72—.80	.90—.95	.76—.92	.64—.72	—	.67—.80	—
MVA lactona (:)	—	—	—	.75	—	—	—
(.)	—	—	—	.78—.85	—	—	—
P-MVA (:)	.15—.18	.55—.61	.19	.37	.52	—	—
(.)	.12—.25	.67—.75	.25—.35	.40—.46	—	.24—.33	—
PP-MVA (:)	.03	.29—.35	.09	.20	.22	—	—
(.)	.20—.10	.42—.50	.16—.23	.31—.36	—	.08—.16	—
Iso-PP (:)	.32	.53—.61	—	—	.57	.47	.48
G-PP (:)	—	—	—	—	—	.67	.77
Far-PP (:)	—	—	—	—	—	.74	.87
Dal-PP (:)	—	—	—	—	—	.35	—
ATP (:)	—	.00—.16	—	.20	—	—	—
(.)	.00—.02	.00—.12	.04—.07	.35—.40	—	.14—.15	—
ADP (:)	—	.08—.16	—	.37	—	—	—
(.)	.20—.25	.13—.19	.04—.07	.41—.50	—	.16—.22	—
AMP (:)	—	.26—.30	—	—	—	—	—
(.)	.35—.39	.25—.30	.16—.17	.53—.63	—	.22—.32	—
Adenosina (.)	.20—.25	.66—.70	.52—.60	.85—.95	—	.63—.70	—
Pi (:)	.15	.50—.58	—	—	.30	—	—
PPi (:)	—	.28—.36	—	—	.16	—	—

2.2.2.—Variaciones de los componentes de las plántulas de *P. pinaster* durante el crecimiento

TABLA N.º 1

Peso seco de las plántulas en función de la edad y fotoperiodo.—Forma del análisis: (a) = secando las plántulas a 105°C inmediatamente después de la recolección; (b) = calculado de los residuos de las extracciones; (c) = secando las plántulas a 105°C inmediatamente antes de iniciar el análisis

fotoperiodo	edad en días	(a)	(b)	(c)
0 horas luz	0	62,25 %	76,13 %	—
" " "	3	67,30	71,99	—
" " "	6	41,69	49,56	—
" " "	10	41,96	42,68	—
" " "	15	15,00	26,60	—
" " "	20	11,42	11,81	—
" " "	25	7,50	13,50	—
14 " "	3	67,90	61,71	63,46
" " "	6	25,00	38,87	41,48
" " "	10	34,20	26,67	22,35
" " "	15	8,30	12,67	12,66
" " "	20	15,50	—	—
" " "	25	11,60	12,35	12,00
" " "	35	—	11,42	—
" " "	41	—	—	13,27
24 " "	3	62,99	68,83	65,56
" " "	6	51,32	52,22	—
" " "	10	52,80	—	20,89
" " "	15	12,89	—	15,95
" " "	20	9,07	14,34	13,52
" " "	25	10,92	17,54	—

TABLA N.º 2

Variaciones en la fracción grasa no volátil y soluble en tolueno.—(a) = referido a 100 gr. de peso fresco; (b) = referido a peso seco a 105°C; (c) referido a peso seco calculado

edad en días	Fotoperiodo								
	0 horas luz			14 horas luz			24 horas luz		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
0	31,32	47,14	41,13	—	—	—	—	—	—
3	28,59	42,49	39,72	18,46	27,18	29,91	26,29	42,13	38,25
6	16,61	39,84	33,52	11,33	44,33	29,15	20,27	39,50	35,46
10	14,90	35,50	34,91	5,46	15,98	20,49	15,29	28,95	—
15	4,21	28,06	15,82	0,47	5,61	3,67	0,54	5,17	—
20	0,49	5,08	4,13	—	—	—	0,57	6,39	4,05
25	—	—	—	0,48	4,15	3,90	0,83	7,62	4,74
35	—	—	—	0,41	—	3,55	—	—	—

TABLA N.º 3

Contenido en clorofila (a+b) de las plántulas de *P. pinaster* en función de la edad y fotoperíodo.—(a) mgrs. de clorofila referido a 100 grs. de plántulas frescas; (b) ídem referido a peso seco obtenido por secado a 105°C; (c) ídem referido a peso seco calculado

edad en días	Fotoperíodo								
	0 horas luz			14 horas luz			24 horas luz		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
3	2,0	4,8	4,0	0,3	0,4	0,5	0,5	0,8	0,7
6	2,0	4,8	4,0	4,8	18,3	11,4	2,8	5,4	5,3
10	9,9	23,7	23,3	22,6	66,0	86,6	28,3	53,54	—
15	17,1	114,2	64,4	46,0	553,7	362,5	74,4	577,0	—
20	28,5	249,8	241,5	56,0	361,3	—	80,3	885,7	560,2
25	23,3	311,0	172,8	52,0	448,4	421,4	—	—	—
35	—	—	—	53,6	—	469,8	—	—	—

TABLA N.º 4

Consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono en plántulas de *P. pinaster* en función de la edad y fotoperíodo.—Expresado en micro-litros/gr. material fresco. Plántulas enteras

edad en días	Fotoperíodo								
	0 horas luz			14 horas luz			24 horas luz		
	XO ₂	XCO ₂	C.R.	XO ₂	XCO ₂	C.R.	XO ₂	XCO ₂	C.R.
0	113,6	144,7	1,27	—	—	—	—	—	—
3	134,9	284,7	2,11	213,4	319,0	1,49	113,3	144,7	1,42
6	466,1	570,2	1,22	388,9	273,6	0,70	390,8	462,9	1,18
10	603,2	670,5	1,11	350,5	414,9	1,18	450,8	421,2	0,93
15	362,3	383,2	0,89	302,1	331,0	1,09	372,2	344,3	0,92
20	193,2	161,9	0,83	366,1	249,9	0,93	276,3	248,9	0,90
25	44,3	54,7	1,23	240,6	250,8	1,04	—	—	—

TABLA N.º 5

Aumento (o disminución) del residuo seco (fracción soluble en tolueno, y fracción insoluble) en función de la edad de la plántula (*P. pinaster*) y fotoperíodo. Expresado en grs. % de material fresco

edad en días	Fotoperíodo					
	0 horas luz		14 horas luz		24 horas luz	
	sol. tolueno	insol. tolueno	sol. tolueno	insol. tolueno	sol. tolueno	insol. tolueno
3	— 2,73	— 1,41	—12,46	— 1,56	— 5,03	— 2,29
6	—11,98	— 0,45	— 7,13	—15,69	— 6,02	—10,57
10	— 1,71	— 5,17	— 5,87	— 6,35	— 4,98	— 7,04
15	—10,69	— 5,39	— 4,99	— 9,01	—14,75	+ 0,55
20	3,72	—11,07	+ 0,05	— 1,56	+ 0,03	—11,67
25	— 0,07	+ 1,76	— 0,04	+ 1,21	+ 0,26	+ 2,94

TABLA N.º 6

Contenido en esencia total, y en sus principales componentes, de plántulas de *P. pinaster*, en función de la edad y fotoperíodo (en microlitros/100 grs. de peso seco)

edad en días	Fotoperíodo								
	0 horas luz			14 horas luz			24 horas luz		
	total	a-pin.	b-pin.	total	a-pin.	b-pin.	total	a-pin.	b-pin.
0	1,24	1,05	0,19	1,24	1,05	0,79	1,24	1,05	0,19
3	1,25	1,15	0,10	3,53	1,00	0,16	0,83	0,76	0,07
6	1,34	0,96	0,37	2,00	1,88	0,12	0,42	0,34	0,08
10	2,80	1,29	1,51	3,51	1,51	2,00	2,90	1,32	1,58
15	7,84	2,86	4,94	61,10	21,38	36,66	91,72	30,72	61,00
20	36,22	12,71	21,22	65,85	22,06	41,48	146,97	52,17	75,54
25				62,34	20,60	39,52	253,30	90,43	141,34
35				31,89	11,99	19,54			
40				38,13	15,32	22,04			
50				98,20	37,31	53,71			
60				116,42	47,03	63,56			
70				128,90	63,53	53,95			
90				230,68	122,67	92,70			

TABLA N.º 7

Composición relativa de los diferentes componentes de la esencia, en plántulas de *P. pinaster* y en función de la edad y fotoperíodo

componente y fotoperíodo	edad en días												
	0	3	6	10	15	20	25	35	40	50	60	70	90
0 horas luz:													
α-pineno	84,6	92,0	72,0	46,0	36,5	35,1	40,0						
β-pineno	—	—	—	—	—	1,6	1,0						
moneno	—	—	—	—	—	1,6	1,2						
α-pineno	15,3	8,8	28,0	54,0	63,0	58,6	57,8						
pinoleno	—	—	—	—	—	—	—						
careno	—	—	—	—	—	0,3	0,4						
felandreno	—	—	—	—	—	—	—						
14 horas luz:													
α-pineno	84,6	84,6	94,0	43,0	35,0	33,5	35,0	37,6	40,2	38,0	40,4	49,6	53,2
β-pineno	—	—	—	—	2,9	1,4	0,7	0,7	0,6	2,5	1,6	2,6	1,3
moneno	—	—	—	—	1,7	1,0	1,5	0,2	0,4	1,6	1,6	2,7	1,3
α-pineno	15,3	15,4	6,0	59,0	60,0	63,0	63,5	61,3	57,8	54,8	54,6	41,7	40,2
pinoleno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
careno	—	—	—	—	0,8	0,9	1,0	0,2	0,3	0,6	0,4	0,5	2,6
felandreno	—	—	—	—	—	—	—	—	0,3	1,6	1,6	2,7	1,4
24 horas luz:													
α-pineno	84,6	92,0	81,0	45,4	33,5	35,5	35,7						
β-pineno	—	—	—	—	0,4	2,1	1,3						
moneno	—	—	—	—	—	3,7	2,3						
α-pineno	15,3	8,0	10,9	54,5	66,5	51,4	55,8						
pinoleno	—	—	—	—	—	5,0	3,9						
careno	—	—	—	—	—	1,3	1,3						
felandreno	—	—	—	—	—	0,9	0,7						

2.2.3.—Influencias de los macronutrientes sobre el desarrollo de plántulas de *P. Pinaster*.—Cultivos hidropónicos.

TABLA N.º 1

Contenido en clorofila (a+b) de plántulas de *P. pinaster* cultivadas en diferentes medios. Colección de las muestras a los 3 y 6 meses (en mgrs./100 grs. de peso fresco)

	Tratamientos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
% peso fresco:										
3 meses	126,9	115,2	91,9	94,0	85,0	78,5	110,3	84,2	106,6	110,6
6 meses	93,5	115,2	38,7	63,5	59,4	103,8	127,1	114,2	113,3	115,2
% peso seco:										
3 meses	868,4	771,2	638,2	628,1	415,7	397,7	675,7	614,4	742,7	682,7
6 meses	516,4	596,7	241,8	352,1	334,4	568,1	561,2	610,5	609,8	618,5

TABLA N.º 2

Producción de esencia total por plántulas de *P. Pinaster* cultivadas en medios hidropónicos.—Expresado en microlitros/100 plántulas

	Tratamientos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3 meses:										
Media	35	47	53	65	91	70	73	89	89	38
e. %	8,6	6,2	3,2	8,0	14,1	7,8	4,9	5,5	1,2	5,0
6 meses:										
Media	366	471	440	407	424	557	573	468	547	347
e. %	12,7	9,8	5,7	3,0	5,9	10,2	5,8	8,6	7,1	11,7
Media	782	668	333	529	1.107	1.149	548	812	783	360
e. %	12,4	4,6	1,7	3,0	1,2	2,9	14,5	4,6	3,0	6,1

TABLA N.º 3

Composición relativa de los componentes de la esencia de plántulas de *P. pinaster* cultivadas en medios hidropónicos.—Colección de muestras a los 3,6 y 9 meses.

	Tratamientos.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
beta-pineno:										
3 meses, Media	26,8	23,6	20,1	19,8	22,7	24,7	24,3	24,8	24,1	23,6
e. %	3,3	8,0	5,6	6,9	7,1	15,9	8,9	4,4	6,6	12,9
6 meses, Media	14,8	18,6	22,5	19,5	18,4	25,4	15,2	18,2	17,8	18,1
6 meses, Media	14,8	18,6	22,5	19,5	18,4	25,4	15,2	18,2	17,8	18,1
e. %	16,3	13,3	11,5	14,2	14,5	23,5	11,2	14,5	3,5	25,5
9 meses, Media	29,2	21,6	21,5	30,6	15,8	21,5	18,1	23,2	19,9	24,7
e. %	13,3	15,8	8,7	10,8	18,3	8,1	17,2	16,5	7,1	6,4
gamma-pineno:										
3 meses, Media	1,6	2,0	1,4	1,9	1,6	2,2	2,3	1,6	1,8	1,2
e. %	25,0	5,0	5,7	11,6	6,9	19,1	17,4	37,5	12,2	32,5
6 meses, Media	2,4	1,9	2,5	2,0	2,5	2,3	1,0	0,9	1,3	1,1
e. %	16,2	8,4	4,4	8,0	16,8	6,9	44,0	46,6	22,3	9,9
9 meses, Media	3,2	3,0	2,6	2,5	1,9	2,6	2,6	2,4	3,1	2,3
e. %	16,8	11,3	8,4	1,6	45,2	13,9	3,8	3,7	10,0	5,2
limoneno:										
3 meses, Media	2,0	1,9	1,5	1,8	2,1	1,6	1,7	1,6	1,3	0,9
e. %	0,5	23,5	14,3	23,4	28,2	10,0	13,0	15,2	15,4	7,9
9 meses, Media	2,3	1,1	1,7	1,5	1,3	1,5	1,4	1,8	1,6	1,5
e. %	26,1	13,7	12,5	11,2	4,6	24,3	23,3	26,4	13,4	9,7
9 meses, Media	1,5	0,9	1,8	1,7	1,1	1,7	1,3	1,6	1,0	1,3
e. %	8,7	34,7	4,9	14,6	7,9	23,3	12,3	7,6	15,1	17,5
alfa-pineno:										
3 meses, Media	60,8	63,2	64,4	66,6	66,1	66,6	67,9	69,4	62,7	69,7
e. %	4,3	5,4	3,6	2,7	5,9	2,8	3,3	2,2	5,4	0,2
6 meses, Media	73,9	74,1	67,5	70,7	74,2	67,1	79,0	70,6	71,9	73,3
e. %	2,2	2,5	2,2	4,8	4,9	10,0	4,1	4,1	3,4	5,6
9 meses, Media	68,8	67,1	72,6	63,3	70,2	65,7	73,7	69,7	71,4	70,9
a. %	5,2	6,6	2,2	5,6	3,1	5,2	5,3	5,0	3,7	3,2
terpinoleno:										
3 meses, Media	1,2	1,5	1,4	0,8	0,9	0,7	0,5	0,6	1,2	0,7
e. %	48,3	36,2	42,8	30,4	30,5	10,1	21,6	32,6	49,6	23,8
6 meses, Media	0,9	0,6	0,8	0,8	0,5	0,8	—	0,5	0,6	0,8
e. %	10,5	6,4	28,7	47,2	31,4	44,0	—	20,7	23,7	56,7
9 meses, Media	0,3	0,9	0,3	0,5	1,3	1,2	0,9	0,5	0,6	0,9

3-careno:

3 meses, Media	4,1	7,5	7,1	5,3	6,7	3,3	2,0	2,0	7,8	6,2
e. %	13,4	68,1	47,5	35,3	35,9	44,2	39,0	—	57,6	—
6 meses, Media	6,4	3,7	4,7	5,8	2,6	5,0	2,7	11,4	4,1	1,1
e. %	30,7	33,2	50,0	46,7	71,4	—	47,0	13,6	53,7	—
9 meses, Media	4,7	3,6	—	—	6,8	11,8	5,9	1,8	8,0	2,1
e. %	—	90,3	—	—	50,9	27,8	—	26,6	38,7	42,3

beta-felandreno:

3 meses, Media	1,2	1,5	0,9	1,2	1,0	1,3	1,1	1,0	1,2	0,7
e. %	0,5	21,3	9,0	17,9	23,8	1,6	7,2	8,2	9,0	28,0
6 meses, Media	1,2	0,8	1,5	1,0	1,1	1,2	1,0	1,0	1,2	1,0
e. %	31,6	10,1	6,6	11,9	4,5	14,4	29,1	70,0	21,8	14,3
9 meses, Media	0,8	0,8	1,1	1,0	1,9	0,8	1,3	1,0	1,2	1,4
e. %	11,1	3,9	7,9	12,4	1,6	15,3	47,9	21,0	17,7	4,8

TABLA N.º 4

Media general de la tabla anterior.

	Según la edad de la muestra:		
	3 meses	6 meses	9 meses
beta-pineno	23,4	18,8	22,4
sabineno	1,8	2,3	2,6
limoneno	1,6	1,6	1,4
alfa-pineno	65,7	72,2	69,3
D3-careno	5,2	4,7	5,9
terpinoleno	0,9	0,7	0,8
terpinoleno	0,9	0,7	0,8
beta-felandreno	1,1	1,1	1,1

Según el tratamiento:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
beta-pineno	23,6	21,2	21,3	23,3	18,8	23,8	19,2	22,0	19,9	22,1
sabineno	2,4	2,3	2,1	2,1	2,0	2,3	1,9	1,6	2,0	1,5
limoneno	8,0	1,3	1,6	1,7	1,5	1,6	1,4	1,7	1,3	1,2
alfa-pineno	67,8	68,1	68,1	70,1	66,4	73,5	69,9	68,6	66,8	71,3
D3-careno	5,0	4,9	3,9	3,7	5,3	6,7	3,5	5,0	6,6	3,1
terpinoleno	0,8	1,0	0,8	0,7	0,9	0,9	0,5	0,6	0,8	0,8
beta-felandreno	1,0	1,0	1,2	1,0	1,3	1,2	0,9	1,1	1,1	1,9

TABLA N.º 5

Proporción óptima entre nutrientes en la solución hidropónica. Expresado en porcentajes de la dosis total. NO_3^- ; SO_4 /2 ; K ; Ca/2 ; Mg/2 ; $\text{PO}_4/3$

	Tratamientos						an./cat.
	N	aniones			cationes		
		S	P	K	Ca	Mg	
esencia total:							
3 meses	13	19	16	15	19	18	0,92
6 "	14	19	16	15	17	19	0,96
9 "	20	15	11	10	23	21	0,85
para alfa-pineno:							
3 meses	12	25	17	18	18	20	0,92
6 "	15	18	15	14	18	20	0,92
9 "	25	15	11	10	23	21	0,85
para beta-pineno:							
3 meses	14	15	18	13	19	21	0,89
6 "	12	20	19	14	16	19	1,04
9 "	23	13	12	15	17	20	0,92

2.2.4.—Análisis de los componentes terpénicos en ejemplares adultos de varias especies del género *pinus*.

TABLA N.º 1

Aplicación de la cromatografía en capa fina a la fracción volátil de plántulas y hojas y ramas de *P. pinaster*.—Adsorbente = Silicagel G; Fase móvil = benceno/etanol.

Patrones y muestras	Rf. de las manchas						
alfa-pineno			0,41	0,50	0,58	0,78	0,89
beta-pineno					0,58	0,78	0,89
limoneno							0,87
terpinoleno		0,16	0,41	0,50	0,58	0,67	
plántula 19 días	0,08		0,32	0,50	0,58	0,65	0,79
pino adulto	0,04		0,41	0,54		0,65	0,79
trementina				0,54		0,64	0,79

TABLA N.º 2

Análisis de la fracción volátil de ramas y hojas de *P. pinaster adulto* por cromatografía gaseosa

pico número	componente identificado	Rf con respecto al alfa-pineno		
		columna DC-550	columna "R"	columna Carbowax 20 M
2	alfa-pineno	1,00	1,00	1,00
2	sabineno	1,16	1,26	—
3	beta-pineno	1,28	1,29	1,54
4	D3-careno	1,36	1,44	—
5	limoneno	1,48	1,66	2,00
6	beta-felandreno	1,74	1,77	2,42
7	terpinoleno	1,92	2,10	2,84
8	no identificado	5,00	2,70	4,73
9	"	8,30	4,88	7,05
10	" "	8,80	9,81	11,15
11	" "	11,20	—	13,15
12	" "	13,10	—	16,00
13	" "	—	—	18,90

TABLA N.º 3

Análisis por cromatografía en capa fina de los ácidos resínicos de hojas y ramas de *P. pinaster adulto* y purificados por varios métodos: (1) por precipitación con ciclohexilamina; (2) tratado con alcohol y carbón activo; (3) tratado con éter y carbón activo; (4) extraída directamente con acetona y tratada con carbón activo; (A) Rf según ANDERSON y cols.; (B) Rf obtenidos por nosotros

A	B				componente identificado
	1	2	3	4	
0,25	0,27	0,27	—	—	sandaracopimarato
0,36	0,34	0,34	0,34	—	isopimarato
0,43	0,41	0,41	0,41	0,41	levopimarato/palustrato
0,48	0,49	0,49	0,49	0,49	lambercianato
0,52	—	—	—	—	pimarato
0,56	—	—	—	—	abietato
0,61	0,62	0,62	0,62	0,62	dehidroabietato
0,65	0,68	0,68	—	—	neobietato

TABLA N.º 4

Análisis por cromatografía gaseosa de la fracción soluble en tolueno de hojas y ramas de *P. pinaster* adulto: (A) tiempos de retención relativos según ANDERSON y cols.; (B) ídem obtenidos por nosotros

A	B	componente identificado
0,43	0,43	araquidato (patrón)
—	0,86	X
1,00	0,98	pimarato
1,13	1,11	sandaracopimarato
1,33	1,36	levopimarato/palustrato
1,45	1,43	isopimarato
2,06	—	abietato
2,15	2,17	dehidroabietato
2,29	—	neoabietato
2,32	2,38	lambercianato
	2,83	Y

TABLA N.º 5

Composición de la miera recogida de incisiones hechas a diferentes alturas en árboles de *P. pinaster* (Pinar da "La Peza")

pino	altura	fecha	componentes				
			a-pineno	sabineno	b-pineno	limoneno b-felan-dreno	
3	1,5 m.	reciente	98,60	0,80	0,60	—	—
	1,5 "	2.º día	97,80	0,90	1,20	—	—
	2,0 "	reciente	98,40	0,80	0,80	—	—
	2,0 "	2.º día	98,50	0,80	0,70	—	—
6	1,5 "	reciente	75,10	1,00	20,90	1,65	1,23
	1,5 "	2.º día	76,14	0,75	21,20	1,13	0,70
	2,0 "	reciente	78,90	0,80	18,06	0,80	0,53
	2,0 "	2.º día	78,17	0,65	19,50	1,00	0,65

TABLA N.º 6

Composición de la miera recogida en diferentes tiempos después de la incisión.
P. pinaster de 6 años de edad (Pinar de "La Peza")

pino número	días	componentes			
		alfa-pineno	sabineno	beta-pineno	limoneno
2	0	97,69	0,46	1,40	0,46
	15	96,40	0,60	1,97	0,72
	30	96,25	0,65	2,70	0,25
3	0	90,60	6,60	3,00	—
	15	92,50	4,49	3,00	—
	30	92,50	3,80	3,45	0,50
4	0	97,54	0,70	1,05	0,70
	15	98,30	0,38	1,32	—
	30	96,30	0,95	2,10	0,63
6	0	80,80	0,80	17,56	0,80
	15	80,87	0,51	18,50	0,12
	30	82,70	0,50	16,50	0,40
10	0	79,70	0,48	19,10	0,71
	15	82,50	0,15	19,50	0,15
	30	81,80	0,30	19,05	0,55
12	0	74,69	2,48	22,22	0,61
	15	78,59	0,30	21,01	0,10
	30	74,83	0,57	24,01	0,50

TABLA N.º 1

Composición relativa a la esencia de hojas, ramas y miera de *P. pinaster*
(Pinar de "La Peza")

pino número	parte	c o m p o n e n t e s						
		b pineno	sobineno	felandre	limoneno	α-pineno	D-cereño	terpino
1	hoja	7,55	5,23	2,09	1,96	76,23	6,19	0,70
	rama	3,28	1,15	1,05	1,13	68,16	23,25	1,20
	miera	3,27	0,27	—	0,27	96,14	—	—
2	hoja	2,32	7,54	—	3,86	74,27	11,60	0,39
	"	2,73	8,71	—	3,75	71,81	12,63	0,37
	rama	3,46	15,50	0,94	0,63	53,40	23,95	2,10
3	hoja	4,63	16,93	3,41	3,64	66,80	1,13	3,41
	"	3,28	16,60	2,16	5,25	67,16	0,60	3,06
	rama	4,66	19,03	1,12	1,00	74,07	0,60	0,20
4	hoja	3,50	12,24	0,20	3,30	63,41	18,90	0,43
	"	3,93	9,69	0,58	2,74	61,35	20,11	1,56
	rama	4,48	20,00	0,74	0,74	53,11	19,60	1,33
5	hoja	10,73	7,15	4,58	8,94	65,99	—	3,53
	rama	4,83	16,60	3,21	18,25	56,75	—	0,33
	miera	20,95	2,85	—	1,08	75,10	—	—
6	hoja	19,74	4,26	+	8,12	63,38	+	3,65
	"	24,10	4,87	+	8,93	60,26	+	1,85
	rama	26,32	11,24	—	12,37	49,50	—	—
7	hoja	30,73	7,4	0,68	11,73	48,16	+	0,28
	rama	23,12	18,37	0,50	18,00	40,50	—	0,20
	miera	15,00	4,17	—	4,96	76,12	—	—
8	hoja	3,90	15,56	2,19	3,12	74,33	0,78	—
	rama	4,25	26,58	0,53	2,06	66,27	0,29	—
	miera	3,24	2,74	0,75	0,74	92,79	—	—
9	hoja	19,18	1,23	0,99	1,85	76,73	—	—
	rama	21,67	3,77	1,15	2,11	60,82	—	—
	miera	19,55	0,91	—	1,21	78,32	—	—
10	hoja	35,81	7,76	1,72	4,31	48,66	0,21	1,29
	"	31,81	9,26	2,14	3,22	51,14	1,07	1,07
	rama	25,60	20,94	1,29	1,72	50,43	0,10	—
11	hoja	25,13	18,35	1,10	1,10	54,01	0,30	—
	hoja	5,07	5,07	3,17	8,15	77,58	—	—
	ramas	8,29	5,64	0,86	2,89	82,30	—	—
12	miera	2,88	1,58	—	0,70	94,80	—	—
	hoja	18,42	20,26	1,10	3,22	54,05	—	2,95
	"	22,94	17,20	1,43	4,78	50,76	—	2,86
12	rama	21,77	16,70	0,80	3,18	56,92	—	0,62
	"	23,31	16,55	0,45	0,79	58,45	—	0,22

TABLA N.º 8

Composición relativa de la esencia de hojas y ramas de diferentes especies del género *Pinus*. (H = hojas; R = ramas)

		b-pine	sabine	canfeno	limone	a-pine	terpin	D-care	b-felan	p-cime
<i>P. pinaster:</i>										
A)	H	19,01	7,72	1,54	6,59	44,35	2,78	11,12	—	6,45
	R	5,64	14,74	1,92	8,29	42,82	3,58	20,00	—	3,07
B)	H	4,40	15,09	1,25	9,43	56,60	+	13,20	—	+
	R	9,40	17,42	5,46	7,09	44,90	+	15,50	—	+
C)	H	21,79	8,95	1,69	5,08	59,07	+	0,72	—	2,66
	R	12,00	18,45	2,68	3,76	60,21	+	2,50	—	0,71
D)	H	24,07	15,47	1,47	4,91	54,01	+	+	—	+
	R	17,93	25,23	2,29	2,18	52,34	+	+	—	+
E)	H	29,01	13,98	+	+	44,04	3,10	7,25	—	2,53
	R	19,24	6,69	+	+	62,76	+	11,29	—	+
<i>P. contorta:</i>										
A)	H	22,87	7,84	—	2,68	7,55	8,85	—	50,18	—
	R	19,08	11,87	—	2,37	6,83	11,11	—	48,71	—
B)	H	2,30	5,00	—	+	4,61	4,61	6,15	77,36	—
	R	2,89	7,24	—	4,04	4,62	9,24	6,06	65,89	—
<i>P. laricio:</i>										
A)	H	26,13	1,89	2,27	4,54	58,14	—	3,03	3,97	—
	R	10,10	2,02	3,03	6,06	78,78	—	—	—	—
B)	H	24,82	5,20	4,25	2,12	61,56	—	—	2,12	—
	R	16,87	2,20	4,15	4,88	71,88	—	—	+	—
<i>P. canariensis:</i>										
A)	H	30,82	—	—	29,10	28,60	—	11,44	—	—
	R	55,23	1,93	+	18,89	14,72	—	9,68	—	—
<i>P. halepensis:</i>										
A)	H	—	34,40	—	4,40	33,60	19,40	6,20	—	2,80
	R	—	61,30	—	2,10	27,50	1,80	6,80	—	+
B)	H	—	25,92	—	6,90	30,13	23,77	11,11	—	2,14
	R	—	47,99	—	1,39	30,19	2,29	18,14	—	+
C)	H	—	42,35	—	4,30	26,70	22,50	3,50	—	0,86
	R	—	42,49	—	5,70	30,03	14,31	2,56	—	4,80
<i>P. pinea:</i>										
A)	H	1,29	4,32	—	87,66	6,70	—	—	—	—
	R	1,29	5,16	—	80,87	12,66	—	—	—	—
B)	H	1,46	4,93	—	87,76	5,85	—	—	—	—
	R	1,31	6,10	—	78,77	13,82	—	—	—	—

P. jeffreyi:

A)	H	14,40	—	5,00	8,50	66,40	—	2,90	—	4,40
	R	18,70	—	5,00	7,30	63,60	—	+	—	5,20
B)	H	15,20	—	5,40	13,16	55,97	0,06	4,38	—	5,29
	R	23,30	—	3,48	9,26	36,96	1,09	10,08	—	8,17
C)	H	18,10	—	9,05	12,93	51,72	—	—	—	8,18
	R	18,38	4,48	6,72	7,39	49,77	—	4,26	—	8,96
D)	H	38,99	4,11	1,30	16,90	27,19	0,80	—	—	10,50
	R	24,13	4,36	1,31	25,28	18,13	0,70	+	—	26,07

P. ponderosa:

A)	H	31,31	3,84	—	7,32	8,24	14,28	34,98	—	—
	R	55,15	4,33	—	2,89	10,80	1,92	24,87	—	—
B)	H	37,14	6,78	—	9,64	20,17	3,92	16,60	—	—
	R	69,66	3,57	—	2,80	7,86	2,80	12,48	—	—
C)	H	12,10	6,31	—	11,05	22,63	2,34	45,78	—	—
	R	24,88	3,55	—	9,33	32,00	1,33	28,88	—	—

P. sylvestris:

A)	H	15,70	—	5,00	1,70	54,30	1,30	16,20	—	4,70
	R	39,30	—	0,10	10,00	23,50	2,20	23,09	—	—
B)	H	2,55	2,55	3,40	1,70	87,21	—	—	—	2,55
	R	2,90	1,46	+	10,25	86,00	—	—	—	—
C)	H	3,24	2,31	2,31	6,94	85,18	—	—	—	—
	H	7,01	4,38	3,50	14,32	70,76	—	—	—	—
D)	H	11,20	7,04	17,18	6,40	58,16	—	—	—	—
	R	7,37	2,55	2,41	3,68	83,98	—	—	—	—

TABLA N.º 9

Variaciones estacionales de los componentes de la fracción volátil de hojas y ramas de diferentes especies del género *Pinus* (y un *Cedrus*)

	octu.	novi.	dici.	enero	febr.	marzo	abril	mayo	junio	julio	agos.	sept.
A L F A — P I N E N O												
<i>pinæa:</i>												
hojas: A				—	9,40	9,14	6,18	5,01	7,07	6,70	—	11,06
B					5,44	7,26	6,97	8,47	11,21	10,00	8,02	15,11
ramas: A	7,62		8,89	4,95	5,30	7,30	8,42	18,47	14,14	6,86	9,62	8,76
B	13,41	41,03	10,25	9,09	9,64	10,92	8,37	7,42	9,20	6,86	9,86	16,13
<i>maritima:</i>												
hojas: A	77,47	79,52	83,20	76,91	79,05	76,38	72,58	66,25	61,20	81,45	80,24	65,93
B	86,19	91,47	86,65	85,57	85,38	85,96	87,02	87,50	84,52		91,13	83,87
ramas: A	81,10	88,14	81,18	84,49	84,63	86,05	88,01	72,47	80,97	64,50	86,52	76,51
B	85,22	90,49	89,19	83,90	90,58	86,08	87,41	90,54	90,37		80,50	24,74
<i>sylvestris:</i>												
hojas: A	26,74	22,22	21,12	24,33	27,38	24,70	25,47	24,51	25,49	25,75	47,13	27,63
B	32,69	32,98	27,16	26,17	31,57	31,88	37,36	30,03	29,67	28,74	30,71	37,82
ramas: A	19,42	28,95		28,25	33,59	27,24	22,67	32,05	32,60	21,30	28,80	29,14
B	30,00	28,05	37,91	33,91	33,04	32,82	36,43	34,08	34,03	33,42	42,00	31,79
<i>resinosa:</i>												
hojas: A	41,36	52,24	60,63	47,96	52,88	57,86	50,46	44,14	51,05	51,29	46,71	51,43
B	49,92	69,95	60,51	54,59	56,10	55,65	51,01	49,00	51,09	58,37	50,69	48,67
ramas: A	35,17	27,68		30,59	37,58	28,44	40,14	32,00	33,92	32,97	31,34	28,43
B	25,04	89,82	23,18	33,46	30,55	27,45	26,52	28,48	81,70	32,66	29,33	29,58
<i>pinaster:</i>												
hojas: A	43,65	74,61		63,74	61,27	62,78	56,98	75,98	55,90	62,50	61,00	61,88
B	69,50	71,37	70,97	66,82	69,12	84,61	73,42	76,53	76,75	69,73	76,84	76,27
ramas: A	68,56	65,64	56,45	61,35	68,59	67,98	68,78	55,24	62,91		57,92	60,70
B	63,00		66,19	65,35	75,27	58,66	67,58	68,96	56,81		66,32	72,48
<i>Cedrus Atlántica:</i>												
hojas: A				30,31	36,96	25,72	36,36	31,64	45,70	43,30	13,58	33,33
B				30,95	30,94	29,56	30,00	37,55	32,18	30,92	39,55	36,92
ramas: A				36,84	38,76	44,95	43,41	44,11	52,80	48,33	44,55	41,81
B				33,41	53,08	46,77	41,09	45,23	47,60	56,13	61,16	43,61
C A N F E N O												
<i>maritima:</i>												
hojas: A	1,72	0,29	0,26	0,88	1,00	0,92	0,76	1,78	+	+	+	1,73
B	2,02	0,25	0,70	0,72	1,13	1,11	1,05	1,17	1,17		+	+
ramas: A	1,69	0,44	1,66	1,47	1,00	1,44	1,49	3,97	1,46	1,60	2,69	2,82
B	1,41	1,09	0,93	2,32	1,76	1,84	2,61	3,05	1,06		+	2,11

P. sylvestris:

Hojas:	A	12,70	12,97	11,94	16,40	12,46	13,70	11,03	13,45	1,41	13,58	15,57	14,4
	B	13,51	16,28	12,96	12,41	12,62	12,09	13,93	13,08	25,03	10,81	18,48	15,2
Ramas:	A	0,70	0,24		0,89	0,55	0,35	0,45	0,50	0,11	0,23	—	1,2
	B	0,18	2,48	0,12	0,39	—	+	0,17	0,52	4,13	—	9,68	+

P. pinaster:

Hojas:	A	—	—		0,39	—	—	0,11	—	+	—	+	—
	B	2,00	0,36	—	0,47	—	—	—	—	+	+	+	—
Ramas:	A	1,77	1,36	1,90	1,67	1,10	1,72	1,94	1,55	1,10		2,13	3,1
	B	—		3,03	2,77	1,69	6,40	2,61	2,38	3,47		—	3,5

Cedrus atlántica:

Hojas:	A				2,63	0,28	—	0,89	1,31	+	—	—	—
	B				0,50	1,76	—	1,47	1,25	0,56	1,00	—	—
Ramas:	A				0,16	0,18	—	—	—	—	—	—	—
	B				0,37	0,22	—	—	—	—	—	—	—

B E T A — P I N E N O

P. pinea:

Hojas:	A					1,70	7,71	3,71	5,66	4,38	4,27		
	B					1,71	4,32	2,21	4,62	4,88	3,21	7,31	2,1
Ramas:	A	2,48		1,34	0,74	0,79	1,21	1,74	2,55	3,13	1,79	0,46	+
	B	2,43	5,77	2,95	2,57	2,41	2,95	2,01	2,47	3,11	1,88	1,81	3,1

P. laricio:

Hojas:	A	15,47	14,38	15,20	15,82	15,38	17,28	20,43	24,15	28,68	13,49	15,44	23,1
	B	2,69	2,50	3,87	6,30	6,07	3,47	4,48	3,16	4,80		2,86	6,1
Ramas:	A	4,51	3,35	4,44	4,87	4,79	3,98	3,55	7,02	6,58	12,41	3,70	6,1
	B	1,57	1,46	2,42	2,78	1,76	1,84	2,77	1,25	0,80		17,28	3,1

P. halepensis:

Hojas:	A	—	3,51	4,12	1,41	—	4,83	4,01	6,61	3,96	4,23	3,05	4,1
	B	1,70	4,41	4,58	2,92	—	4,33	4,17	5,32	4,44	3,48	5,38	4,1
Ramas:	A						3,93		2,22	2,00	1,99	1,89	—
	B	—	1,61	3,83	—	—	2,86	—	1,87	2,25	1,46	0,74	1,1

P. sylvestris:

Hojas:	A	30,45	23,25	19,58	26,40	26,06	21,31	29,68	29,00	33,42	25,19	24,22	23,1
	B	26,82	3,84	22,00	28,45	25,15	27,22	26,88	31,08	8,98	25,94	32,64	30,1
Ramas:	A	50,73	53,67		54,87	49,30	58,65	48,91	50,94	57,18	56,46	53,73	53,1
	B	48,14	3,22	62,56	49,48	53,28	52,56	47,21	4,26	49,58	51,24	52,26	51,1

P. pinaster:

Hojas:	A	16,71	18,70		24,70	28,68	24,05	28,26	21,27	32,00	25,60	27,79	24,1
	B	10,63	5,43	5,30	5,32	5,22	6,07	6,81	4,18	5,25	6,63	5,53	7,1
Ramas:	A	22,77	27,64	29,03	28,59	26,97	27,15	26,27	38,66	33,76		35,78	29,1
	B	12,41		10,32	7,39	6,54	10,28	7,44	6,10	9,78		9,18	4,1

Cedrus atlántica:

Hojas:	A			17,94	15,58	14,03	8,84	8,41	10,61	3,91	17,32	5,45
	B			6,05	15,79	20,22	25,15	19,78	21,70	17,31	38,83	24,26
Ramas:	A			17,29	11,00	17,21	7,14	5,59	8,25	10,93	18,30	5,60
	B			5,25	20,42	22,02	22,00	15,78	18,52	25,14	21,57	17,16

BETA—FELANDRENO

P. halepensis:

Hojas:	A	1,96	1,26	1,48	3,52	1,75	1,61	1,81	1,57	2,24	2,12	—	2,30
	B	1,71	6,92	2,88	1,85	1,36	1,08	2,86	1,70	1,69	1,82	1,95	4,67
Ramas:	A	—	—	—	—	—	—	—	0,45	+	+	+	+
	B	1,63	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—	2,73

C A R E N O

P. halepensis:

Ramas:	A	1,96	3,65	3,30	3,17	2,44	1,93	2,81	2,03	2,37	3,38	3,05	2,71
	B	3,64	4,71	4,58	4,00	4,08	2,92	4,74	3,40	4,57	5,57	5,38	5,09
Ramas:	A	—	0,96	—	—	—	0,30	1,43	0,74	0,80	0,79	1,83	1,68
	B	6,83	5,58	6,71	9,45	6,95	6,20	6,42	5,61	5,42	7,42	5,70	7,06

Cedrus atlántica:

Hojas:	A			0,11	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B			0,24	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ramas:	A			0,16	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B			0,21	—	—	—	—	—	—	—	—	—

T E R P I N O L E N O

P. halepensis:

Hojas:	A	15,24	16,82	19,80	18,51	19,81	22,66	19,75	21,65	20,73	21,73	15,74	18,06
	B	19,93	14,72	19,86	24,90	20,96	21,26	—	20,12	29,93	23,86	20,17	3,54

Cedrus atlántica:

Hojas:	A			1,91	—	—	—	1,57	—	—	—	—	—
	B			1,45	—	+	—	0,71	—	—	—	—	—
Ramas:	A			—	—	—	—	1,72	—	—	—	—	2,08
	B			1,91	—	—	—	1,57	—	—	—	—	—

S A B I N E N O

P. pinea:

Hojas:	A			24,74	2,50	4,28	2,47	2,75	4,38	1,62	—	4,00	
	B				3,45	3,14	6,29	1,69	4,88	4,00	3,29	2,90	
Ramas:	A	2,94		4,31	7,28	3,18	3,30	3,08	4,42	7,10	3,92	3,20	3,51
	B	6,09	10,80	3,05	4,29	3,44	3,47	3,41	3,46	2,28	2,74	3,89	2,30

<i>sylvestris:</i>													
gas:	A	2,93	8,91	5,97	4,53	5,19	5,10	5,94	8,58	5,35	8,01	5,62	4,48
	B	6,91	4,81	3,53	0,22	4,15	3,62	5,42	5,12	5,90	3,78	1,84	1,84
mas:	A	13,38	16,78		13,61	12,55	12,00	9,73	14,85	8,97	10,04	13,43	16,66
	B	22,35	—	12,31	16,65	16,08	18,41	18,93	21,85	1,96	15,75	15,88	16,09
<i>pínaster:</i>													
gas:	A	3,71	—		9,56	9,22	10,63	12,40	2,73	10,00	10,00	9,32	9,77
	B	12,29	8,69	8,85	17,18	13,38	3,23	11,53	12,56	1,05	—	7,37	6,77
mas:	A	1,56	2,27	1,31	4,68	2,88	3,18	2,14	2,12	1,66		1,82	4,79
	B	13,58		11,53	12,00	8,72	11,08	9,93	12,86	15,94		12,24	10,52
<i>drus atlántica:</i>													
gas:	A				23,80	37,35	30,70	33,44	29,06	29,71	37,41	26,73	25,45
	B				39,22	27,07	23,24	27,04	25,87	25,50	25,18	—	21,80
mas:	A				28,95	31,37	36,10	33,76	32,83	31,36	27,67	52,17	33,54
	B				35,06	30,94	27,54	24,85	26,88	29,50	30,05	24,48	25,21

TABLA N.º 10
 Media anual de los componentes de la fracción volátil de hojas y ramas de
 diferentes especies del género *Pinus* (y un *Cedrus*)

	pinea		laricio		halepensis		sylvestris		pinaster		C. atlántica	
	M	2s	M	2s	M	2s	M	2s	M	2s	M	2s
ALFA-PINENO:												
A) H	0,06	7,80	75,01	19,98	26,87	13,32	50,66	10,72	61,82	17,40	32,98	19,13
R	9,12	7,90	81,21	14,14	27,63	9,32	33,55	14,18	63,10	10,30	43,95	1,70
B) H	9,06	6,06	86,81	5,94	31,29	12,52	54,62	12,40	73,47	10,00	33,17	7,54
R	12,68	18,56	81,72	38,40	33,93	7,26	38,14	45,00	66,06	11,32	47,56	16,84
BETA-PINENO:												
A) H	3,91	5,94	18,24	3,02	3,36	3,96	25,98	8,12	24,74	9,06	11,34	10,24
R	1,48	2,22	5,46	5,02	2,00	2,50	53,47	6,46	28,74	17,86	11,03	9,62
B) H	3,78	3,76	4,22	2,90	3,74	3,10	24,15	17,70	6,15	3,32	21,01	17,50
R	2,81	2,14	3,28	9,48	1,25	2,68	43,77	38,20	8,42	4,70	18,65	11,56
LIMONENO:												
A) H	86,04	6,76	3,73	4,38	1,34	1,22	5,88	3,58	7,94	7,40	30,40	9,20
R	85,78	11,54	9,98	8,44	0,02	—	12,90	5,28	2,58	2,40	34,22	14,46
B) H	83,34	7,76	6,01	2,18	1,54	1,66	3,92	3,82	8,57	10,44	23,88	20,42
R	80,17	25,24	6,36	5,80	—	—	14,68	13,96	11,84	4,04	28,27	7,00
SABINENO:												
A) H	5,19	14,92	2,01	2,10	44,76	11,14	3,80	3,68	4,14	15,90	13,15	7,24
R	4,20	3,10	1,24	1,38	70,33	10,48	0,51	1,20	0,95	2,26	21,56	8,42
B) H	3,70	2,78	2,06	1,82	37,33	18,64	2,90	5,08	8,43	4,32	6,84	11,34
R	4,11	4,66	1,42	1,46	57,34	7,62	2,64	4,34	10,74	5,22	19,29	7,82
CANFENO:												
A) H	—	—	0,77	1,36	—	—	12,46	7,60	0,05	—	0,56	1,82
R	—	—	1,81	1,86	—	—	0,47	0,72	1,76	1,16	0,03	—
B) H	—	—	0,84	1,20	—	—	14,70	7,68	0,23	1,08	0,72	1,34
R	—	—	1,61	1,82	—	—	0,72	2,54	2,60	3,74	0,06	—
FELANDRENO:												
A) H	—	—	—	—	1,80	1,62	—	—	—	—	—	—
R	—	—	—	—	0,04	—	—	—	—	—	—	—
B) H	—	—	—	—	2,54	3,34	—	—	—	—	—	—
R	—	—	—	—	0,36	—	—	—	—	—	—	—
D3-CARENO:												
A) H	—	—	—	—	2,73	1,20	—	—	—	—	0,01	—
R	—	—	—	—	0,77	1,32	—	—	—	—	0,02	—
B) H	—	—	—	—	4,39	1,60	—	—	—	—	0,02	—
R	—	—	—	—	6,61	2,24	—	—	—	—	0,02	—
TERPINOLENO:												
A) H	—	—	—	—	19,20	4,84	—	—	—	—	0,38	—
R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B) H	—	—	—	—	18,27	17,08	—	—	—	—	0,24	—
R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,38	—

TABLA N.º 11

Media anual por especies (considerando homogéneas las muestras procedentes de hojas y ramas y los dos árboles de cada especie)

pinea		laricio		halepensis		sylvestris		pinaster		C. atlántica	
M	2s	M	2s	M	2s	M	2s	M	2s	M	2s
ALFA — PINENO											
9,48	12,34	31,06	23,42	30,01	8,26	44,47	28,12	68,28	15,20	39,53	17,54
BETA — PINENO											
2,87	3,86	7,98	14,30	2,67	3,76	36,49	32,46	16,96	23,44	15,51	15,02
SABINENO											
4,29	7,56	1,68	1,82	52,06	27,94	2,50	4,42	6,01	11,20	15,21	14,38
LIMONENO											
83,54	16,44	6,53	7,22	0,72	1,76	7,27	12,00	7,66	9,52	29,19	15,24
CANFENO											
—	—	1,27	1,78	—	—	7,23	14,62	1,10	2,84	0,34	1,24
BETA — FELANDRENO											
—	—	—	—	1,21	9,14	—	—	—	—	—	—
D3 — CARENO											
—	—	—	—	3,68	4,58	—	—	—	—	0,02	0,39
TERPINOLENO											
—	—	—	—	9,36	20,80	—	—	—	—	0,36	1,38

TABLA N.º 12

Significación de las diferencias entre las medias de distintas especies (valor de P)

		larici	halep.	sylva.	pinos.	cedrus
ALFA-PINENO:	<i>pinea</i>	0,001	0,001	0,02	0,001	
	<i>laricio</i>		0,001	0,05	0,30	0,01
	<i>halepensis</i>			0,30	0,001	0,30
	<i>sylvestris</i>				0,10	0,02
	<i>pinaster</i>					0,02
BETA-PINENO:	<i>pinea</i>	0,40	0,90	0,05	0,20	0,10
	<i>laricio</i>		0,40	0,10	0,50	0,40
	<i>halepensis</i>			0,05	0,20	0,05
	<i>sylvestris</i>				0,30	0,20
	<i>pinaster</i>					0,90
SABINENO:	<i>pinea</i>	0,40	0,001	0,70	0,70	0,20
	<i>laricio</i>		0,001	0,70	0,40	0,05
	<i>halepensis</i>			0,001	0,01	0,05
	<i>sylvestris</i>				0,50	0,05
	<i>pinaster</i>					0,30
LIMONENO:	<i>pinea</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	<i>laricio</i>		0,10	0,70	0,80	0,01
	<i>halepensis</i>			0,10	0,10	0,001
	<i>sylvestris</i>				0,80	0,001
	<i>pinaster</i>					0,02

2.2.—Experiencias con homogenados

TABLA N.º 1

Efectos de algunos activadores de grupos —SH sobre la incorporación de MVA por plántulas de *P. pinaster*.—Actividad en c.p.m. de los derivados del MVA-2-¹⁴C.
Condiciones de medida: Col. = 12; Ct. = 10; Esc. = 500; Vel. = 30

líquidos de desarrollo cromatográfico											
	P-MVA					PP-MVA			Iso-PP		
	1	2	3	4	6	1	3	6	2	3	6
Blanco	380	150	140	70	70	—	150	80	110	250	290
-SH 10 ⁻³ M	350	200	125	80	75	+	150	65	80	150	240
10 ⁻² M	14mm	10mm	360	125	150	65	400	150	200	300	15mm
st. 10 ⁻³ M	280	170	125	65	60	—	110	65	100	150	220
10 ⁻² M	13mm	500	325	230	250	50	340	110	280	260	8mm
sc. 10 ⁻³ M	240	125	140	75	85	40	150	60	75	200	200
10 ⁻² M	180	125	90	120	120	40	100	—	60	100	140
ADH 10 ⁻³ M	170	75	80	125	120	—	100	—	70	170	100
10 ⁻² M	140	150	80	100	85	—	100	—	70	75	90
ADPH 10 ⁻³ M	175	120	120	125	125	45	100	—	75	125	75
10 ⁻² M	200	120	120	75	90	+	120	—	100	125	160

TABLA N.º 2

Efecto de algunos inhibidores de grupos —SH sobre la incorporación del MVA por plántulas de *P. pinaster*. Actividad en c.p.m. de los derivados del MVA-2-¹⁴C.
Condiciones de medida: Col. = 12; Ct. = 10; Esc. = 500; Vel. = 30

líquidos de desarrollo									
	P-MVA			PP-MVA			Iso-PP	Dal-PP	
	2	4	6	1	2	6	6	6	6
blanco	90	80	90	180	60	90	125	100	
H 1,66 × 10 ⁻³	60	60	50	125	—	70	130	110	
acetamida 10 ⁻³ M	50	—	—	125	—	50	—	75	
10 ⁻² M	40	—	—	50	—	40	—	50	
10 ⁻³ M + Gl-SH 1,66 × 10 ⁻³ M	190	90	95	225	60	85	100	175	
10 ⁻² M + " "	50	—	—	100	40	50	55	70	
M.B. 10 ⁻⁵ M	75	90	65	140	50	50	—	80	
10 ⁻³ M	—	—	—	—	—	—	—	—	
10 ⁻⁵ M + Gl-SH 1,66 × 10 ⁻³ M	200	90	110	500	90	125	180	200	
10 ⁻³ M + " "	—	—	—	—	—	—	—	—	
maleimida 10 ⁻⁵ M	120	90	100	180	60	70	150	120	
10 ⁻³ M	—	—	—	—	—	—	—	—	
10 ⁻⁵ M + Gl-SH 1,66 × 10 ⁻³ M	180	100	110	250	65	80	170	150	
10 ⁻³ M + " "	90	—	—	175	45	60	90	120	

TABLA N.º 3

Efecto de la concentración de iodoacetamida sobre la incorporación del MVA por plántulas de *P. pinaster*.—Actividad en c.p.m. de los derivados del MVA-2-¹⁴C.
Condiciones de medida: Col. = 12; Ct. = 10; Esc. = 500; Vol. = 30

		líquidos de desarrollo				
		P-MVA		PP-MVA		Iso-PP
		4	6	1	6	6
Blanco		60	70	250	45	70
iodoacetamida	$0,5 \times 10^{-3}$	50	50	200	35	70
"	$1,0 \times "$	45	45	200	30	60
"	$2,0 \times "$	35	40	185	+	45
"	$5,0 \times "$	+	+	100	+	40
"	$10,0 \times "$	—	—	100	—	+

TABLA N.º 4

Cinética de la incorporación del MVA por plántulas de *P. pinaster*.—Actividad en c.p.m. de los derivados del MVA-1-¹⁴C
Condiciones de medida = a anteriores tablas

horas de incubación	líquidos de desarrollo						
	P-MVA				PP-MVA		
	1	3	4	6	1	3	4
0	—	—	—	—	—	—	—
1/2	120	100	50	170	100	170	50
1	150	75	70	160	120	130	75
3	125	125	75	220	75	125	65
5	90	100	50	100	70	75	—
7	90	70	60	100	+	—	—

TABLA N.º 5

Cinética de la incorporación del MVA por plántulas de *P. pinaster*.—Actividad en c.p.m. de los derivados del MVA-1-¹⁴C
Condiciones de medida iguales a las anteriores

horas de incubación	líquidos de desarrollo cromatográfico					
	P-MVA				PP-MVA	
	2	3	4	6	3	4
0	—	50	60	+	—	—
1/4	150	120	120	120	60	50
1/2	125	100	150	140	75	75
1	50	+	50	60	50	—
3	—	—	—	+	—	—
5	—	—	—	+	—	—
10	—	—	—	+	—	—

TABLA N.º 6

Cinética de la incorporación del MVA por plántulas de *P. pinaster*.—Actividad en c.p.m. de los derivados del MVA-2-¹⁴C
Condiciones de medida igual a las anteriores

horas de incubación	líquidos de desarrollo cromatográfico									
	P-MVA				PP-MVA			Iso-PP	X-PP	
	2	3	4	6	2	3	4	6	6	3
1/4	200	10mm	170	180	50	110	90	—	500	75
1/2	170	13mm	75	110	—	70	50	80	13mm	120
1	100	12mm	—	100	—	50	—	—	11mm	200
3	70	9mm	—	75	—	—	—	—	7mm	350
5	70	7mm	—	+	—	—	—	—	400	430
10	70	200	—	—	—	—	—	—	240	500

TABLA N.º 7

Cinética de la incorporación del MVA por plántulas de *P. pinaster*.—Actividad en c.p.m. de los derivados del MVA-2-¹⁴C
Condiciones de medida igual a las anteriores

horas de incubación	líquidos de desarrollo cromatográfico								
	P-MVA			PP-MVA			Iso-PP	X-PP	
	1	3	6	1	3	6	6	3	3
1/4	480	700	200	80	120	50	450	80	80
1/2	1.000	960	100	80	100	80	850	120	120
1	700	820	90	—	90	—	700	170	170
3	500	600	80	—	—	—	500	400	400
5	400	550	—	—	—	—	350	400	400
10	400	200	—	—	—	—	280	400	400

TABLA N.º 8

Influencia de los diferentes cofactores sobre la incorporación del acetato-1-¹⁴C por plántulas de *P. pinaster*.—Actividad de los derivados del MVA en c.p.m.
Condiciones de medida: Col. = 12; Ct. = 10; Esc. = 300; Vel. = 30

incubación	líquidos de desarrollo cromatográfico									
	P-MVA			PP-MVA			Iso-PP	Dal-PP		
	1	2	3	4	4	1	4	6	3	6
completa	270	170	125	270	110	75	50	180	135	120
ausencia de:										
CoA-SH	45	40	—	45	—	35	—	—	—	—
NADPH	90	75	60	65	60	45	—	65	60	60
Gl-SH	90	30	35	40	—	—	—	40	—	—
ácido malónico	165	150	125	210	120	45	50	150	—	80

TABLA N.º 9

Cinética de la incorporación del acetato-1-¹⁴C por plántulas de *P. pinaster*. Actividad de los derivados del MVA en c.p.m.—Consideraciones de medida igual a la anterior

horas de incubación	líquidos de desarrollo cromatográfico						
	P-MVA			PP-MVA		Iso-PP	Dal-PP
	2	3	4	3	4	6	6
0	40	—	+	+	+	—	—
1	30	80	90	60	120	90	75
3	80	70	110	60	90	105	60
7	110	75	180	140	95	130	70

TABLA N.º 10

Influencia de la adición de nucleótidos sobre la incorporación del MVA por plántulas de *P. pinaster*.—Actividad en c.p.m. de los derivados del MVA-1-¹⁴C.—Condiciones de medida iguales a la tabla anterior

	líquidos de desarrollo cromatográfico						
	P-MVA			PP-MVA			
	2	3	4	6	1	3	4
ATP 10 ⁻³ M	60	45	50	60	60	—	40
ATP 10 ⁻² M	45	45	50	60	—	30	40
ITP 10 ⁻³ M	—	—	+	—	—	—	—
ITP 10 ⁻² M	50	45	65	65	90	30	+
UTP 10 ⁻³ M	—	30	35	45	40	—	—
UTP 10 ⁻² M	35	50	60	60	50	—	—
GTP 10 ⁻³ M	—	30	—	30	—	—	—
GTP 10 ⁻² M	—	35	40	35	40	—	—
ADP 10 ⁻³ M	—	30	25	40	30	—	—
ADP 10 ⁻² M	60	50	65	80	50	20	30

TABLA N.º 11

Influencia de la adición de ADP a diferentes nucleótidos trifosfóricos en la incorporación del MVA por plántulas de *P. pinaster*. Actividad en c.p.m. de los derivados del MVA-1-¹⁴C.—Condiciones de medida idénticas a las anteriores.

	líquidos de desarrollo cromatográfico						
	P-MVA			PP-MVA			
	2	3	4	6	1	3	4
sin nucleótidos	—	—	—	—	—	—	—
ADP	60	50	65	80	50	30	20
ITP	50	45	65	65	90	30	+
ITP + ADP	50	45	50	65	60	—	40
UTP	35	50	60	60	50	—	—
UTP + ADP	60	60	50	65	70	30	30
GTP	—	35	40	35	40	—	—
GTP + ADP	65	55	60	75	75	35	45

TABLA N.º 12

Influencia de los iones Mg, Mn y del EDTA sobre la incorporación del MVA por extractos normales y dializados de plántulas de *P. pinaster*. Actividad en c.p.m. de los derivados del MVA-2-¹⁴C.—Condiciones de medida: Col. = 12; Ct. = 10; Esc. = 1.000; Vel. = 30

extracto	líquidos de desarrollo cromatográfico											
	P-MVA				PP-MVA			Iso-PP	Dal-PP		X-PP	
	2	3	4	6	1	2	3	4	2	6	6	3
normal	470	380	500	700	850	120	450	140	400	—	200	100
dializado	—	80	80	60	70	—	50	—	60	—	—	—
Con Mn ⁺⁺												
normal	400	300	200	340	630	70	40	80	200	100	230	180
dializado	—	80	50	—	50	—	—	—	60	—	—	—
con Mg ⁺⁺ :												
normal	470	450	430	600	870	110	300	140	300	70	220	120
dializado	—	100	100	130	100	—	60	—	80	—	—	—
con Mg + Mn:												
normal	340	350	180	300	570	70	130	100	180	80	220	100
dializado	—	80	50	40	60	—	50	—	60	—	—	—
Mn + Mg + EDTA:												
normal	300	700	10mm	900	800	60	150	100	440	—	100	—
dializado	—	60	—	—	+	—	—	—	50	—	—	—
con EDTA:												
normal	—	70	—	60	120	—	—	—	—	—	—	—
dializado	—	60	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

TABLA N.º 13

Incorporación del acetato y MVA por extractos de yemas de *P. pinaster* adulto. Actividad de los derivados obtenidos en c.p.m.—Condiciones de medida: Col.=12; Ct. = 10; Esc. = 300; Vel. = 30

extracto	líquido de desarrollo n.º 4; derivados			
	X(Rf=0, 22-026)	X(Rf=0,40-41)	P-MVA	MVA
normal:				
con acetato: 3 horas		55	65	—
9 "		60	70	—
con MVA: 3 horas		—	—	219
9 "		—	—	270
sin centrifugar:				
con MVA 9 horas		—	—	300
				66

TABLA N.º 14

Incorporación del MVA por yemas de *P. pinaster* adulto. Actividad de los derivados del MVA-2-¹⁴C en c.p.m. Condiciones de medida: Col. = 12; Ct. = 10; Esc. = 3.000; Vel. = 30

	líquidos de desarrollo cromatográfico												
	MVA			P-MVA			PP-MVA			Iso-PP		X	X
	1	3	4	6	3	1	3	4	3	δ	1	4	
directo:													
no destilado	600	500	2.700	2.700	2.000	—	—	300	900	1.300	800	—	
destilado	600	400	3.000	2.700	1.900	—	—	350	750	1.800	1.200	—	
centrifugado:													
no destilado	600	700	2.100	2.400	1.750	—	—	350	850	1.100	1.000	—	
destilado	1.500	2.500	3.000	2.700	—	—	—	—	—	—	—	—	
yemas trituradas:													
destilado	—	—	—	—	—	1.250	1.350	400	—	600	—	700	
dest. + trit.	450	—	—	—	—	900	1.100	400	—	400	—	700	

NOTAS A LAS TABLAS DEL APARTADO 2.2.5.

a) SIMBOLOS:

MVA	= ácido mevalónico
P-MVA	= ácido fosfomevalónico
PP-MVA	= ácido pirofosfomevalónico
Iso-PP	= isopentenil-pirofosfato
Dal-PP	= dimetil-alil-pirofosfato
Gl-SH	= glutatión reducido
Cist.	= cisteína
Asc.	= ácido ascórbico
NADH	= difosfopiridinnucleótido reducido
NADPH	= trifosfopiridinnucleótido reducido
P.H.M.B.	= para-hidroxi-mercuri-benzoato
CoA-SH	= Coenzima A
X-PP, Y-PP	= Manchas cromatográficas radiactivas sin identificar
EDTA	= ácido etilen-diamino-tetraacético.

b) CONDICIONES DE LA INCUBACION:

Tablas 1, 2 y 3.—ATP = 8×10^{-3} M; $MgCl_2$ = 4×10^{-3} M; $MnCl_2$ = 4×10^{-3} M; FNa = 10^{-2} M; MVA-2-¹⁴C; = 8×10^{-5} M (4,82 m.C/mM); a 37°C durante 3 horas.

Tabla 4.—ATP = 8×10^{-3} M; $MgCl_2$ = 4×10^{-3} M; $MnCl_2$ = 4×10^{-3} M; cisteína = 10^{-2} M; acetato-1-¹⁴C = $0,05 \times 10^{-3}$ M (16,6 microC/ml.) y MVA-1-¹⁴C = $0,133 \times 10^{-3}$ M (6,5 microC/ml.); a 37° C.

Tablas 5 y 6.—ATP = $8 \times 10^{-3}M$; $MgCl_2 = 4 \times 10^{-3}M$; $MnCl_2 = 4 \times 10^{-3}M$; FNa = $10^{-2}M$; glutation = $10^{-2}M$; tabla 5: MVA-1- $^{14}C = 0,133 \times 10^{-3}M$ (6,5 microC/ml.); tabla 6: MVA-2- $^{14}C = 0,07 \times 10^{-3}M$ (10 microC/ml.)

Tabla 7.—Igual que la 6 con diferentes condiciones de medida: 6 = Esc. = 500; 7 = Esc. = 1.000.

Tablas 8 y 9.—ATP, cloruro magnésico y cloruro de manganeso, igual que las anteriores; acetato-1- $^{14}C = 0,05 \times 10^{-3}M$ (16,6 microC/ml.); CoA-SH = $0,1 \times 10^{-3}M$; NADPH = $1,33 \times 10^{-3}M$; ácido malónico = $0,5 \times 10^{-3}M$; a 37°C durante 3 horas.

Tablas 10 y 11.—Cloruro magnésico y cloruro de manganeso y fluoruro sódico igual que las anteriores; glutation = $10^{-2}M$; MVA-1- $^{14}C = 0,133 \times 10^{-3}M$ (6,5 microC/ml.); a 37° C durante 30 minutos.

Tablas 12, 13 y 14.—ATP, FNa, cloruro magnésico y cloruro de manganeso igual que las anteriores; MVA-2- $^{14}C = 0,07 \times 10^{-3}M$ (10 microC/ml.); glutation = 10^{-2} ; en la 13: acetato-1- $^{14}C = 0,05 \times 10^{-3}M$ (16,6 microC/ml.); CoA-SH = $0,1 \times 10^{-3}M$; NADPH = $2 \times 10^{-3}M$; en la 14: tiempo de incubación = 6 horas en sistema cerrado.

3.—DISCUSION

3.1.—ESTABLECIMIENTO DE TECNICAS

3.1.1.—Cultivo de plántulas

Los pinos durante su crecimiento presentan una serie de etapas bien definidas morfológicamente. La primera comprende desde la germinación de la semilla hasta la aparición del epicotilo (aproximadamente un mes). Esta es la fase de plántula. Según PARDOS y MARCOS (1963) al germinar la semilla se forma el "hipocotilo" (a los 6-7 días) con 6-8 hojas cotiledonares. Pueden aparecer hasta 10 hojas cotiledonares que arrancan desde un mismo punto y permanecen unidas en sus extremos superiores por algún tiempo debido a que el piñón vacío queda como una caperuza. Las hojas cotiledonares alcanzan de 5 a 7 cm. de longitud y permanecen en la planta un año aproximadamente. Al mes de haber germinado la semilla comienza a desarrollarse el tallo "epicotilo" por encima de los cotiledones y en él aparecen las hojas primordiales, de inserción aislada y de 2 a 4 cm. de longitud. Estas hojas se disponen alrededor y a lo largo del tallo epicotilo que acaba coronado por un plumero de hojas. Las hojas primordiales constituyen la mayor parte de las hojas del primer año. En el segundo año siguen saliendo hojas primordiales pero más cortas y menos frecuentes, siendo poco a poco reemplazadas por las acículas vainadas que son las que más abundantes y comunes en el resto de la vida de la planta. La aparición del epicotilo y de las hojas que en él se insertan representa un momento perfectamente diferenciado en el desarrollo de la planta.

Nuestros primeros ensayos se orientaron hacia el establecimiento de unas condiciones adecuadas de germinación y cultivo, por lo que se procedió a ensayar semillas de *P. pinaster* de origen controlado, germinándolas en diferentes sustratos (véase tabla 2.2.1.:1) encontrando que con arena de cuarzo lavada se obtenían porcentajes de germinación idóneos y mucho más elevados que con vermiculita, por lo que todas las experiencias posteriores se realizaron con arena de cuarzo. Cuando las semillas germinadas tienen un mes de edad a veces aparecen hongos. Este peligro es mucho menor cuando se emplea la mezcla arena/tierra de jardín o el sistema de irrigación automática y en éstos la planta crece bien y continúa desarrollándose indefinidamente.

Para el estudio de la influencia de los macronutrientes en la producción de esencia se emplearon cultivos hidropónicos con irrigación automática, como se indica en el apartado 2.3.1.:c.2 y de acuerdo con el método de cambios sistemáticos de HOMÉS (1961). La composición de los medios nutritivos empleados se da en las tablas 2.2.1.:4, 5 y 6, así como la forma de preparación de estos medios.

Los tratamientos 1 y 2 representan la interacción nitrógeno/azufre; los 1 y 3 la interacción nitrógeno/fósforo y los 2 y 3 la interacción azufre/fósforo. Así se determina la proporción óptima entre aniones. De la misma forma los tratamientos 4 y 5 representan la interacción potasio/calcio; los 4 y 6 potasio/magnesio y los 5 y 6 calcio/magnesio. Así se obtiene la proporción óptima entre cationes. El tratamiento 7 mide las interacciones entre cationes y aniones, obteniéndose así la proporción óptima entre los seis macroelementos. Por otra parte el tratamiento 7, junto con el 8, 9 y 10, permite calcular la concentración óptima de la solución nutritiva.

3.1.2.—Métodos analíticos

En los primeros ensayos los resultados analíticos cuantitativos que se obtuvieron eran muy dispersos cuando se referían a 100 grs. de plántula fresca y sin embargo se hacían más homogéneos cuando se referían a 100 grs. de peso seco calculado. Este peso seco corresponde al peso del residuo que queda de la destilación de la esencia y posterior tratamiento con tolueno en el aparato de Dean-Stark que elimina el agua y disuelve los componentes grasos. La suma entre el residuo final deshidratado y la fracción soluble en tolueno corresponde prácticamente al total de materias sólidas de la plántula. La disparidad de resultados cuando se refería a peso fresco era debida a que la pesada en fresco de la plántula es falsa, pues en la recolección para quitarle la arena adherida es necesario lavarla con agua y escurrir ésta. Más siempre queda agua que no es tisular y que falsea el peso real de la plántula. Esto es bien evidente en las tablas 2.2.1.:1, 2 y 3 en las que se ve que no existe proporcionalidad entre la edad en días de la plántula y su peso seco. No se podía secar la plántula y pesarla antes de proceder a su análisis por la posible pérdida de sus componentes volátiles. De aquí, que, en general, el cálculo de los resultados se haya realizado a base del peso seco calculado o contando el número de las plántulas analizadas. En los casos en que solo se estudia la composición relativa de la fracción volátil se prescinde del peso del material analizado.

Los componentes esenciales de las piñúculas o de hojas y ramas de pino adulto pueden ser extraídos de estos materiales mediante disolventes orgánicos, pero se originan soluciones más complejas que cuando se aíslan por destilación. Por ello establecimos como método general de aislamiento la destilación en corriente de vapor utilizando el Neo-clevenger con las modificaciones que se indican en el apartado 2.1.4.:A.2 y que tiene la ventaja de que con la misma muestra se pueden obtener los componentes grasos solubles en tolueno (entre ellos los ácidos resínicos).

La fracción destilada fue analizada por diversas vías cromatográficas. La cromatografía en columna se desechó inmediatamente por no ser aplicable a la pequeña cantidad de muestra a analizar. La cromatografía en capa fina (véase tabla 2.2.1.:7) presenta una buena sensibilidad pero no tiene suficiente poder resolutivo en las condiciones ensayadas. Sin embargo su aplicación a la resolución de los ácidos resínicos fue satisfactoria.

La técnica que da mejores resultados, tanto por su poder resolutivo, como por su sensibilidad y reproducibilidad es la cromatografía gaseosa. En las tablas 2.2.1.:8, 9, 10 y 11 se incluyen los resultados obtenidos en los ensayos previos. De las varias columnas ensayadas la que mejores resultados dió fue la DC-550, que posee mayor poder resolutivo. Por consiguiente se adoptó esta columna y en las condiciones de trabajo que se exponen en 2.1.4.:D.

La identificación de los metabolitos producidos en la incubación del MVA o acetato marcados con plántulas de los esteres fosfóricos como se expone en el apartado 2.1.4.:C. Al carecer de patrones de referencia no se pudo testificar los Rf de todos los posibles intermediarios. Por ello y en general los productos de cada incubación se desarrollan con varias fases móviles y solo se da como seguro identificado, cuando los Rf de las manchas coincidan para un metabolito en las diferentes fases móviles empleadas. Los Rf de referencia para cada fase móvil se encuentran reunidos en la tabla 2.2.1.:12.

3.2.—IDENTIFICACION DE COMPONENTES

La cromatografía gaseosa de la fracción volátil de hojas y ramas de diferentes especies de pinos da un registro gráfico en el que aparecen numerosos picos con diferentes tiempos de retención. Unos son de tamaño adecuado para el cálculo cuantitativo, otros son muy pequeños e inadecuados para el cálculo. En la tabla 2.2.4.:2 se exponen los resultados en *P. pinaster*. Aparecen 13 picos medibles de los cuales se han identificado los 7 primeros que corresponden a sesquiterpenos o derivados oxigenados de los monoterpenos y que no han sido considerados en nuestro estudio. En general los componentes identificados por nosotros en una u otra de las especies ensayadas son: alfa- y beta-pineno, sabineno, limoneno D3-careno, beta-felandreno, terpinoleno, p-cimeno y n-heptano. En algunas muestras se ha observado cantidad apreciable de alfa-tujeno. Los demás componentes monoterpénicos e hidrocarburos alifáticos (mirceno, gamma-terpineno, alfa-terpineno, alfa-felandreno, n-undecano, n-nonano, etc.), reseñados en la bibliografía como componentes de las esencias, no hemos podido identificarlos en las especies ensayadas, aunque no se desecha la posibilidad de su presencia en mínimas cantidades, pues pueden corresponder a pequeños picos que aparecen con frecuencia

intercalados entre los anteriores y que descartamos por ser imposible recogerlos por "splitting" para su análisis infrarrojo. Todos los monoterpenos identificados por nosotros lo han sido por sus tiempos de retención en diversas columnas y por espectrofotometría infrarroja (comparando con soluciones patrones).

En el estudio de los ácidos resínicos se siguió la metódica de RIFFER y ANDERSON. En las tablas 2.2.2.:10 y 2.2.4.:3 y 4 se presentan los resultados obtenidos con plántulas y hojas y ramas de *P. pinaster* adulto. Para la identificación de los ácidos se sigue el criterio de ANDERSON y cols. (1969 a y b) de acuerdo con los Rf y tiempos de retención dados por estos autores. De los ácidos resínicos identificados por los autores en *P. monticola*, *lambertiana*, *jeffrey* y *ponderosa*, sólo el ácido abietico no aparece en *P. pinaster* tanto por cromatografía en capa fina como gaseosa.

3.3.—VARIACIONES DE LOS COMPONENTES DE LAS PLÁNTULAS DE PINUS PINASTER DURANTE EL CRECIMIENTO

Estas experiencias se realizaron cultivando las plántulas en arena de cuarzo y en la cámara estufa, con temperatura y humedad ambiental constante, variando el fotoperíodo. Unos lotes crecieron en la oscuridad, otros con un período luminoso de 14 horas sobre 24 y otros con iluminación permanente. En los tablas 2.2.2.:1 y 2 está reflejada la variación del residuo seco y fracción grasa no volátil de las plántulas. Evidentemente a lo largo del desarrollo de la plántula hay una progresiva disminución tanto del peso seco total como de la fracción correspondiente a los componentes grasos de la semilla. Las diferencias entre estos dos valores corresponde a la fracción de sólidos de la planta y de naturaleza no grasa (prácticamente la fracción hidrocarbonada de la semilla) (véase tabla 2.2.2.:5). Esta fracción también disminuye con la edad de la plántula. Corresponde esta fase del crecimiento a un metabolismo endógeno (la plántula vive a expensas de las reservas nutritivas de la semilla) mientras se desarrolla el sistema fotosintético (véase la tabla 2.2.2.:3). Sólo en plántulas de 20 y 25 días se observa un incremento del residuo graso y no graso, lo que parece indicar que una vez sintetizada suficiente cantidad de clorofila comienza a actuar la síntesis fotosintética. El predominio del catabolismo graso sobre el hidrocarbonado, o viceversa, está relacionado con el cociente respiratorio. Por ello se ensayó la determinación manométrica del consumo de oxígeno y producción de anhídrido carbónico, utilizando plántulas enteras de diferente edad y realizando las medidas en la oscuridad, para inhibir la fotosíntesis.

En la tabla 2.2.2.:4 se exponen los resultados de estas medidas. Puede observarse que hay poca homogeneidad en los datos, por lo que se intentó una corrección gráfica de los valores XO_2 y XCO_2 para obtener un cociente respiratorio corregido. Este cociente respiratorio no se mantiene constante a lo largo del desarrollo de la plántula, dando en los primeros días valores superiores a la unidad, solo justificables si en determinada fase del crecimiento hay una conversión de las reservas hidrocarbonadas a componentes grasos. Aunque estos resultados no son concluyentes, podrían estar relacionados con la inversión observada por nosotros en la biosíntesis del alfa- y beta-pineno. BURMEISTER y von GUTTENBERG (1960) han sugerido que el oxígeno no llega fácilmente al lugar de síntesis de los

terpenos y que la producción de éstos es una adaptación a un déficit de oxígeno. Nosotros pensamos que este déficit de oxígeno podría incidir principalmente sobre la especial vía metabólica de un determinado componente.

En las tablas 2.2.2.:6 y 7 se expresa el contenido en esencia total de sus componentes en función de la edad de la plántula y del fotoperíodo. Puede verse un descenso en la producción de esencia coincidente con la aparición del epicotilo (hacia los 30 días de edad). Es también a esta edad de la plántula que se manifiesta más claramente la inversión de los porcentajes de los principales componentes (alfa- y beta-pineno). También a esta edad aparecen los componentes minoritarios (limoneno, sabineno, etc.), así como los ácidos resínicos (tabla 2.2.2.:10).

La posibilidad de que la inversión fuese debida a que los sistemas de biosíntesis del alfa-pineno y los del beta-pineno estuviesen localizados independientemente en distintos tejidos de la planta y fuese consecuencia de un desarrollo inarmónico de éstos, nos indujo a analizar independientemente el contenido de hojas y tallos por separado. La inversión se sigue dando en las partes equivalentes de la planta. Así (véase tabla 2.2.2.:8) en la hoja cotiledonar de 25 días el beta-pineno es mayoritario frente al alfa-pineno, mientras en las hojas de año y medio la proporción está invertida. Lo mismo ocurre entre tallo hipocotilo de 25 días y el tallo de la planta de año y medio. Hay que concluir que esta inversión es debida, más que a factores morfológicos, a una modificación de los sistemas biosintéticos que operan en cualquier parte de la planta y como consecuencia de los cambios metabólicos generales que se producen en el proceso de desarrollo de la plántula. Este fenómeno es independiente de la producción total de esencia.

En la tabla 2.2.2.:9 se exponen los resultados obtenidos con plántulas de 25 y 60 días procedentes de semillas de árboles "buenos productores de miera" y de árboles con producción normal. La producción total de esencia es en los buenos productores 4-5 veces mayor que en los normales y sin embargo la proporción entre los principales componentes es muy semejante en ambos y solo está de acuerdo con la edad de la plántula analizada.

Los procesos que estamos analizando y que ocurren en las plántulas de *P. pinaster* son prácticamente independientes del período de iluminación diaria. Puede observarse en las tablas anteriores, que la más clara influencia de la iluminación es que acelera en general todos estos procesos y así, por ejemplo, se alcanza una producción de esencia o formación de clorofila en plántulas iluminadas continuamente más elevada que en plántulas de la misma edad sometidas a un fotoperíodo de 14 horas luz, o crecidas en la oscuridad.

3.4.—INFLUENCIA DE LOS NUTRIENTES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESENCIA EN PLANTULAS DE *P. PINASTER*

Estas experiencias se realizaron mediante cultivo hidropónico en arena con irrigación automática según se expone en el apartado 2.1.3.:c.2. El diseño de las experiencias se ajustó al método de las variantes sistemáticas ideado por HOMÉs. También se utilizó el método de cálculo propuesto por este autor, para obtener la composición óptima de la solución nutritiva para cada edad de la plántula y para cada uno de los componentes esenciales. El diseño experimental y la forma

de preparar las soluciones nutritivas se encuentra en las tablas 2.2.1.:4, 5 y 6. Los resultados de las experiencias se exponen en las tablas 2.2.3.:2, 3 y 4. Los valores de estas tablas son media de cinco réplicas. Las conclusiones del cálculo estadístico en la tabla 2.2.3.:5.

Solamente los resultados correspondientes a la producción de esencia total y de sus principales constituyentes da una SD suficientemente baja para permitir el cálculo estadístico. Si comparamos los resultados de los primeros tres tratamientos en los que predomina el nitrógeno, azufre y fósforo, respectivamente, podemos ver que la cantidad de esencia total, así como la de sus principales componentes se incrementa de nitrógeno a azufre y de azufre a fósforo en plantas de tres meses, mientras que estas diferencias están invertidas en plantas de nueve meses. Esto hace pensar en un cambio de las necesidades nutritivas de la plántula causada por su crecimiento. Comparando estos resultados con los de los siguientes tratamientos (calcio, potasio y magnesio) se observa un cambio similar aunque menos acusado. En las plantas de tres meses el nutriente de mayor importancia es el calcio, mientras que en las de seis meses el orden de importancia es, de menor a mayor, potasio-calcio-magnesio, habiendo poca diferencia entre estos últimos. La proporción de los componentes en la esencia se mantiene casi constante en todos los tratamientos. Esto es evidente en el caso del alfa-pineno, aunque el beta-pineno presenta valores dispersos.

Dado a que la proporción del alfa-pineno en la esencia es alrededor del 70 por ciento, las conclusiones estadísticas son idénticas para alfa-pineno y esencia total. Así, la necesidad de nitrógeno en función de la producción de esencia o de alfa-pineno se incrementa a lo largo del tiempo, mientras disminuye la necesidad de azufre y fósforo. De forma análoga se incrementa la necesidad de calcio y magnesio, mientras disminuye la del potasio. La variabilidad del contenido de la esencia en beta-pineno no permite obtener ninguna conclusión para este componente. La proporción óptima entre cationes y aniones decrece ligeramente con la edad, considerando el rendimiento en esencia total o alfa-pineno. La solución óptima para el máximo rendimiento en alfa-pineno tiene la particularidad de que la proporción entre los seis nutrientes es prácticamente la misma en todos los casos.

Probablemente la influencia que los nutrientes ejercen sobre la producción de esencia es indirecta y está condicionada por el mejor o peor desarrollo de la plántula considerada "in toto". Así, SEILLAC (1967 y 1968) cultiva plántulas de *P. pinaster* en medio líquido y concluye que el nitrógeno y el potasio son indispensables para el buen desarrollo de la plántula, así como el azufre y fósforo, aunque estos dos últimos han de estar en una proporción determinada entre ellos. También MALAVOLTA y cols. (1966) que cultivan hidropónicamente plántulas de *P. elliotii* concluyen que el nitrógeno es el factor predominante en el desarrollo de la plántula, siendo el potasio y calcio de acción menos acusada.

3.5.—ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA DE LOS COMPONENTES TERPÉNICOS DE ARBOLES PERTENECIENTES A VARIAS ESPECIES DE PINOS

En las tablas 2.2.4.:5 y 6 se exponen los resultados del análisis de la oleorresina de *P. pinaster* obtenida por incisión a diferentes alturas del árbol y realizado

el análisis en el día de la incisión o posteriormente. De los resultados se deduce que la composición porcentual (para los componentes mayoritarios) es prácticamente la misma tanto si el análisis se hace sobre oleoresina reciente o pasados 30 días después de la incisión. En estas tablas se observa que hay dos grupos de *P. pinaster* que se diferencian por su contenido en beta-pineno. La extensión de los análisis a mayor número de ejemplares (tabla 2.2.4.:7) e incluyendo el análisis de hojas y ramas, nos confirma que la composición terpénica para cada árbol es una característica de éste e independiente de la muestra (hojas, ramas o miera). Pero dentro de la misma especie (al menos en *P. pinaster*) se pueden distinguir dos grupos: uno, con un contenido en beta-pineno inferior al 10 %, y otro en que la proporción de beta-pineno está entre el 20 y 30 %. En todos ellos el componente mayoritario es el alfa-pineno. La caracterización botánica de estos árboles nos señala como *pinaster* típicos los números 1, 2, 8 y 11, que tienen una baja proporción de beta-pineno. Los restantes de las tablas tenían unas características botánicas que inducen a considerarlos como híbridos de *pinaster* con otras especies.

Los demás componentes son irregulares, aunque se observa una elevada proporción de D3-careno en los número 2 y 4 y de sabineno en los número 3 y 12. Otra conclusión que se extrae de estas tablas es que determinados individuos presentan composición diferente según el origen de la muestra.

En la tabla 2.2.4.:8 están agrupados los análisis de hojas y ramas de nueve especies diferentes del género *Pinus*. Algunas especies están definidas claramente por un componente mayoritario: beta-felandreno en *P. contorta*, limoneno en *P. pinea*, sabineno en *P. halepensis*, beta-pineno en *P. canariensis* y *P. contorta*. En las restantes especies el componente mayoritario es el alfa-pineno. También en estas especies ocurre como en *P. pinaster*. En algunos casos los esquemas porcentuales son diferentes para árboles de la misma especie, e incluso son también diferentes según el origen de la muestra. El caso más evidente es el *P. jeffreyi*, cuya miera está constituida por un 98 % de n-heptano, mientras que hojas y ramas tienen mínimas cantidades de este hidrocarburo y sí en proporciones apreciables los otros componentes comunes del género *Pinus*.

En la tabla 2.2.4.:9 se agrupan los resultados de los análisis efectuados en hojas y ramas de árboles de diferente especie (dos árboles para cada especie) marcados previamente y elegidos por considerarlos botánicamente como típicos de la especie. Los análisis se realizaron a lo largo de un año, tomando muestras mensualmente.

Los componentes de la esencia, considerados individualmente, presentan oscilaciones en sus porcentajes a lo largo del año, pero estas oscilaciones no parecen responder a ningún factor estacional, puesto que los máximos y mínimos no coinciden con fechas determinadas. Por ello, considerando que no hay influencias estacionales hemos procedido a calcular el valor medio anual y su desviación estandar. Estos valores se agrupan en la tabla 2.2.4.:10 y son del mismo orden que los correspondientes de la tabla 2.2.4.:8 en donde se agrupan mayor número de ejemplares de la misma especie.

Estos datos confirman las conclusiones obtenidas de las anteriores tablas, de que la composición de la fracción volátil, puede ser diferente para el mismo árbol según el origen de la muestra. En *P. halepensis* el terpinoleno aparece en las hojas y no en las ramas. En un árbol de *P. laricio* la proporción de beta-pineno

es más elevada en hojas que en ramas. El canfeno es más elevado en hojas que en ramas en *P. sylvestris*. El limoneno se detecta constantemente en las hojas de *P. halepensis* y casi siempre es negativo en las ramas.

Estas anomalías pueden explicarse si admitimos que los ejemplares puros de cada especie presentan una composición relativa homogénea para todos sus tejidos y específica para cada especie. Se podría entonces distinguir dos clases de híbridos. Una, aquellos árboles que tienen una composición terpénica homogénea para todos los tejidos e intermedia con las de los padres, y otra clase en la que se incluirían aquellos árboles que presentan caracteres de hibridación en solo algunos tejidos.

Si consideramos homogéneas las muestras procedentes de cada especie, se obtiene una media global y anual para la especie. Estos valores con su desviación estándar están agrupados en la tabla 2.2.4.:11. La SD de estas medias es relativamente elevada, lo que nos indica que el valor para cada componente en una especie determinada oscila entre amplios límites de porcentaje. Sin embargo, los porcentajes de cada componente se encuentran dentro de unos límites que son diferentes para cada especie. El cálculo de la significación estadística de las diferencias entre las medias de cada especie nos da los valores de la tabla 2.2.4.:12, que nos demuestra que entre las cinco especies de pinos estudiadas, algunos de sus componentes presentan unas medias características y diferentes de las medias correspondientes a las otras especies. Por ejemplo, los valores de alfa-pineno y limoneno de *P. pinea* son diferentes a los correspondientes de las otras cuatro especies. Es decir, que no sólo un componente mayoritario puede definir a una especie, sino que también puede servir para ello un componente minoritario con tal de que su porcentaje se diferencie claramente del correspondiente a las demás especies. Lo mismo puede decirse del sabineno en *P. halepensis* como del limoneno en *Cedrus Atlántica*. Evidentemente el número de especies estudiadas por nosotros es muy bajo frente al centenar que constituye el género *Pinus* y para que estas conclusiones tuviesen valor taxonómico habría que extender este estudio analítico al mayor número de especies posible. Lo que si parece evidente es que aun con valores tan dispersos la fracción volátil de cada especie de pino responde a una composición relativa especial de la especie y es lógico considerar que esta característica de la especie es de naturaleza genética.

3.6.—BIOSINTESIS DE TERPENOS

Los trabajos de SUKHOV, STANLEY, SANDERMANN y otros demuestran que el ^{14}C en forma de CO_2 , acetato o mevalonato se incorpora en los pinos a la molécula de los diversos componentes terpénicos volátiles. Por la naturaleza de isoprenoides de estos compuestos hay que admitir que al menos en parte han de seguir a misma vía biosintética que sirve la construcción de las otras moléculas isoprenoides (carotenos, esteroides, etc.). Habría una fase común, paso del anhidrido carbónico a través de acetato y mevalonato, a isopentenilpirofosfato y otra fase específica en que a través de un precursor de 10 átomos de carbono se generarían los diferentes terpenos acíclicos, monocíclicos o bicíclicos.

En las tablas correspondientes al apartado 2.2.5. se incluyen los resultados obtenidos incubando extractos de plántulas o bien yemas de pino adulto con dife-

rentes sustratos y cofactores. En ellas se expresa la incorporación de la radiactividad de los precursores utilizados a los diferentes metabolitos fosforilados que integran la cadena biosintética en su primera fase. Al final de las tablas se especifican las condiciones de incubación. En todos los medios de incubación existe FNa al objeto de inhibir las fosfatasa de los extractos y que podrían destruir los metabolitos fosforilados que se forman en el curso de la reacción.

En la tabla 2.2.5.:1 se resume la acción que los activadores de grupos —SH ejercen sobre la incorporación del MVA a fosfoderivados. Ejerce efecto favorable el glutatión a concentración $10^{-2}M$ y la cisteína a la misma concentración. Más fuerte el efecto del glutatión que el de la cisteína. La acción del ácido ascórbico es dudosa, aunque sugiere una acción activadora limitada a la mevalonatoquinasa. El NADH y el NADPH a las concentraciones testificadas parecen deprimir las primeras fases de la incorporación del MVA.

En las tablas 2.2.5.:2 y 3 se estudia el efecto de los inhibidores de grupos —SH tanto en presencia como en ausencia de glutatión. La iodoacetamida inhibe completamente la incorporación del MVA a sus fosfoderivados cuando se emplea a concentración $10^{-2}M$ y parcialmente a concentración $10^{-3}M$. En este último caso la inhibición es contrarrestada por la adición de glutatión. El P.H.M.B. tiene una débil acción inhibidora en concentración $10^{-5}M$ pero inhibe completamente la reacción a 10^{-3} . El glutatión solo contrarresta la inhibición producida por el P.H.M.B. 10^{-5} . La acción inhibidora de la etilmaleimida es menor que la del P.H.M.B. y su acción es neutralizada por el glutatión cuando sus concentraciones de $10^{-3}M$.

El estudio cinético de la incorporación del MVA a sus fosfoderivados se incluye en las tablas 2.2.5.:4, 5, 6 y 7. En las experiencias correspondientes a las tablas 4 y 5 se empleó como sustrato el MVA-1- ^{14}C , por lo que no aparece el isopentenil-pirofosfato marcado. No así en las siguientes experiencias en que por emplearse en MVA-2- ^{14}C el carbono marcado aparece en la molécula de Iso-PP. Los resultados obtenidos señalan que el paso de MVA a PP-MVA es máximo hacia los 30-60 minutos, decreciendo posteriormente. La observación de los cromatogramas a la luz ultravioleta indican que a la vez que se produce esta incorporación, el ATP puesto en la mezcla de incubación pasa a ADP y AMP.

El empleo de MVA-2- ^{14}C (tablas 6 y 7) nos demuestra que el MVA después de pasar a P-MVA y PP-MVA se transforma en Iso-PP. En los cromatogramas correspondientes a estos ensayos se observa una mancha radiactiva de Rf elevado, que se incrementa con el tiempo de incubación y que no corresponde a los metabolitos identificados como P-MVA, PP-MVA, Iso-PP o Dal-PP. Pensamos que puede ser un metabolito posterior a estos compuestos de la cadena biosintética y anterior a la fase de ciclización y que podría ser, bien el neril- I_2^2 u otro análogo.

Empleando como precursor el acetato-1- ^{14}C se obtienen los resultados que se agrupan en la tabla 2.2.5.:8 y 9. Se confirma que los extractos de plántula incorporan el acetato a los derivados fosforilados del MVA, siendo absolutamente necesaria la presencia de CoA-SH y actuando como activador el NADPH y el glutatión. El malonato no parece tener influencia alguna. Estos ensayos se realizaron en tubos de incubación en forma de U invertida conteniendo en una rama la mezcla de incubación y en la otra NaOH al 20 % para fijar el carbónico desprendido. Efectivamente, se recupera anhídrido carbónica radiactivo que procede de la fase de descarboxilación en la formación de Iso-PP. El estudio cinético de la reacción

indica que la incorporación del acetato en los derivados fosforilados es función del tiempo. También se observa que la inicial formación del P-MVA se mantiene posteriormente, lo que demuestra que este intermediario a la vez que se forma, se transforma en los metabolitos posteriores.

En las tablas 2.2.5.:10 y 11 se incluyen los resultados obtenidos en la incubación de extractos de plántulas en presencia o ausencia de nucleótidos. Es evidente una clara necesidad de nucleótidos como co-sustratos de la mevalonatoquinasa y fosfomevalonatoquinasa, siendo los más eficaces el ATP y el ADP. Los restantes nucleótidos trifosfóricos son ligeramente activos sobre la fosfomevalonatoquinasa. Se observa también un efecto sinérgico en las mezclas ADP+UTP y ADP+GTP.

También hemos estudiado la acción que los efectores metálicos (Mg y Mn) ejercen sobre la incorporación del MVA. Se realizaron incubaciones con extractos de plántulas dializadas y sin dializar y en presencia o ausencia de Mg^{++} , Mn^{++} o EDTA. Los resultados (véase tabla 2.2.5.:12) señalan que los extractos dializados apenas incorporan el MVA mientras no se restaure el complejo reaccional por adición de Mn^{++} o Mg^{++} , fundamentalmente este último. La adición de EDTA (que sustrae los citados cationes del medio) impide la incorporación del MVA a los derivados fosforilados, tanto en extractos normales como dializado. Se puede concluir pues que el Mg^{++} es necesario para la incorporación del MVA, pudiendo ser en parte sustituido por el Mn^{++} .

En las tablas 2.2.5.:13 y 14 se reúnen los resultados de las experiencias realizadas con yemas de *P. pinaster* adulto. En el desarrollo cromatográfico de los productos de la reacción aparecen un cierto número de manchas radiactivas cuyos R_f no coinciden con los de los metabolitos conocidos de la biosíntesis hasta Iso-PP. Con acetato como sustrato (véase tabla 2.2.5.:13) se localiza la radiactividad en dos manchas desconocidas que podrían corresponder a metabolitos de vías metabólicas diferentes a las estudiadas. Si el sustrato es el MVA la radiactividad aparece en el P-MVA. Las experiencias con yemas de pino se repitieron realizando la incubación en un tubo en U invertido colocando en una rama hexano (1 ml.) para recoger los eventuales terpenos que se desprendiesen, y en la otra la mezcla de incubación. Esta última rama se mantiene en un baño de agua regulado a 37°C y la rama que contiene el hexano en un baño de hielo. Terminada la incubación y frenada la reacción se toma una porción del sobrenadante acuoso para el desarrollo cromatográfico (fracción no destilada; véase tabla 2.2.5.:14). El resto se mezcla con el hexano y se destila en el Neo-Clevenger para aislar los componentes volátiles. El residuo de la destilación ("destilado" de la tabla 14) se somete también a la cromatografía en papel. Las experiencias se realizaron con yemas simplemente trituradas, yemas homogeneizadas y yemas homogeneizadas y centrifugadas. Los resultados de la tabla señalan que utilizando yemas homogeneizadas con centrifugación o sin centrifugar (se emplea el sobrenadante de la centrifugación) la radiactividad del MVA se incorpora al P-MVA, Iso-PP y otras manchas no identificadas. El PP-MVA aparentemente no se acumula en los medios de incubación. Empleando las yemas trituradas es el P-MVA el que no se acumula en los medios de incubación y sí el PP-MVA, el Iso-PP y las manchas desconocidas. En este último caso desaparece completamente el MVA puesto como sustrato. La actividad específica encontrada en la fracción "destilada" supera generalmente a la encontrada en la fracción "no desti-

lada" Estos resultados confirman los de BEYTA y cols. (1969) de que parte de los metabolitos fosforilados están firmemente unidos a las proteínas, de las que se liberan por una prolongada calefacción.

El análisis por cromatografía gaseosa de la fracción en hexano destilada revela la presencia de mínimas cantidades de alfa-y beta-pineno. Ahora bien, la medida de la radiactividad de estos componentes en el radlogascromatógrafo ha resultado en todos los casos negativa.

Nuestros resultados confirman que la primera fase de la biosíntesis de los monoterpenos en los pinos es común a la biosíntesis de otros isoprenoides en tejidos o células de diverso origen. La nula incorporación del MVA marcado a los monoterpenos encontrada por nosotros y la baja incorporación encontrada por otros autores, hace pensar que este proceso biosintético está compartimentado. Probablemente los sistemas enzimáticos que conducen a la formación de los terpenos cíclicos se encuentran localizados en determinadas estructuras celulares y quizás formando parte de estas mismas estructuras. De otra parte el MVA y sus metabolitos fosforilados no difunden fácilmente. ARIGONI (1967) encuentra que el mejor precursor de la síntesis del mirceno en *H. lupulus* es la glucosa, seguida del acetato y la alanina. GOODWIN y cols. (1965) encuentran que muchos de los isoprenoides que se biosintetizan en los cloroplastos se forman rápidamente en la luz a partir del CO₂ marcado y no a partir del MVA marcado. Sin embargo, el MVA y no el CO₂ se incorpora rápidamente en los isoprenoides extracloroplastídicos y en los esteroides. Estos autores sugieren que el MVA y sus metabolitos pueden formarse dentro y fuera del cloroplasto, pero no pasan de dentro a afuera o viceversa.

ROGERS y cols. (1965) demuestran la existencia de mevalonatoquinasa en los cloroplastos de *Phaseolus vulgaris* y que la membrana del cloroplasto es impermeable al MVA. También señalan la existencia de otra mevalonatoquinasa extracloroplastídica.

ROGERS y cols. (1966) proponen un esquema de regulación de la biosíntesis basado en una combinación de segregación de enzimas y permeabilidad de membrana. La base de este esquema es que los enzimas que pasan el MVA a farnesil-PP existen tanto en el interior como fuera del cloroplasto y que la membrana de éste es impermeable al MVA y sus metabolitos fosforilados.

CHARLTON y cols. (1966 y 1967) encuentran que los cloroplastos aislados y tratados al U.S. de *Phaseolus vulgaris* incorporan el MVA al fitoeno (precursor de los carotenoides), y al fitol de la clorofila. Señalan que esta síntesis puede hacerse en ausencia de cualquier otro componente celular.

GRAEBE (1967) consigue incorporar el MVA al farnesol, escualeno, geraniol-geraniol y otros isoprenoides con una mezcla de fracción soluble y fragmentos de cloroplastos.

Indudablemente los sistemas enzimáticos que conducen a la biosíntesis de los monoterpenos en los pinos están compartimentados y probablemente de forma análoga a como ocurre en otros vegetales para la biosíntesis de otros isoprenoides. Identificados los metabolitos intermediarios que conducen a isopentenilpirofosfato, queda aún por dilucidar la segunda fase biosintética que lleva hasta los terpenos cíclicos.

Desde la hipótesis de RUZICKA (1951) que considerando el geraniol como precursor acíclico y pasando por un intermediario catiónico cíclico se generaban to-

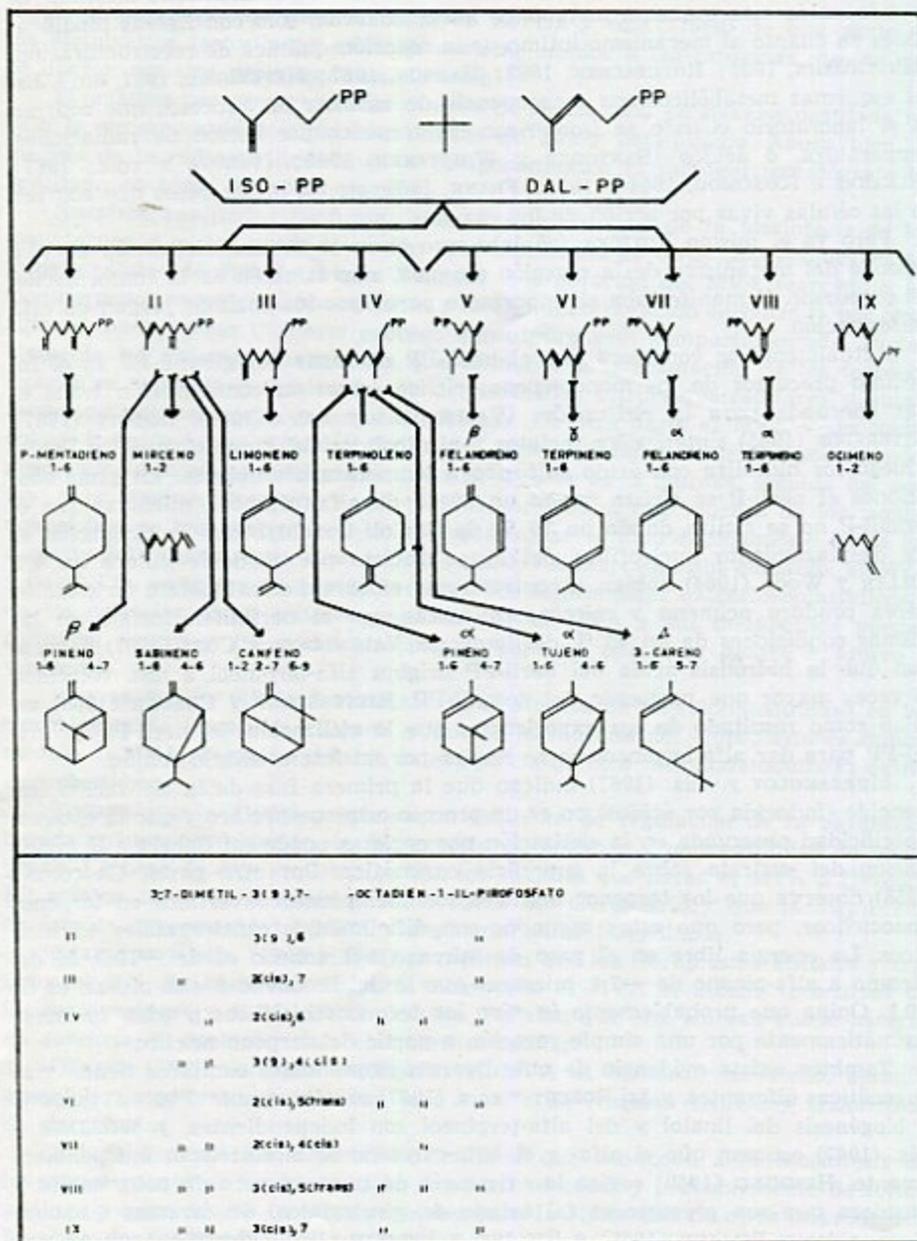
dos los monoterpenos monocíclicos y bicíclicos por reestructuraciones internas, se ha mantenido este esquema metabólico hasta la fecha, sólo con ligeras modificaciones en cuanto al mecanismo íntimo de la reacción química de reestructuración. (SANDERMANN, 1962; ROTHBACHER, 1963; HANSON, 1967; HEFENDEHL, 1967, etc.). Estos esquemas metabólicos son consecuencia de asimilar los procesos que ocurren en el laboratorio cuando se isomerizan los terpenos por acción de radiaciones, temperatura, o ácidos (BANTORPE y WHITTAKER, 1966; IVANOVA y cols., 1967; VALKANAS e ICONOMOU, 1964 y 1965; FRANK, 1968, etc.) a los procesos que ocurren en las células vivas por acción de los enzimas.

Pero ya el mismo RUZICKA señalaba que el curso de una ciclización no sólo depende del mecanismo de la reacción química, sino también de la conformación del precursor. Y manifestaba el importante papel que los enzimas juegan en esta conformación.

Actualmente se considera que el neril-PP en lugar del geranil-PP es el inmediato precursor de los monoterpenos cíclicos, pues su configuración trans es más adecuada para la ciclización. (VALENZUELA y cols. (1966), LOMMIS (1967). RITTERSDORF (1965) sintetiza los fosfatos y pirofosfatos del geraniol, nerol y linalol y luego los hidroliza con ácido sulfúrico a temperatura ambiente. En estas condiciones el neril-P se cicliza dando un 60 % de alfa-terpineol, mientras que el geranil-P no se cicliza dando un 75 % de linalol. Concluye que la ciclización es por desplazamiento nucleofílico del grupo fosfato por el doble enlace en 6,7. MILLER y WOOD (1964) habían encontrado que el geranildifenilfosfato en solución etérea produce ocimeno y mirceno, mientras que el nerildifenilfosfato en las mismas condiciones da un 45 % de limoneno. VALENZUELA y CORI (1967) encuentran que la hidrólisis ácida del neril-PP origina alfa-terpineol a una velocidad 50 veces mayor que partiendo del geranil-PP. RITTERSDORF y CRAMER (1968) señalan como resultado de sus experiencias que la ciclización del neril-PP y linalol-PP para dar alfa-terpineol no se realiza por un intermediario común.

MURSAKULOV y cols. (1967) indican que la primera fase de la ciclización isoprenoide (inducida por ácidos) no es un proceso estereoespecífico y que la estereoespecificidad observada en la ciclización por enzimas puede ser debida a la rígida fijación del sustrato sobre la superficie enzimática. Por otra parte, GASCOIGNÉ (1958) observa que los terpenos acíclicos son fácilmente convertidos en terpenos monocíclicos, pero que estos segundos son difícilmente transformables en bicíclicos. La energía libre en el paso de mirceno a limoneno es de $-16,5$, la del mirceno a alfa-pineno de $-7,4$, mientras que la del limoneno a alfa-pineno es de $+9,1$. Opina que probablemente *in vivo* los terpenos bicíclicos pueden formarse enzimáticamente por una simple reacción a partir del terpeno acíclico.

También existe evidencia de que diversos isoprenoides similares tienen vías biogénicas diferentes, y así ROBERT y cols. (1967) señalan que en *Thymus vulgaris* la biogénesis del linalol y del alfa-terpineol son independientes, y WILLIAMS y cols. (1967) estiman que el alfa- y el beta-caroteno se biosintetizan independientemente. HEMMING (1969) revisa la existencia de buen número de poliprenoles y considera que son precursores (al estado de pirofosfatos) de diversas quinonas isoprenoides y RILLING (1966) y RILLING y EPSTEIN (1969) identifican un precursor inmediato del escualeno "presqualene" que mantiene todavía un resto pirofosfórico. LAURENT y DA CUHNA (1964) suponen de la existencia de un precursor enmascarado del alfa-pineno en *Eucalyptus globulus*, puesto que en la destilación



fraccionada de las hojas aparece en las primeras fracciones el alfa-pineno, luego el cineol y finalmente vuelve a aparecer el alfa-pineno en cantidad. Por otra parte, POPJAK y cols. (1969) señalan que la unión enzima-sustrato se realiza en estos precursores por el resto pirofosfórico. Nuestros resultados, junto con los de BEYTA y cols. (1969) demuestran la existencia de prenol-pirofosfato fuertemente unidos a las proteínas, en los medios de incubación.

Todas estas referencias nos hace suponer que la biosíntesis de los monoterpenos discurre por vías metabólicas diferentes a las actualmente propuestas. En el esquema presentamos nuestra hipótesis sobre la biosíntesis de los monoterpenos más comunes en el género *Pinus*.

En esencia se postula que:

1.º El Iso-PP y Dal-PP se condensarían e isomerizarían por procesos simultáneos o sucesivos. Es decir, un enzima condensaría el Dal-PP con el Iso-PP y otros enzimas isomerizarían el producto de la condensación al correspondiente precursor pirofosfato, o bien actuaría un solo enzima que catalizaría ambos procesos. El mecanismo de la condensación puede ser perfectamente el descrito por CORNFORTH y cols. (1966). Así se formarían una serie de prenol-pirofosfatos.

2.º Estos inmediatos recursos de los terpenos se unirían a un enzima ciclizante (diferente para cada monoterpeno) y por las especiales características de este enzima, el precursor sufriría sucesivas reestructuraciones hasta adquirir la conformación adecuada, siendo la última etapa la eliminación del ácido pirofosfórico y la separación del terpeno formado del enzima. Según nuestra hipótesis, el neril-PP actuaría sólo como precursor del limoneno. En el esquema, debajo del nombre del monoterpeno se indica el número de los átomos de carbono del precursor que intervienen en las ciclizaciones. En los bicíclicos, lógicamente la última ciclización es la 1-6. Un caso especial es el canfeno, que habría que considerarlo como un terpeno tricíclico. La última ciclización sería la formación del doble enlace en 1-2.

3.º Esta hipótesis no presupone nada en cuanto a que los monoterpenos sean productos finales metabólicos, ni en cuanto al mecanismo íntimo de la reacción química a que de lugar. Sin embargo, parece más propia para explicar la relativa constancia de la composición específica de las esencias de las distintas especies del género *Pinus*.

Los trabajos de REITSEMA y cols. (1961), RAM y YOUNGKEN (1966) y HEPENDEHL (1967) señalan que los terpenos oxigenados de *Menta piperita* se producen por oxidación de los hidrocarburos terpénicos. Cabe esta posibilidad, en cuyo caso podría ser una vía catabólica de los hidrocarburos terpénicos en los pinos (que también tiene derivados oxigenados). Aunque también podrían producirse las oxidaciones a nivel de los precursores alifáticos.

4.—CONCLUSIONES

- 1.º La fase de plántula en *P. pinaster* es un estadio del desarrollo de la planta bien definido, tanto anatómica, como fisiológica y bioquímicamente.
- 2.º En este período se desarrollan, paralelamente, los sistemas fotosintéticos y los responsables de la biosíntesis de monoterpenos y de los ácidos resínicos

- 3.º) Existe en la plántula una fase en la que hay una inversión metabólica transitoria, caracterizada por el diferente contenido en alfa- y beta-pineno de la fracción volátil de la plántula.
- 4.º) Aparentemente la plántula posee algunas características que se mantienen cuando alcanza el estado adulto. Así, plántulas que proceden de semillas de árboles que producen gran cantidad de miera, tienen en sus tejidos una cantidad de esencia de 4-5 veces mayor que las normales.
- 5.º) El estudio de las necesidades nutritivas de la plántula, revela que el nitrógeno es el principal favorecedor de la producción de esencia. Las necesidades en fósforo y azufre decrecen con la edad de la plántula.
- 6.º) La mayor duración del periodo de iluminación favorece el crecimiento y desarrollo de los sistemas enzimáticos de la plántula.
- 7.º) La composición de la fracción volátil de las distintas especies del género *Pinus*, responde a un esquema porcentual específico para cada especie, aunque el valor individual para cada componente de la esencia es muy variable. No se encuentran variaciones estacionales definidas. En general, la composición de la fracción volátil de hojas, ramas o miera de cada individuo responde al mismo esquema porcentual. En determinados árboles, la composición de hojas, ramas o miera, difiere entre sí.
- 8.º) Las experiencias con homogenados de plántula, o bien con yemas de *P. pinaster* adulto, nos permiten confirmar que la biosíntesis del Isopentenil-pirofosfato, transcurre en los tejidos del pino, de forma semejante a como ocurre en otros tejidos de distinto origen.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, A. B., RIFFER, R., WONG, A. (1969a).—*Phytochem.*, 8; 869.
- ANDERSON, A. B., RIFFER, R., WONG, A. (1969b).—*Phytochem.*, 8; 373.
- ATTAWUAY, J. A., BARABAS, L. J., WOLFORD, R. W. (1965).—*Anal. chem.*, 37; 1289.
- BANNISTER, M. H., BREWERTON, H. V., McDONALD, I. R. C. (1959).—*Svensk. papperst.*, 62; 567.
- BANTHORPE, D. V., WHITTAKER, D. (1966).—*Quart. rev.*, 9; 373.
- BARDYSHEV, I. I., DONCOVA, E. P., PERCOVSKIJ, A. L. (1967).—*Khim. prirod. Soed. uzbek.*, 5; 347.
- BAYER, E.—*Gas chromatography*. Elsevier Publ. Co. Londres, 1961.
- BEYTA, E., VALENZUELA, P., CORI, O. (1969).—*Arch. Biochem. Biophys.*, 129; 346.
- BLIGHT, M. M., McDONALD, I. R. C. (1964).—*N. Z. J. sci.*, 7; 212.
- BLOCK, R. J., DURRUM, E. L., ZWEIG, G. (1953).—*A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*. Academic Press N. Y.
- BOCHWIC, B., KAPUSCINSKI, J. (1967).—*Rocz. Chem.*, 41; 1767.
- BURMEISTER, J., von GUTTENBERG, N. (1960).—*Planta med.*, 8; 1.
- CHARLTON, J. M., TREHARNE, K. J., GOODWIN, T. W. (1966).—*Biochem. J.*, 101; 7p.
- CHARLTON, J. M., TREHARNE, K. J., GOODWIN, T. W. (1967).—*Biochem. J.*, 105; 205.
- CORNFORTH, J. W., CORNFORTH, R. H., DONNIGER, C., POPJAK, G., RYBACK, G. SCHROEDFFER, G. J. (1963).—*Biochem. Biophys. res. communic.*, 11; 129.

- CORNFORTH, J. W., CORNFORTH, R. H., POPJAK, G., YENGOYAN, L. (1966).—*J. Biol. Chem.*, 241; 3970.
- CROWLEY, K. J. (1968).—*J. Org. Chem.*, 33; 3679.
- DAID, R., CARDE, J. P. (1964).—*C. R. Acad. Sci.*, 258; 1333.
- EATON, F. M., BERNARDIN, J. E. (1962).—*Plant. Physiol.*, 37; n.º 3.
- ELORRIETA, J. (1964).—*Ensayo de los pinos ponderosa y jeffrey en la vertiente Sur de Sierra Nevada*. Ministerio de Agricultura, Madrid.
- FRANK, G. (1968).—*J. Chem. Soc.*, n.º 2; 130.
- FOWELL, H. A., KRAUSS, R. W. (1969).—*Forest Sci.*, 5; 95.
- GASCOIGNE, R. M. (1958).—*J. Chem. Soc.*, 876.
- GEYER, S., MAYER, R. (1965).—*Z. Chem.*, 5; 308.
- GOMORI, G. (1955).—*Methods in enzymology*. Vol. I., Academic Press N. Y.
- GOODWIN, T. W. (1965).—En PRIDHAM, J. B., SWAIN, T. (1965).
- GRAEBE, J. E. (1967).—*Science* 157; 73.
- HANOVER, J. W. (1966a).—*Heredity* 21; 73.
- HANOVER, J. W. (1966b).—*Phytochem.*, 5; 713.
- HANSON, J. R. (1967).—*Perf. essent. Oil Rec.*, 55; 787.
- HEFENDEHL, F. W. (1966).—*Plant. Med.*, 14; 66.
- HEFENDEHL, F. W. (1967).—*Plant. Med.*, 15; 121.
- HEMMING, F. W. (1969).—*Biochem. J.*, 113; 23p.
- HENNING, O., HEINKE, H. (1966).—*Z. Chem.*, 6; 376.
- HETMAN, N. E., ARLT, H. G., PAYLOR, R., FEINLAND, R. (1965).—*J. Amer. Oil. Chem. soc.*, 42; 255.
- HOLLOWAY, P. W., POPJAK, G. (1966).—*Biochem. J.*, 100; 61p.
- HOMES, M. V. L.—*L'alimentation minerale equilibree des vegetaux*. Universa-Wet-teren, Bélgica, (I) 1961) II (1966).
- 699¿a.B1VJeridham etaoishrdlu etaoishrdlu etaoishrdl uetaoishrd luetaoishrdlnn
- IKAN, R., OZERI, Y., (1966).—*Israel J. Chem.*, 4; 251.
- IVANOVA, L. S., BOROVSKAJA, A. G., RUDAKOV, G. A. (1967).—*Zhurn. Org. Khim.*, 3; 2.162.
- JOYCE, N. M., LAWRENCE, R. V., GOUGH, L. J., (1966).—*J. Org. Chem.*, 31; 320.
- KAISER, R. (1963).—*Gas phase chromatography*. Butterworths, Londres.
- KENDALL, D. N., (1966).—*Applied infrared spectroscopy*. Reinhold Publ. Co., Londres.
- LAURENT, P. A., DA CUNHA, J. (1964).—*C. R. Acad. Sci.*, 259; 4.391.
- LOOMIS, W. D., (1967).—En PRIDHAM, J. B. (1967).
- LYNEN, P., KNAPPE, J., EGGER, H., HANNING, U., AGRANOFF, H. W., (1959).—*Feder. Proc.* 18; 274.
- MALAVOLTA, B., HAAG, H. P., SARRUGE, R. J., VENCOSKY, R., VALSECHI, O., SANTOS, C. L. D. (1966).—*An. Acad. Brasil. Cien.*, 38; 173.
- MARTIN, A. E., (1966).—*Infrared instrumentation and techniques*, ELSEVIER, N. Y.
- MATHIESON, D. W., (1965).—*Interpretation of organic spectra*, Academic Press, Londres.

- MILLER, J. A., WOOD, H. C. S., (1964).—*Angew. Chem.*, 3; 312.
- MIROV, N. T. (1961).—*Composition of gum turpentine of pines*. U. S. Depart. Agr. Forest Serv. Techn. Bu 1. n.º 1.239.
- MIROV, N. T. (1967).—*The genus pinus*, Ronald Press Co. N. Y.
- MURSAKULOV, I. G., SEMENOVSKY, A. V., SMIT, W. A., KUCHEROV, V. F., (1967).—*Tetrahedron* 23; 1.621.
- NICOLAS, A., GANDULLO, J. M., (1967).—*Ecología de los pinares españoles*. Minist. Agr. Madrid.
- OIGANOV, I., VLAHOV, R., TSANKOVA, E., (1964).—*C. R. Acad. Bulg. Sci.*, 17; 483.
- PAECH, K., TACEY, M. V., (1965).—*Modern Methods of plant analysis*. Springer-Verlag, Berlin.
- PARDOS, J. A., MARCOS, J., (1963).—*Anal. Inst. Forest. Invest. Exper.*, 8; 219
- PFLGER, P., WAGNER, G., (1965).—*Z. Chem.*, 5; 309.
- POPJAK, G., HOLLOWAY, P. W., BOND, R. P. M., ROBERTS, M., (1969).—*Biochem. J.*, 111; 333.
- PRIDHAM, J. B. (1967).—*Terpenoids in plants*. Academic Press London.
- PRIDHAM, J. B., SWAIN, T., (1965).—*Biosynthetic pathways in higher plants*. Academic Press. Londres.
- RAM, B. G., YOUNGEN, H. W., (1966).—*Lloydia* 29; 360.
- RANDERATH, K., (1966).—*Thin-layer chromatography*. Academic Press, Londres.
- REITSEMA, R. H., CRAMER, F. J., SCULLY, N. J., CHORNEY, W., (1961).—*J. pharm. Sci.*, 50; 18.
- RICHARDS, J. H., NEDRICKSON, J. B., (1964).—*The biosynthesis of steroids terpenes and acetogenins*, A. BENJAMIN, N. Y.
- RIFTER, R., ANDERSON, A. B., HOLZFORS, 20; 36 (1966).
- RILLING, H. C., (1966).—*J. Biol. Chem.*, 241; 3.233.
- RILLING, H. C., EPSTEIN, W. (1969).—*J. Amer. Chem. Soc.*, 91; 1.041.
- RITTERSDORF, W. (1965).—*Angew. Chem.*, 4; 444.
- RITTERSDORF, W., CRANER, F., (1968).—*Tetrahedron*, 24; 43.
- ROBERT, G., PASSET, J., PINEDE, M. C., (1967).—*C. R. Acad. Sci.*, 264; 404.
- ROGERS, L. J., SHAH, S. P. J., GOODWIN, T. W., (1965).—*Biochem. J.*, 96; 7 p.
- ROGERS, L. J., SHAH, S. P. J., GOODWIN, T. W. (1966).—*Biochem. J.*, 100; 14c.
- ROSENBERG, H., (1959).—*J. chromatogr.*, 2; 487.
- ROTHBACHER, B., (1968).—*Die Pharmazie* 23; 389.
- RUZICKA, L., (1953).—*Experientia* 9; 357.
- SANDERMANN, W. (1962).—*Holzforst.*, 16; 65.
- SANDERMANN, W., BRUNS, K. (1962).—*Naturwiss.*, 49; 258.
- SANDERMANN, W., BRUNS, K. (1965).—*Deutsch. Apoth. Z.* 105; 791.
- SANDERMANN, W., SCHWEERS, W. (1962).—*Tetrahedron Letters*; 257.
- SANDERMANN, W., SCHWEERS, W., BEINHOFF, O. (1960).—*Chem. Ber.*, 93; 2.266.
- SEILLAC, P. (1967).—*C. R. Acad. Sci.*, 264; 1.047.
- SEILLAC, P. (1968).—*C. R. Acad. Sci.*, 267; 743.
- SMITH, R. H. (1967).—*Forest Sci.*, 13; 246.
- SMITH, R. H. (1967).—*U. S. Forest Serv. Res. Note* 135.
- STAHL, E. (1965).—*Thin-layer chromatography* Springer-Verlag, Berlin.

- STANLEY, R. G. (1961).—Forest Serv. U. S. Depart. Agric. Techn. paper n.º 56.
- SUGATHAN, K. K., VERGHESE, J. (1965).—Perf. Esent. Oil Record 56; 518.
- SUKHOV, G. V. (1957).—Proc. Inter. Conf. Radioisotopes Sci. Res., Vol. IV; 535.
- SWAIN, T. (1966).—*Comparative phytochemistry*. Academic Press., Londres.
- SZYMANSKY, H. A. (1964).—*Interpreted infrared spectra*. Plenum Press, N. Y.
- TRANCHANT, J. (1964).—*Manuel pratique de chromatographie en phase gaseuse*. Masson et Cie. Paris.
- UMBREIT, W. W., BURRIS, R. M., STAUFFER, J. F. (1949).—*Manometric. Techniques and tissue metabolism*. Burges Publ. Co, Minneapolis.
- VALENZUELA, P., CORI, O. (1967).—*Tetrahedron Letters* 32; 3.089.
- VALENZUELA, P., CORI, O., YUDELEVICH, A. (1966).—*Phytochemistry* 5; 1.005.
- VALENZUELA, P., BEYTIA, B., CORI, O., YUDELEVICH, A. (1966).—*Arch. Biochem. Biophys.*, 113; 536.
- VALKANAS, G., ICONOMOU, N. (1964).—*Pharm. Acta. Helv.* 39; 441.
- VALKANAS, G., ICONOMOU, N. (1965).—*Pharm. Acta Helv.*, 40; 467.
- VALKANAS, G., ICONOMOU, N. (1966).—*Pharm. Acta Helv.*, 41; 209.
- WIECKOWSKI, S., GOODWIN, T. W. (1967).—*Biochem. J.*, 105; 89.
- WILLIAMS, A. L., BANNISTER, M. H. (1962).—*J. Pharmacol. Sci.*, 51; 970.
- WILLIAMS, R. J. H., BRITTON, G., GOODWIN, T. W. (1967).—*Biochem. J.*, 105; 99.
- WILLIAMS, R. J. H., BRITTON, G., CHARLTON, J. M. (1967).—*Biochem. J.*, 104; 767.
- WOLSTENHOLME, G. E. W., O'CONNOR, M. (1959).—*Ciba foundation symposium on the biosynthesis of terpenes and sterols* J. A. Churchill Ltd. Londres.
- ZAVARIN, E., HATHAWAY, W., REICHERT, T., LINHART, Y. B. (1967).—*Phytochemistry* 6; 1.019.
- ZINKEL, F., ROWE, J. M. (1964).—*J. Chromatogr.*, 13; 74.