

COMPOSICIÓN TERPÉNICA DE LA ACÍCULA DE *PINUS PINASTER* AIT. EN MONTE Y BANCO CLONAL

B. FERNÁNDEZ DE SIMÓN^{*1}, M. C. GARCÍA-VALLEJO¹, E. CADAHÍA¹, C. ARRABAL², M. CORTIJO²

¹Departamento de Industrias Forestales, INIA-CIFOR, Apdo. 8111. 28080 Madrid. Telf: 91-3476783; Fax: 91-3572293; E-mail: fdesimon@inia.es

²Departamento de Ingeniería Forestal. ETSI Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.

RESUMEN

Se determina la composición de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, ácidos grasos y ácidos resínicos de las acículas de *Pinus pinaster* tomadas en monte y banco clonal, con el fin de conocer si los resultados obtenidos en las muestras del banco clonal son extrapolables a los datos que puedan obtenerse en monte. Este estudio se realiza sobre muestras de dos quimiotipos diferentes, descritos anteriormente. Los análisis se realizan mediante cromatografía de gases, acoplada a un detector selectivo de masas, habiéndose identificado 114 compuestos diferentes.

P.C.: banco clonal, terpenos, ácidos resínicos, ácidos grasos, *Pinus pinaster*.

SUMMARY

Monoterpene, sesquiterpene, neutral diterpene, fatty and resin acids composition were determined in needles of *Pinus pinaster*, from clonal bank and forest, in order to know if the results obtained in clonal bank are extrapolate to data obtained in the forest. This study was carried out with samples of two different chemotypes, early described. The analyses were achieved by gas chromatography, with a mass selective detector. 114 different compounds were identified.

K.W. clonal bank, terpenes, resin acids, fatty acids, *Pinus pinaster*.

INTRODUCCIÓN

En coníferas, el contenido de terpenos y su patrón de distribución son usados a menudo como valores quimiotaxonómicos para la identificación de subespecies e híbridos, así como para distinguir variaciones geográficas, destacando los trabajos realizados por BARADAT & MARPEAU-BEZARD (1988) y DOMINGUEZ *et al* (1988 y 1989) con *P. pinaster*. Asimismo, los ácidos resínicos, debido a su estabilidad química y fisiológica son considerados como marcadores válidos en estudios genéticos y taxonómicos del pino, también en *P. pinaster* (WALTER *et al.*, 1985; ARRABAL & CORTIJO, 1997). Sin embargo, no conocemos ningún trabajo en el que estos compuestos sean utilizados en *P. pinaster*, como marcadores químicos en la selección de pinos grandes productores de resinas, aunque sí para otras especies (SQUILLACE *et al.*, 1971; KRIEGEL *et al.*, 1984).

Para acometer el estudio de la posible utilización de la composición química de la acícula (terpenos y ácidos grasos y resínicos) en la determinación de táxones subespecíficos, procedencias o producción de resina en *P. pinaster* (GARCIA-VALLEJO *et al.*, 1998), es necesario plantearlo sobre un gran número de muestras. Por ello, y para hacerlo de una forma lo más productiva posible, se ha recurrido a la utilización de bancos clonales que permiten disponer de copias de las plantas de interés en un área centralizada, para estudios intensivos. La clonación permite el aprovechamiento de un genotipo único y multiplicarlo para obtener nuevos individuos con el mismo genotipo. El conjunto de descendientes de una planta, obtenidos mediante la aplicación de una técnica de propagación vegetativa, es un clon. Cada uno de los integrantes de ese clon se denomina ramet, los cuales son genéticamente idénticos entre sí, e idénticos a la planta madre que los originó. A su vez la planta madre que dio origen al clon recibe el nombre de ortet. Los miembros de este clon exhibirán tendencia a la uniformidad fenotípica y presentarán en general el mismo aspecto, tamaño, época de floración, de maduración, etc. Aún así, el comportamiento y apariencia de un individuo es

consecuencia de su constitución genética y del ambiente en que se desarrolla. Por lo mismo, la identidad genética de los ramets no es garantía de que éstos exhibirán exactamente las mismas características. La modelación ambiental del genotipo da origen al fenotipo, el cual puede ser considerablemente distinto entre miembros de un mismo clon.

Cuando se utilizan bancos clonales, previamente al estudio de la posible correlación entre la composición química de la acícula (terpenos y ácidos grasos y resínicos) y la existencia de quimiotipos, la variación geográfica o el volumen de producción de resina, es necesario establecer fuera de toda duda, que dicha composición química de la acícula tiene un carácter genotípico y no fenotípico. Para ello, y en un primer paso, se ha querido conocer si se producen diferencias en las acículas según se hayan recogido en los ortets o en los ramets. En este trabajo presentamos los resultados obtenidos en muestras de 12 ortets y sus correspondientes 12 ramets.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Durante el mes de julio de 1999, se han recogido acículas de 2 años procedentes de 12 árboles situados en un monte natural y sus correspondientes ramets situados en banco clonal, obtenido mediante injerto, ambos en la provincia de Segovia (términos municipales de Coca y Cuéllar). Los injertos se hicieron seis años antes sobre pies de *P. pinaster* de la misma región, en los que se eliminaron todas las ramas. Las acículas recogidas se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido a -70°C y se mantuvieron así hasta su análisis.

Extracción y análisis cromatográfico y estadístico. La extracción y el análisis cualitativo y cuantitativo de los terpenos neutros y de los ácidos grasos y resínicos en las acículas, se realizaron según lo descrito en FERNÁNDEZ DE SIMÓN *et al.* (2001). Los datos obtenidos fueron analizados usando el paquete estadístico BMDP. Se realizó un análisis univariante (BMDP P7D), incluyendo los test de comparación de medias de Tukey, de Duncan y Student-Newman-Keuls, para un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las acículas de *Pinus pinaster* pueden agruparse en dos quimiotipos diferentes, no relacionados con el origen geográfico (FERNÁNDEZ DE SIMÓN *et al.* 2001). Estos mismos quimiotipos han sido detectados en las muestras estudiadas en este trabajo. Las acículas del quimiotipo 1 contienen de media, 2 mg por gramo de acícula de monoterpenos, 2.5 mg de sesquiterpenos, 1.4 mg de diterpenos neutros, 1.1 mg de ácidos grasos y 17 mg de ácidos resínicos, mientras que las acículas del quimiotipo 2 contienen de media 2.2, 2.2, 8.5, 0.5 y 4.2 mg por gramo de acícula, respectivamente. Representan en su conjunto 23-24 mg por gramo de acícula en las muestras del quimiotipo 1, y 17-18 mg por gramo de acícula en las muestras del quimiotipo 2, no detectándose ninguna diferencia significativa según la muestra proceda de monte natural o de banco clonal.

En total se han detectado 147 compuestos diferentes, de los cuales se han identificado 114. Los resultados obtenidos, tanto en lo que se refiere a los contenidos globales por gramo de acícula como a los porcentajes de cada compuesto detectado, dentro de su familia de compuestos, aparecen reflejados en las tablas 1 y 2. Tal y como se ha descrito en materiales y métodos, se han aplicado varios test de comparación de medias, para un intervalo de confianza del 95%, a los 147 componentes detectados. Ninguno de ellos encuentra diferencias significativas entre los componentes químicos de las acículas procedentes de ortets y las procedentes de ramets. Este hecho parece confirmar que la composición terpénica y de ácidos grasos y resínicos de la acícula de *Pinus pinaster*, es un carácter con un fuerte control genético, no siendo de mucha importancia la influencia del medio ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA) con el proyecto SC97-118-C2-1. Queremos expresar nuestro agradecimiento al Dr. D. Ricardo Alía y sus colaboradores, por su ayuda en la recogida de las muestras y a Rosa Calvo por su colaboración en el análisis estadístico.

BIBLIOGRAFÍA

- ARRABAL, C. & CORTIJO, M.; (1997). *Fatty and resin acids of Spanish Pinus pinaster Ait subspecies*. J. Am. Oil. Chem. Soc. 48, 455-461.
- BARADAT, PH. & MARPEAU-BEZARD, A.; (1988). *Le Pin maritime Pinus pinaster AIT. Biologie et Génétique des Terpènes pour la connaissance et l'amélioration de l'espèce*. Thèse collective n° 953. Universidad Bordeaux I.
- DOMINGUEZ GARRIDO, M., GARCIA MARTIN, D. & GARCIA VALLEJO, C.; (1988). *The essential oil of needles from Spanish Pinus pinaster AIT*. 10th International Congress of essential oils, fragrances and flavors. Elsevier Science Publisher. Amsterdam, 211-229
- DOMINGUEZ GARRIDO, M., GARCIA VALLEJO, C., GARCIA MARTIN, D. & PERUCHA, J.; (1989). *Diterpene hydrocarbons in the essential oils of needles of Pinus pinaster Ait*. International Symposium on Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids.
- FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B., GARCIA VALLEJO, C., CADAHIA, E., ARRABAL, C. & CORTIJO, M.; (2001). *Characterization of two chemotypes of Pinus pinaster by their terpene and fatty acids patterns in needles*. Trees (enviado para su publicación).
- GARCIA-VALLEJO, C., CADAHIA, E. & CONDE, E.; (1998). *Estudio de terpenos y ácidos resínicos como marcadores para la determinación de procedencia y producción de resina en Pinus pinaster*. I Simposio de aprovechamiento de resinas naturales. Segovia.
- KRIEGL, R., KOCH, H. & FISCHER F.; (1984). *Die Rohbalsamzusammensetzung von Kiefern verschiedener Ertragsleistung*. Wissens. Z. Tech. Uni. Desden 33, 213-214.
- SQUILLACE, A.E., HEDRICK, G.W. & GREEN, A.J.; (1971). *Variation and inheritance of levopimaric acid content and its relationship to oleoresin yield in Slash Pine*. Silvae Genet. 20, 90-91.
- WALTER, J., DELMOND, B. & PAULY, G.; (1985). *The resin acids of needles and cortical tissues of maritime pines (Pinus pinaster Ait.) from Landes and Corsica. Occurrence of anticopalic acid in needles from Corsican origin*. C.R. Acad. Sci. Ser.3, 301, 539-542.

Tabla 1.- Contenido global (mg/g acícula) e individualizado (% área) de los terpenos neutros.

	Quimiotipo 1				Quimiotipo 2			
	Banco clonal		Monte		Banco clonal		Monte	
	media	sd	media	sd	media	sd	media	sd
Monoterpenos	1.98	1.24	2.10	0.79	2.33	1.03	2.13	0.72
α -pineno	39.74	8.99	40.22	4.69	42.70	6.03	43.66	6.68
camfeno	0.33	0.08	0.23	0.08	0.30	0.15	0.38	0.07
β -pineno	33.37	9.66	33.63	9.25	35.41	2.50	34.22	4.90
mirceno	11.70	1.01	12.06	1.59	11.70	2.31	12.21	2.99
α -felandreno	0.10	0.13	0.10	0.09				
3-careno					0.94	2.30	1.39	3.11
β -felandreno + limoneno	4.09	1.20	3.79	0.87	4.28	3.01	4.00	1.88
<i>trans</i> -ocimeno	0.50	0.48	0.85	1.49	0.51	0.47	0.47	0.30
terpinoleno	1.24	0.75	0.55	0.65	1.43	1.15	1.38	1.04
linalol	1.13	0.44	0.99	1.05	0.54	0.85	0.41	0.16
ac. cumínico	0.33	0.31	0.47	0.32	0.05	0.13	0.13	0.19
acetato de linalilo + geraniol	3.28	4.14	4.62	3.72	0.64	0.29	0.94	0.52
acetato de bornilo	0.39	0.50	0.15	0.16				
<i>n</i> -tridecano	0.28	0.24	0.35	0.11				
acetato de geraniol	0.60	0.34	0.35	0.32	0.18	0.21	0.14	0.22
metil-eugenol	0.40	0.29	0.42	0.25	0.17	0.20	0.21	0.22
feniletilisovalerانات	2.53	2.57	1.22	0.71	1.15	0.90	0.45	0.26
Sesquiterpenos	2.52	0.48	2.61	0.48	2.39	0.83	2.17	0.32
α -cubebeno	1.08	0.22	1.09	0.31	0.38	0.11	0.30	0.18
α -ylangeno	0.35	0.10	0.34	0.16	0.09	0.11	0.08	0.07
α -copaeno	1.72	0.26	1.69	0.23	1.00	0.21	1.00	0.19
β -cubebeno	0.68	0.10	0.69	0.10	0.48	0.10	0.40	0.07
longifoleno	0.35	0.40	0.35	0.27				
cariofileno	23.01	3.87	21.48	2.91	18.77	3.41	18.76	1.97
β -gurjuneno	1.49	0.61	1.40	0.31	0.99	0.72	0.70	0.30
α -humuleno	4.21	0.78	4.15	0.63	3.51	0.72	3.29	0.31
α -amorfeno	0.40	0.14	0.62	0.13	0.44	0.21	0.23	0.16
γ -muuroleno	5.29	1.52	5.47	1.95	2.64	1.16	2.21	0.79
germacreno D	27.60	5.40	28.27	6.78	37.94	7.08	41.82	6.07
isolongifoleno	2.66	0.51	2.73	0.61	1.73	0.47	1.42	0.42
α -muuroleno	2.53	0.63	2.84	0.76	2.18	0.61	1.91	0.18
hidrocarburo sesquiterpénico	0.83	0.22	0.92	0.26	0.53	0.22	0.52	0.11
γ -cadineno	6.83	1.02	6.85	1.24	4.08	0.85	3.56	0.43
δ -cadineno	8.51	1.99	8.68	2.65	5.12	1.78	4.27	1.00
cadina-1,4-dieno	0.85	0.22	0.89	0.25	0.29	0.21	0.26	0.16
α -bisaboleno	1.01	0.34	1.18	0.40	0.79	0.26	0.56	0.29
germacreno D-4-ol	0.70	0.50	0.58	0.30	1.02	1.10	0.95	0.91
guayol	0.80	0.56	0.86	0.47	0.59	0.40	0.65	0.47
τ -cadinol	0.82	0.24	0.80	0.28	0.45	0.25	0.50	0.08
α -cadinol	1.51	0.40	1.40	0.56	0.89	0.33	0.85	0.21
(<i>E,E</i>)-farnesol	0.74	1.17	0.45	0.49	0.22	0.27	0.21	0.29
acetato de germacreno D-4-ol					3.64	3.10	2.74	2.42
acetato de (<i>Z,E</i>)-farnesol	0.17	0.24	0.25	0.21	0.66	0.46	0.88	0.68
acetato de (<i>E,E</i>)-farnesol	2.14	1.81	2.20	1.35	1.06	1.25	1.27	1.25
propionato de (<i>Z,E</i>)-farnesol	1.25	0.79	1.29	0.59	9.24	2.23	8.72	2.86
propionato de (<i>E,E</i>)-farnesol	0.50	0.31	0.79	0.26	0.35	0.19	0.68	0.15
isovalerانات de (<i>E,E</i>)-farnesol	1.96	0.78	1.74	0.92	0.92	0.31	1.28	0.45
Diterpenos	1.31	0.70	1.44	0.70	8.26	2.45	8.88	1.55
8(17),12,14-labdatrieno	4.61	1.91	5.55	1.79	0.42	0.09	0.51	0.06
19-nor-4,8,11,13-abietatetraeno	1.29	0.44	1.28	0.35	0.48	0.06	0.42	0.12
7,13-abietadieno	0.86	0.45	1.52	0.93	5.19	1.80	4.79	2.18
8(14),12-abietadieno	0.81	0.25	0.78	0.37	8.03	2.61	9.93	3.58
diterpeno oxigenado					0.42	0.14	0.39	0.08
19-nor-6,8,11,13-abietatetraeno	1.52	0.56	1.13	0.16	0.25	0.06	0.20	0.08
8,11,13-abietatrieno	6.93	2.79	5.62	4.09	3.84	0.62	3.95	0.28
8,13-abietadieno	7.50	2.48	7.62	4.39	31.81	7.75	32.25	5.26
13(16),14-labdien-8-ol	14.08	14.01	18.54	17.55	2.46	0.89	2.21	0.68

anticopalol isómero					2.97	2.26	2.94	2.65
abienol	2.54	1.49	2.05	0.99	0.28	0.09	0.33	0.14
8(14),13(15)-abietadieno					6.96	0.62	7.04	1.30
8,15-pimaradien-18-al	2.33	0.83	2.02	0.46	0.15	0.11	0.19	0.09
8(14),11,13(15)-abietatrieno					0.36	0.10	0.32	0.05
alcohol diterpénico					0.60	0.18	0.72	0.18
isopimaral	1.66	0.47	1.12	0.60				
alcohol diterpénico	4.17	2.67	4.27	2.65				
anticopalol					16.96	3.28	16.37	4.30
levopimaral	4.44	2.43	5.26	4.60	0.18	0.10	0.16	0.04
dehidroabietal	1.61	1.01	1.25	0.78				
pimarol					4.05	2.08	3.55	1.69
hidrocarburo diterpénico					0.44	0.25	0.39	0.21
diterpeno oxigenado	0.44	0.38	0.44	0.33	1.20	0.37	1.73	0.52
abietal+m. levopimarato+m. palustrato	14.92	3.32	13.36	2.59	0.73	0.25	0.64	0.13
hidrocarburo diterpénico					0.61	0.27	0.71	0.17
isopimarol	2.66	1.63	2.13	3.09	0.82	0.63	0.73	0.54
diterpeno oxigenado					0.19	0.18	0.70	0.72
dehidroabietato de metilo	10.94	4.28	9.90	4.27	4.90	2.42	3.05	2.30
neoabietal + metil imbricataloato	5.13	5.14	6.49	7.63	0.53	0.14	0.43	0.11
diterpeno oxigenado					0.73	0.19	0.55	0.20
abietato de metilo	4.03	1.65	3.04	1.57	1.35	1.10	1.97	1.25
abietol	0.77	0.83	1.01	0.80	1.45	0.47	1.27	0.47
diterpeno oxigenado					0.05	0.09	0.03	0.07
diterpeno oxigenado	0.81	0.52	0.51	0.24	0.19	0.10	0.16	0.03
diterpeno oxigenado	1.03	0.50	0.65	0.18	0.12	0.14	0.05	0.06
neoabietato de metilo	3.33	0.90	2.65	1.23	0.08	0.06	0.05	0.01
neoabietol	1.61	1.07	1.80	1.55	1.20	0.49	1.30	0.53
Total neutros	5.81	1.81	6.15	1.46	12.98	3.98	13.18	2.18

Tabla 2.- Contenido global (mg/g acícula) e individualizado (% área) de los ácidos grasos y resínicos, como ésteres metílicos.

	Quimiotipo 1				Quimiotipo 2			
	Banco clonal		Monte		Banco clonal		Monte	
	media	sd	media	sd	media	sd	media	sd
Ácidos grasos	1.01	0.25	1.13	0.32	0.61	0.22	0.51	0.22
decanoico C _{10:0}	0.57	0.20	0.83	0.36	0.85	0.44	0.88	0.18
laúrico C _{12:0}	2.68	1.03	2.72	2.07	1.67	0.98	1.49	0.65
mirístico C _{14:0}	3.40	1.76	3.58	3.03	1.73	0.93	1.38	0.35
no identificado			0.97	0.77	1.37	0.44	1.54	0.38
pentadecanoico C _{15:0}	0.74	0.16			3.16	1.29	2.48	0.93
palmítico C _{16:0}	13.38	1.84	12.75	2.88	17.53	2.32	18.19	3.16
no identificado	1.36	0.65	1.62	1.94	12.01	4.42	11.04	7.39
linoleico C _{18:2 (9,12)}	0.65	0.22	0.60	0.23				
octadecenoico C _{18:1 (10)}	8.25	3.34	8.93	3.36				
oleico C _{18:1 (9)}	7.16	2.17	7.27	1.81	14.30	5.55	12.85	5.09
esteárico C _{18:0}	19.05	2.07	18.79	3.42	24.10	6.17	26.09	6.60
14-hidroxi-10 octadecenoico	7.88	1.77	6.70	2.15				
13-hidroxi-9-octadecenoico	3.16	0.66	4.16	1.99				
nonadecadienoico C _{19:2(9,12)}	2.20	1.15	2.03	0.91				
nonadecenoico C _{19:1 (9)}	2.22	1.28	1.82	0.68				
nonadecanoico C _{19:0}	2.94	1.91	1.00	0.31	1.93	0.45	2.12	0.51
eicosanoico C _{20:0}	12.10	4.19	16.01	7.46	7.58	3.11	8.95	2.74

eneicosanoico C _{21:0}	7.93	4.78	6.15	3.67	3.55	1.14	2.47	0.30
behénico C _{22:0}	1.73	0.56	1.46	0.53	7.68	4.63	7.75	4.57
lignocérico C _{24:0}	2.60	0.60	2.63	0.76	2.54	0.51	2.76	1.08
Ácidos resínicos	16.56	8.20	17.50	5.56	4.69	1.47	3.94	2.12
Seco I*	0.10	0.01	0.11	0.03				
Seco II**	0.12	0.04	0.12	0.03				
secodehidroabiético isómero	0.84	0.31	0.63	0.38				
anticopálico isómero					10.58	1.87	10.92	0.72
eperúxico					12.55	2.28	13.12	1.37
pimárico	0.96	0.38	1.08	0.96	4.17	0.99	4.81	3.10
anticopálico isómero					9.83	1.46	9.61	1.22
sandaracopimárico	1.45	0.10	1.50	0.11	2.58	0.87	3.35	1.36
anticopálico isómero					6.95	2.23	6.29	1.90
isopimárico	0.58	0.53	0.60	0.44	1.29	0.58	1.22	0.54
anticopálico					35.43	7.06	33.47	7.03
levopimárico + palústrico	31.82	8.08	34.16	10.23				
dehidroabiético	6.49	1.32	5.79	1.02	4.50	2.55	4.82	1.64
ácido resínico	0.56	0.13	0.52	0.17				
8,12-abietadien-18-oico	0.48	0.23	0.54	0.37				
imbricataloico	9.09	2.89	5.76	2.27	0.44	0.20	0.34	0.20
abiético	13.16	3.24	13.02	4.08	5.33	2.42	5.84	2.31
ácido resínico	0.48	0.19	0.41	0.21				
ácido resínico					0.61	0.23	0.62	0.21
epiimbricataloico	1.43	0.45	1.12	0.69				
neobiético	25.28	11.14	28.90	12.02	2.73	1.28	2.85	1.61
dimetildihidroagatato	0.76	0.38	0.49	0.28	0.55	0.37	0.25	0.19
dimetilpinifolato	0.07	0.06	0.05	0.04				
oxoresínico (M ⁺ 330)	0.18	0.16	0.14	0.24				
hidroxiresínico (M ⁺ 334)	0.30	0.13	0.23	0.14				
oxohidroxidehidroabiético	1.46	0.50	1.18	0.22				
metoxiresínico (M ⁺ 346)	1.90	0.89	1.65	0.80				
oxohidroxidehidroabiético	0.38	0.09	0.32	0.11	0.70	0.42	0.51	0.26
hidroxiabiético (M ⁺ 332)	0.09	0.08	0.13	0.08				
19-nor-12-oxo-3,5,8-abietatrienoico	0.50	0.27	0.42	0.20				
hidroxiresínico (M ⁺ 330)	0.16	0.15	0.13	0.18				
hidroxidehidroabiético	0.15	0.05	0.13	0.05				
dihidroxiresínico (M ⁺ 348)	0.21	0.12	0.22	0.11				
oxoresínico (M ⁺ 328)	0.16	0.14	0.16	0.18				
15-hidroxidehidroabiético	0.31	0.10	0.29	0.07				
dihidroxiresínico (M ⁺ 348)	0.05	0.03	0.05	0.03				
dihidroxiresínico (M ⁺ 348)	0.04	0.04	0.04	0.04				
otros no identificados	0.46	0.27	0.12	0.10	1.75	0.55	1.98	0.44
Total ácidos	17.57	8.37	18.62	5.78	5.30	1.66	4.45	2.31

*2 α -[2'(m-isopropilfenil)etil]-1 β .3 α -dimetil-ciclohexancarboxílico; **2 β -[2'(m-isopropilfenil)etil]-1 β .3 α -dimetil-ciclohexancarboxílico