

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado



CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Determinación de la composición fenólica y actividad
antioxidante en brotes de clones de *Pinus pinaster*
procedentes de tres orígenes contrastantes**



Silvia Baizán González
Julio de 2013

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

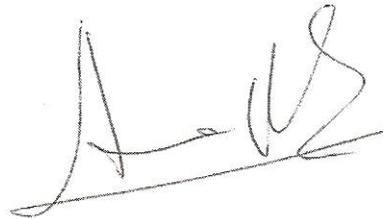
**Determinación de la composición fenólica y actividad
antioxidante en brotes de clones de *Pinus pinaster*
procedentes de tres orígenes contrastantes**



Silvia Baizán González



Isabel Feito Díaz



Ana Rodríguez Alonso

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Isabel Feito por su inestimable ayuda a la hora de realizar este trabajo y porque, una vez más, gracias a ella he podido entregar a tiempo. No tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí y todas las horas que me has dedicado. Eres una gran directora y una persona aún mejor; muchas gracias Isa.

A mi codirectora Ana Rodríguez por apoyarme en esta etapa final del Máster y por las correcciones de última hora con el tiempo en contra.

A Juan Majada, Director Científico de la Fundación CETEMAS y al SERIDA por permitirme, una vez más, realizar con ellos mi Trabajo Fin de Máster.

A Francisco Fuente. Fran gracias por enseñarme todo sobre las extracciones y demás técnicas de laboratorio y gracias por tu ayuda con todos los análisis complicados (ese DPPH maligno que no me deja dormir por las noches, jajaja). Muchas gracias por implicarte en las prácticas del Máster y en este trabajo y, qué más puedo decir, que eres el rey del laboratorio.

A mis compañeros Andrea, Ângelo y Antonio por echarme una mano con el muestreo. Y sobre todo a Andrea gracias por escucharme y aconsejarme en mis momentos de agobio total.

A Víctor por ayudarme con el análisis estadístico cuando las cosas se complicaron.

A mi hermana Elisa, ya que si no fuera por ella y por todo lo que hace por mí cada día no podría haber llegado hasta aquí.

Y por último quiero dar las gracias a Juan Miguel, mi otra mitad. Gracias por soportar mis enfados, por demostrarme que todo se puede, por la simpleza con que ves las cosas, por no reprocharme nunca nada, por tomar lo poco que te doy, por lo mucho que me das, por tu sonrisa, por tus abrazos y por estar en mi vida.

ABREVIATURAS

A	Absorbancia a cada una de las diferentes longitudes de onda
AA	Absorbancia de las antocianinas corregidas
AB	Absorbancia del blanco
AE	Absorbancia del estándar
ARMY	Armayán, Asturias
ASPE	Arenas de San Pedro, Ávila
CDVO	Cadavedo, Asturias
CIELAB	Modelo cromático usado para describir los colores que puede percibir el ojo humano
COCA	Coca, Segovia
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EQ	Equivalentes de quercetina
ε	Coefficiente de absorbancia molar
IC₅₀	Concentración al 50% de inhibición
MeOH	Metanol
MIMI	Mimizán, Francia
ORIA	Oria, Amería
PLEU	Plaucadec, Francia
PTOV	Puerto de Vega, Asturias
SCRI	San Cipriano, Pontevedra
TAMR	Tamrabta, Marruecos

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
Material vegetal	6
Productos químicos	7
Extracción de compuestos fenólicos	7
Cuantificación de fenoles totales	7
Cuantificación de flavonoides	9
Cuantificación de antioxidantes	9
Cuantificación de pigmentos.....	11
Análisis estadístico	12
RESULTADOS	13
Variables cromáticas.....	13
Variables químicas	17
Relación entre variables cromáticas y variables químicas.....	22
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES	29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

RESUMEN

Pinus pinaster es una especie de gran importancia económica y ecológica y que presenta una gran diversidad genética. En nuestro grupo de trabajo disponemos de una colección clonal representativa de toda el área de distribución natural de la especie. En una parcela que alberga un ensayo anidado de 10 procedencias x 5 familias x 5 clones x 8 copias y con distribución de bloques aleatorizados, se evaluó la variabilidad del color en base al Espacio de Color CIELAB de los brotes que emergen en primavera, observándose que las procedencias del sur presentan una coloración claramente diferencial a las del norte. Además, en tres de estas procedencias, seleccionadas en base al color y a su lugar de origen (Cadavedo, Oria y Tamrabta), se analizó la composición en fenoles totales, flavonoides, clorofilas a y b, carotenoides y antocianinas. Posteriormente se determinó la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de los dos clones de *P. pinaster* más contrastantes. En cuanto a los resultados obtenidos, respecto a la composición química, destaca la procedencia de latitud más al norte, Cadavedo, por su contenido en antocianinas. La actividad antioxidante parece ser, sin embargo, superior en el clon analizado de la procedencia de latitud más al sur, Tamrabta, lo cual puede deberse a que contenga una mayor cantidad del resto de compuestos antioxidantes y que, en el estudio realizado, aunque superiores, no llegaron a ser significativos, posiblemente por la variabilidad de las muestras y el número de las mismas analizado. Los datos de color muestran correlación significativa con la concentración de antocianinas y flavonoides. La cantidad de pigmentos acumulados en los tejidos parece relacionarse con la latitud y la altitud de los lugares de origen de estas poblaciones, mediado quizá por las condiciones de luz y temperatura.

ABSTRACT

Pinus pinaster is a species of great economic and ecological importance which also has high genetic diversity. In our working group we have a clonal collection representing the entire natural range of the species. In a plot with a nested trial comprising 10 origins x 5 families x 5 clones x 8 replications and with a randomized block distribution, color variability of shoots emerging in spring was assessed based on the Color Space CIELAB, and it was observed that southern provenances clearly exhibit different staining to northern. Moreover, in three of these provenances, selected according to color and place of origin (Cadavedo, Oria and Tamrabta) further analysis was carried out to establish total phenolic composition, flavonoids, chlorophyll a & b, carotenoids and anthocyanins. Subsequently the antioxidant capacity of the extracts obtained from the two most contrasting clones of *P. pinaster* was analyzed. Results with regard to chemical composition showed the most northern provenance, Cadevedo, was found to have noteworthy anthocyanin content. Antioxidant activity seems to be, however, higher in the clone from the most southerly latitude, Tamrabta, probably related with the high levels of other antioxidant compounds studied. The color data shows a significant correlation with the concentration of anthocyanins and flavonoids. The amount of pigments accumulated in the tissues appears to be associated with latitude and altitude of the places of origin of these populations, perhaps mediated by light and temperature conditions.

INTRODUCCIÓN

Pinus pinaster Aiton. es una especie de gran interés económico y ecológico. Este interés se debe, fundamentalmente, a su amplia distribución natural, que se extiende por las regiones costeras europeas y africanas del mediterráneo occidental y por el litoral atlántico de Portugal, España y Francia, a su capacidad de crecer en suelos pobres y bajo períodos de sequía prolongada (Alía y Martín, 2009) y a la gran diversidad genética de la especie, que da lugar a diferencias de comportamiento en función de la procedencia. De éstas, las más importantes son las de forma, crecimiento (Rycroft y Wicth, 1947; Sweet y Thulin, 1962; Molina, 1965; Harris, 1966 y Matziris, 1982) y adaptación a diferentes condiciones ecológicas, como la distinta sensibilidad al frío y/o la sequía (Nguyen y Lamant, 1989). Por todas estas razones resulta interesante caracterizar el comportamiento de las procedencias de *P. pinaster* de regiones con climas contrastantes y utilizarla así como modelo para el desarrollo de estudios genómicos y transcriptómicos (esta especie ha sido propuesta como una de las especies modelo en la Red de Excelencia Europea EVOLTREE).

Dentro del Proyecto “Mejora, adaptación y variación fenotípica de *P. pinaster* Aiton. (CLONAPIN)” (RTA2010-00120-00-00) y empleando los materiales genéticos del programa de conservación y mejora genética desarrollado conjuntamente por el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Alimentario (SERIDA) y el Centro de Investigación Forestal (CIFOR)/ Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), se instaló una parcela que alberga 10 procedencias de diferentes orígenes geográficos que representan toda la variabilidad N-S de la especie, desde Francia hasta Marruecos (Tabla 1, Figura 1) y que está siendo objeto de distintos estudios dentro del grupo de investigación, como son la evaluación de los mecanismos de respuesta a estrés hídrico o de tolerancia al frío (Baizán *et al.*, 2011; Martínez-Alonso *et al.*, 2011; De la Torre *et al.*, 2013) o el abordaje desde diferentes perspectivas del modelo de crecimiento de los pinos: fenología vegetativa y floral, crecimiento en altura y reparto de biomasa o dominancia apical y policiclismo.

Tabla 1. Ubicación y datos climáticos de las procedencias objeto de estudio. Sánchez-Gómez *et al.*, 2010.

Abreviaturas	Población	País	Latitud y longitud	Altitud (m)	Precipitación (mm)	T Anual Media (°C)	Índice de Aridez
ARMY	Armayán	España	43° 18'N 6° 29'W	532	1160	11,8	0
ASPE	Arenas de San Pedro	España	40° 12'N 5° 3'W	728	1318	14,2	69.4
CDVO	Cadavedo	España	43° 32'N 6° 25'W	180	1316	13,2	0.8
COCA	Coca	España	41° 15'N 4° 30'W	780	454	12,3	51.4
MIMI	Mimizan	Francia	44° 12'N 1° 13'W	20	935	13,2	0
ORIA	Oria	España	37° 30'N 2° 20'W	1150	357	13,1	110
PLEU	Pleucadec	Francia	47°47'N 2°20'W	80	855	12,0	0
PTVO	Puerto Vega	España	43° 33'N 6° 38'W	98	1283	13,4	4.9
SCRI	San Cipriano	España	42° 07'N 8° 12'W	727	1600	12,3	15.8
TAMR	Tamrabta	Marruecos	33° 36'N 5° 01'W	1760	763	10,8	67.9

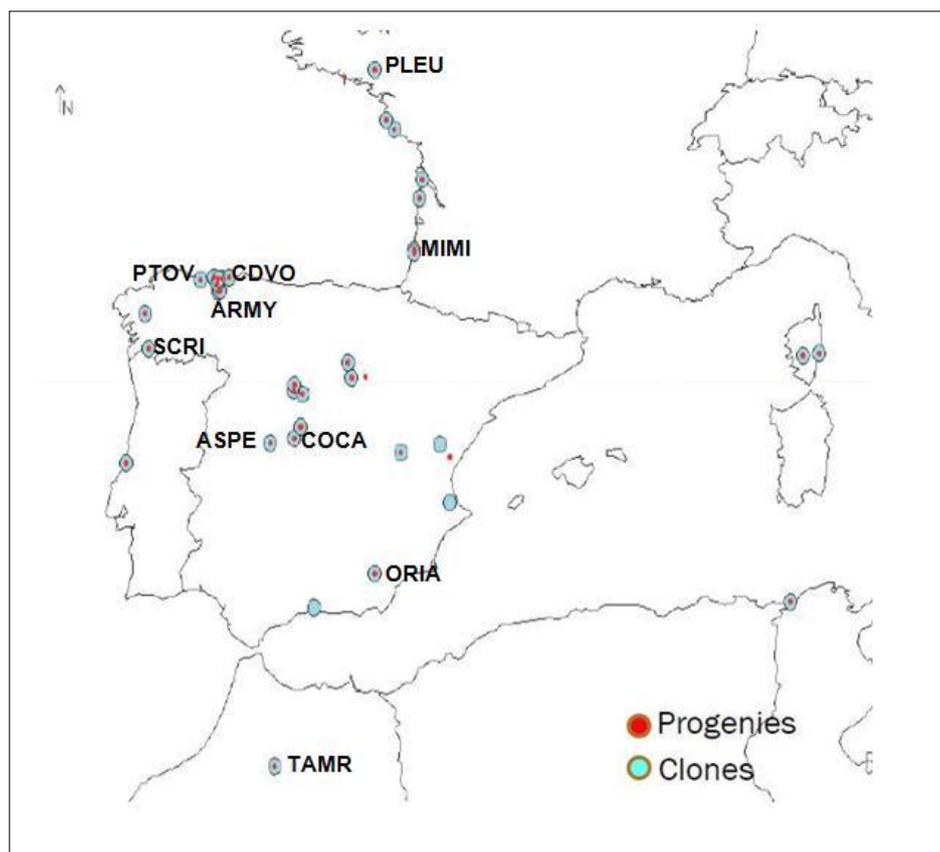


Figura 1. Mapa de distribución de las 10 poblaciones de *P. pinaster* objeto de estudio.

La observación conjunta y detallada, necesaria para describir la fenología, de las plantas de diferentes poblaciones en una misma parcela nos hizo darnos cuenta que la coloración de los brotes cuando emergen tras la parada invernal era diferente en algunas plantas. El color en las plantas depende de las concentraciones en que se encuentran los pigmentos y de las transformaciones a las que éstos se ven sometidos. Los compuestos coloreados que se encuentran en las plantas: clorofilas (verde), carotenoides (amarillos), antocianinas (rosas, púrpuras, y rojos) y flavonoides (amarillos) están integralmente relacionados con la fisiología de la planta (Sims y Gamon, 2002). Debido a su importancia en la funcionalidad de las hojas, las variaciones en el contenido de dichos pigmentos pueden proporcionar información sobre el estado fisiológico de la planta.

La clorofila tiende a disminuir con mayor rapidez que los carotenoides cuando las plantas están bajo estrés o durante la senescencia foliar. El contenido en antocianinas tiende a ser más alto en las hojas jóvenes con bajas tasas fotosintéticas, en hojas donde el crecimiento ha sido limitado por bajas temperaturas u otros tipos de estrés, y en hojas senescentes en ciertas especies (Sims y Gamon *et al.*, 2001). Por tanto, el ambiente que rodea al árbol (luz, fotoperiodo, temperatura, déficit hídrico, etc.), condiciona la cantidad de metabolitos secundarios que acumula en sus tejidos.

La respuesta plástica y de adaptación de las poblaciones al ambiente mediada por el metabolismo secundario está condicionada por el papel de estos compuestos en la protección de la planta. Así por ejemplo, en la fotoprotección, proceso complejo que conduce no sólo a cambios fisiológicos en el contenido de pigmentos, sino también cambios a nivel transcriptómico, los carotenoides y las antocianinas ayudan a disipar el exceso de energía evitando así daños en el sistema fotosintético y protegiendo las hojas del exceso de luz, (incluyendo UV).

El poder antioxidante de todos los compuesto de naturaleza fenólica a través de su propia oxidación, protegiendo así a otras moléculas como ácidos grasos, proteínas, carbohidratos, etc., o secuestrando radicales libres, parece ser general en el mundo vegetal (Zivkovic *et al.*, 2009). Las antocianinas puede servir como secuestradores de las especies reactivas del oxígeno (Valledor *et al.*, 2012).

Los compuestos de naturaleza fenólica también se ha visto que están implicados en la respuesta de defensa frente a estrés biótico. En algunos tejidos de la planta se observan células que parecen estar destinadas al almacenaje de sustancias fenólicas que son liberadas en el momento de la agresión. Estas células se encuentran en sitios estratégicos y liberan fenoles dando lugar a una respuesta primaria de lignificación o

formando barreras químicas y a una respuesta secundaria modificando el metabolismo hormonal, como las auxinas, en las que incrementan síntesis y reducen transporte y oxidación (Beckman, 2000).

Los días largos con noches frías, propios de la zona norte, parecen incrementar la producción de compuestos aromáticos (Davik *et al.*, 2006), de ahí que la latitud sea uno de los parámetros de interés en nuestro estudio. Aunque existen referencias en este sentido, no se han publicado demasiados trabajos que lo avalen en el mundo forestal. Sin embargo, en el campo de los alimentos, existen numerosas publicaciones al respecto. Así por ejemplo, se sabe que el color de las fresas es más intenso en las latitudes norte que en las sur o que los arándanos de las latitudes norte tienen más antocianinas que los del sur (Lätti *et al.*, 2008).

Que existe una interacción genotipo/ambiente y una adaptación local se puede deducir del trabajo sobre *P. sylvestris* realizado por Oleszek *et al.*, (2002) en el que los autores concluyeron que existía una relación entre el nivel de flavonoides y la latitud de origen. Las latitudes de origen de las poblaciones ensayadas por estos autores iban desde los 40° 30'N a los 63° 53'N y los árboles del ensayo se encontraban a 51° 37'N, donde llevaban 80 años creciendo. Curiosamente, los árboles procedentes de las latitudes más al norte mostraron los niveles más bajos de taxifolin 3'-O-glucosido, quercetina, taxifolina y flavonoides totales. Este hecho se explicó a través de una adaptación local, pero no fue avalado por datos de lo que ocurre en su lugar de origen.

En *Betula pubescens* se observó una variación en el contenido foliar de derivados de la quercetina, que se correlacionaba positivamente con la latitud, mientras que el total de flavonoides permanece constante (Stark *et al.*, 2008). Los derivados de la quercetina muestran mayor poder antioxidante que otros flavonoles y suelen ser los que se describen en relación con la protección frente a la luz. La adaptación genética a la variación del ambiente según latitudes se pone de manifiesto en algunas especies cuya área de distribución latitudinal es amplia, caso de *Oxyria digyna* cuando se cultiva en condiciones controladas, donde se vio que los ecotipos de 45° N, 60° N y 78° N mostraban una tasa entre flavonoides di- y mono-hidroxilados que se incrementaba de sur a norte (Nybakken *et al.*, 2004).

Uno de los objetivos del Proyecto RTA2010-00120-00-00, citado anteriormente, era la búsqueda de parámetros morfofisiológicos de rápida medición relacionados con la variabilidad y adaptación del *P. pinaster* a los diferentes ambientes en que es capaz de crecer, con el objeto de desarrollar herramientas que permitan realizar un fenotipado masivo que puedan ser utilizadas en estudios de asociación.

Ya que el color es un parámetro de fácil y rápida medición y además muestra una relación con la concentración de pigmentos que, a su vez, están relacionados con las defensas de la planta, se planteó como objetivos parciales:

- Valorar la variabilidad del color de los brotes de *P. pinaster* que emergen del verticilo de invierno y su posible relación con la latitud.
- Establecer la relación entre las variables cromáticas y la composición de pigmentos de los tejidos.
- Estudiar la posible relación entre la composición en pigmentos de estos tejidos y la capacidad antioxidante de los extractos como medio para establecer su papel en la defensa frente a estrés oxidativo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron brotes de ramas laterales de clones de *Pinus pinaster* obtenidos por esquejado e instalados en 2010 en una parcela experimental perteneciente al SERIDA en La Mata (Grado, Asturias; 43° 32'N 7°00'W, 65 m). La parcela alberga 10 procedencias (ARMY, ASPE, CDVO, COCA, MIMI, ORIA, PLEU, PTOV, SCRI y TAMR) (Tabla 1) que representan todo el área de distribución natural de la especie y el ensayo comprende 5 familias por procedencia (cada familia procede de un árbol madre separado al menos 50 m de las otras madres), 5 clones de cada familia y 8 copias de cada clon, distribuidas en bloques aleatorizados.

El 2 de mayo de 2013 se tomaron datos de color del brote mediante lectura directa con un colorímetro (Chroma Meter CR-410 de Konica Minolta, Japón). Se tomaron los valores CIE L*a*b* (CIELAB) que es el modelo cromático usado normalmente para describir todos los colores que puede percibir el ojo humano. Los tres parámetros en el modelo representan la luminosidad de color (L*, L*=0 rendimientos negro y L*=100 indica blanca), su posición entre rojo y verde (a*, valores negativos indican verde mientras valores positivos indican rojo) y su posición entre amarillo y azul (b*, valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo).

Además de las constantes L*, a* y b* se han incluido los valores de: Hue (= tono) y Chroma (=intensidad), que se calculan a partir de las primeras mediante las fórmulas CIE (1986):

Hue= arco tangente (b*/a*)

Chroma= $(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$

Posteriormente se seleccionaron 3 procedencias de clima contrastante para los análisis químicos: CDVO de Asturias, ORIA de Almería y TAMR de Marruecos y, de cada procedencia, se muestrearon 4 clones de diferente familia. El muestreo se realizó el 10 mayo de 2013 y se recogieron brotes de 2 plantas por clon y 3 réplicas por árbol.

Productos químicos

Metanol para análisis de J.T Baker (Phillipsburg, USA); carbonato sódico y ácido clorhídrico de Panreac Química S.L.U. (Barcelona, España); ácido gálico, reactivo de Folin-Cicalteu, cloruro de aluminio anhidro, quercetina y 2,2-difenil-1-picrilhidrazil de Sigma-Aldrich (Madrid, España); acetona y tampón tris de Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, España).

Extracción de compuestos fenólicos

Se seleccionó el protocolo descrito por Nair *et al.*, (2012) para la extracción de fenoles y flavonoides y para la valoración de la actividad antioxidante. Las extracciones se realizaron partiendo de 1 g de muestra liofilizada (LYOQUEST-55 PLUS, Telstar Life Science Solutions, Tarragona, España) y triturada en nitrógeno líquido con molino criogénico (6770 Freezer/Mill de SPEX SamplePrep, Stanmore, Reino Unido), a la que se le añadió 30 mL de metanol (MeOH). Se agitó de forma invertida (REAX 2 de Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania), durante 1 h a T^a ambiente y oscuridad, se filtró (filtros de fibra de vidrio AP27 de 37 mm de Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) y el residuo obtenido se reextrajo con otros 30 mL de MeOH, y se agitó y filtró en iguales condiciones. Se combinaron los extractos y se llevaron a sequedad en rotavapor (LABOROTA 4002 de Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania). El residuo seco obtenido se pesó (Adventure Pro AV264 C de Ohaus Corporation, Pine Brook, USA) y se redisolvió en MeOH, a una concentración de 10 mg mL⁻¹, del que se tomaron alícuotas para las diferentes valoraciones. Para todos los análisis se utilizaron métodos espectrofotométricos (lector de microplacas Synergy HT de Biotek Instruments, Winooski, USA) que hemos adaptado para la determinación en placa de 96 pocillos (Sero-Well[®] de Bibby Sterilin Ltd, Stone, Staffs, Reino Unido). Todas las valoraciones se realizaron por cuadruplicado.

Cuantificación de fenoles totales

Para la cuantificación de fenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (ensayo descrito en el Compendium of International of Analysis, de la Organización Internacional de la Viña y el Vino, edición 2011, por el método OIV-MA-AS2-10) reduciendo proporcionalmente los volúmenes de reacción de forma que el total fuese

inferior a los 400 μL , que es la capacidad máxima de los pocillos de la placa utilizada. Se realizó una curva de calibración de ácido gálico en un rango de concentraciones de 0,0125- 0,8 mg mL^{-1} . En cada pocillo se añadió 10 μL de muestra, estándar o MeOH (en el caso del blanco), 215 μL de agua desionizada, 15 μL de reactivo comercial de Folín-Cicalteu y 60 μL de Na_2CO_3 (20 %, p/v). Tras agitar e incubar 30 min a 25°C se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg EAG g^{-1} PS).

Cuantificación de flavonoides

Para la cuantificación de flavonoides, concretamente para flavonoles y flavonas, se utilizó el método descrito por Meda *et al.*, (2005) reduciendo proporcionalmente todas las cantidades con la misma finalidad que para la valoración de los fenoles totales. Para la curva de calibrado se utilizó quercetina (0,625 – 500 mg L^{-1}). A cada pocillo se añadió 50 μL de muestra o estándar y 50 μL de AlCl_3 (2%, p/v) y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 415 nm tras 10 min de reacción a Tª ambiente. Para los blancos se añadieron 50 μL de la muestra o estándar y 50 μL de MeOH. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por gramo de peso seco (mg EQ g^{-1} PS).

Cuantificación de antioxidantes

Para los dos clones más contrastantes, en cuanto a contenido en antioxidantes, de todos los que forman parte del ensayo (un clon de la procedencia TAMR y otro de CDVO) se determinó el efecto antioxidante derivado del secuestro de radicales libres se realizó mediante el ensayo DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), según describieron Simirgiotis *et al.*, (2010). La metodología utilizada ya está adaptada para su realización en placa de 96 pocillos pero hubo que modificar algunos de los parámetros por qué el control positivo no mostraba el valor esperado como antioxidante. Se ajustaron las concentraciones de DPPH y ácido gálico mediante la realización de 3 curvas en las que el DPPH se aplicó a las 3 concentraciones más habituales descritas en la bibliografía (50, 100 y 200 μM) y recogidas en la revisión hecha por Sharma y Bhat (2009) y el ácido gálico a concentraciones crecientes desde 0,125 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ según describieron estos autores. A partir de las curvas obtenidas estimamos que la concentración óptima para DPPH era de 100 μM y la del ácido gálico para un 50% de inhibición de 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Partiendo del extracto que, como se

menciona anteriormente, tiene una concentración de 10 mg mL^{-1} , se hizo una dilución seriada desde 120 hasta $7,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. En cada pocillo se añadió 50 μL de muestra (de cada una de las diluciones), MeOH (como blanco), ácido gálico a una concentración de $6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (como control positivo) y 150 μL de DPPH (100 μM). Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm tras 30 min de reacción a 30°C . El porcentaje de inhibición se determinó mediante la fórmula: $\% \text{ inhibición} = \frac{AB-AE}{AB} \times 100$, donde AB es la absorbancia del blanco y AE la absorbancia del estándar y de las diluciones de las muestras. Se representó el % de inhibición frente a la concentración de muestra y se estimó la concentración a la cual se obtuvo el 50% de inhibición (IC_{50}), este valor representa la capacidad antioxidante de la muestra y se expresa en $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Cuantificación de pigmentos

Para la cuantificación de clorofilas, carotenoides y antocianinas se utilizó el protocolo descrito por Sims y Gamon (2002). Para ello, a 100 mg de muestra se le añadieron 4 mL de una solución fría de acetona/tampón tris 100 mM (80/20, v/v, pH 7,8), para clorofilas y carotenoides y MeOH/HCl/H₂O (90/1/1, v/v/v) para las antocianinas. Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 5 min, se recogió el sobrenadante y se diluyó hasta un volumen final de 6 mL. Se midió la absorbancia a las longitudes de onda de 663, 537, 647 y 470 nm para clorofilas y carotenoides y a 529 y 650 nm para las antocianinas. Para los cálculos de las concentraciones se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Antocianinas } (\mu\text{moles mL}^{-1}) = 0,08173 A_{537} - 0,0069 A_{647} - 0,002228 A_{663}$$

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{moles mL}^{-1}) = 0,01373 A_{663} - 0,00897 A_{537} - 0,003046 A_{647}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{moles mL}^{-1}) = 0,02405 A_{647} - 0,004305 A_{537} - 0,005507 A_{663}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{moles mL}^{-1}) = (A_{470} - 17,1(\text{clorofila a} + \text{clorofila b}) - 9,479 \text{ Antocianinas}) / 119,26$$

Siendo A la absorbancia a cada una de las diferentes longitudes de onda indicadas.

Aunque las antocianinas se pueden valorar con la fórmula indicada anteriormente, Sims y Gamon (2002) recomiendan la extracción ácida y la cuantificación corregida que evita la absorción debida a las clorofilas degradadas.

$$\text{Antocianinas } (\mu\text{moles mL}^{-1}) = \text{AA}/\epsilon l$$

Siendo AA (absorbancia de las antocianinas corregidas) = $A_{529} - (0,288 A_{650})$; ϵ (coeficiente de absorbancia molar para antocianinas) = $30000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y l (la longitud atravesada por el haz de luz) = 1 cm.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software estadístico R. (R Core Team, 2013).

Los datos fueron analizados mediante un modelo mixto generalizado de tipo *Poisson*, usando como factores fijos la procedencia y las familias anidadas dentro de las procedencias, y como factor aleatorio los individuos. Para poder comparar las procedencias se llevó a cabo un test *post-hoc* de Tukey con las estimaciones del modelo.

Para agrupar las familias según las variables de color analizadas se llevó a cabo un análisis de *cluster* jerárquico aglomerativo con los valores medios para cada familia, obteniéndose el dendrograma correspondiente.

Para determinar la relación entre variables cromáticas y variables químicas, se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre con la aplicación estadística SPSS Inc.® Win™ vs. 15.0.

RESULTADOS

Variables cromáticas

En la Figura 2 se representan, en 3 dimensiones, el promedio por clon de las variables cromáticas (L^* , a^* , b^*) de todas las procedencias que forman parte del ensayo: ARMY, ASPE, CDVO, COCA, MIMI, ORIA, PLEU, PTOV, SCRI y TAMR. Se observa que la procedencia de la latitud más al sur, TAMR, se separa claramente de las de latitudes más al norte. ORIA, que latitudinalmente se encontraría en la zona media, se distribuye también en la zona media del gráfico, con alguno de los clones próximo a los del norte, pero en su mayoría más próximos a TAMR. Sin embargo, las procedencias del norte se entremezclan formando un único conjunto.

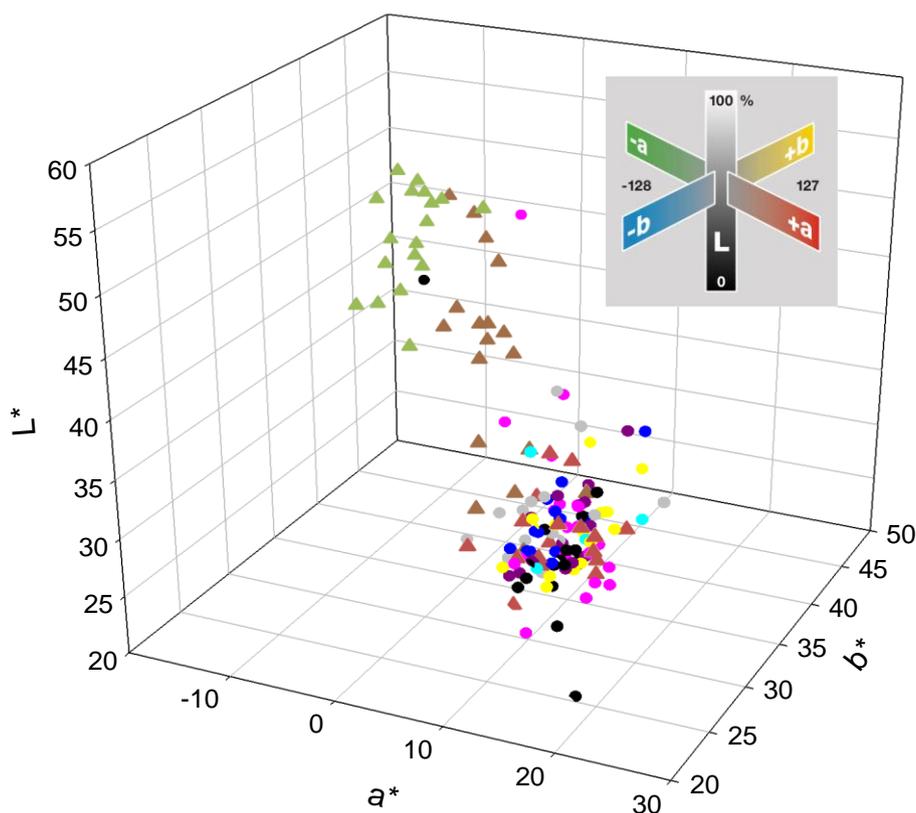


Figura 2. Variables cromáticas (L^* , a^* , b^*) medidas en los clones de 10 procedencias de *Pinus pinaster*: ● ARMY, ● ASPE, ● COCA, ● MIMI, ● PLEU, ● PTOV, ● SCRI, ▲ CDVO, ▲ ORIA y ▲ TAMR.

En la Tabla 2 se muestran las diferencias significativas existentes entre las distintas procedencias de *P. pinaster* estudiadas.

Tabla 2. Análisis de varianza de las variables cromáticas (L*a*b*, Hue y Chroma) Niveles de significación: (***) P<0,001; (**) P<0,01; (*) P< 0,05.

	L*	a*	b*	Hue	Chroma
ASPE-ARMY					
CDVO-ARMY					
COCA-ARMY			*		*
MIMI-ARMY					
ORIA-ARMY	*	***	***	***	***
PTOV-ARMY					
SCRI-ARMY					
TAMR-ARMY	***	***	***	***	***
CDVO-ASPE					
COCA-ASPE					
MIMI-ASPE					
ORIA-ASPE	*	***	***	***	***
PTOV-ASPE					*
SCRI-ASPE					
TAMR-ASPE	***	***	***	***	***
COCA-CDVO			*		***
MIMI-CDVO					
ORIA-CDVO	**	***	***	***	**
PTOV-CDVO					
SCRI-CDVO					
TAMR-CDVO	***	***	***	***	***
MIMI-COCA					
ORIA-COCA	***	***	***	***	***
PTOV-COCA			***		***
SCRI-COCA					***
TAMR-COCA	***	***	***	***	***
ORIA-MIMI	**	***	***	***	***
PTOV-MIMI					
SCRI-MIMI					
TAMR-MIMI	***	***	***	***	***
PTOV-ORIA		***	***	***	
SCRI-ORIA	**	***	***	***	**
TAMR-ORIA		***	*	***	
SCRI-PTOV					
TAMR-PTOV	***	***	***	***	***
TAMR-SCRI	***	***	***	***	***

En el dendrograma obtenido con estos mismos datos de color, más los valores de Hue y Chroma calculados, se observa que las familias de ORIA y TAMR se agrupan formando *clusters* bien definidos y que, a su vez, ambas procedencias se agrupan en un *cluster* superior que se separa del resto de procedencias (Figura 3). El resto de familias forman otro *cluster* en el que la agrupación es muy variable, siendo la procedencia CDVO la que muestra familias con menor distanciamiento.

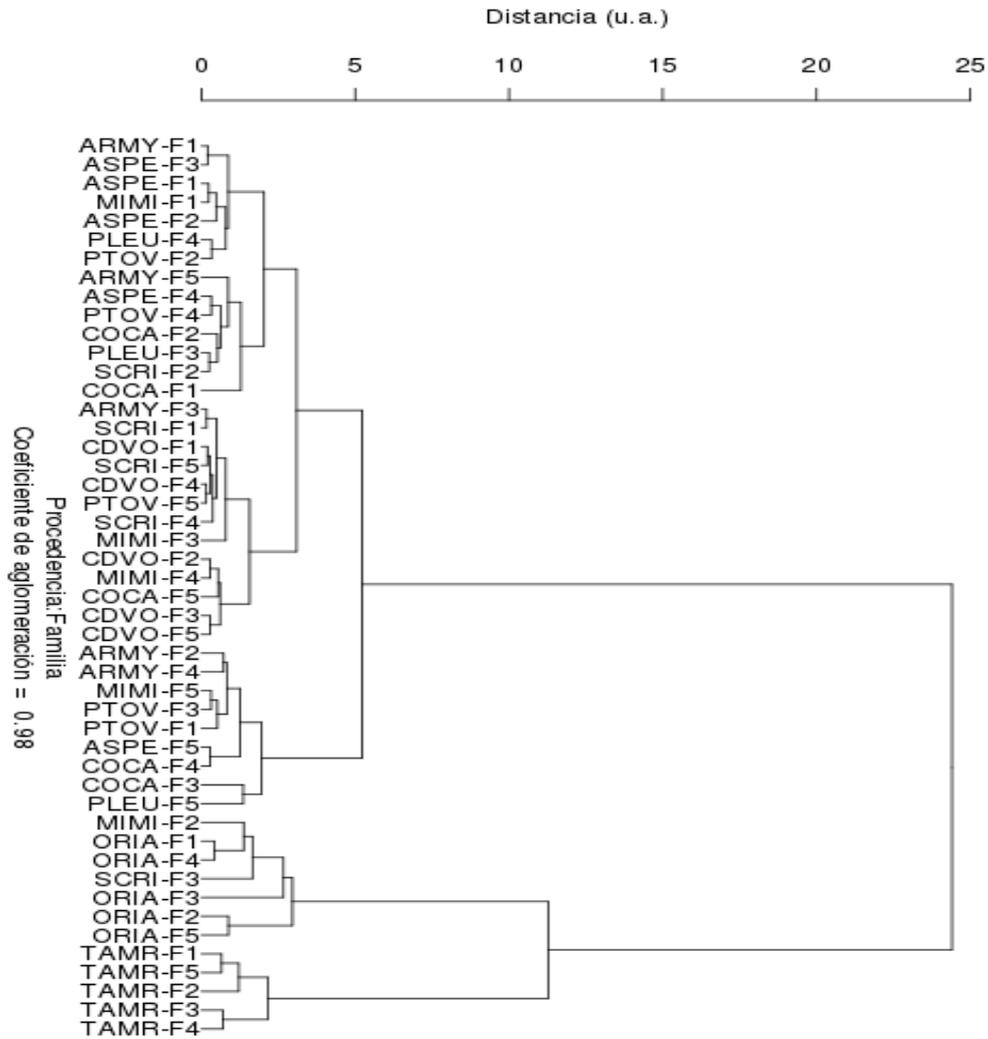


Figura 3. Dendrograma de relación de las procedencias y sus familias en función de los parámetros de color ($L^*a^*b^*$).

Este agrupamiento nos llevó a seleccionar las procedencias ORIA y TAMR, por su carácter contrastante, y una procedencia que representase al *pool* de la zona atlántica, seleccionándose CDVO por su mayor uniformidad. Dentro de las procedencias se seleccionaron a su vez 4 clones, correspondientes a 4 familias representativas de la procedencia (Figura 4).

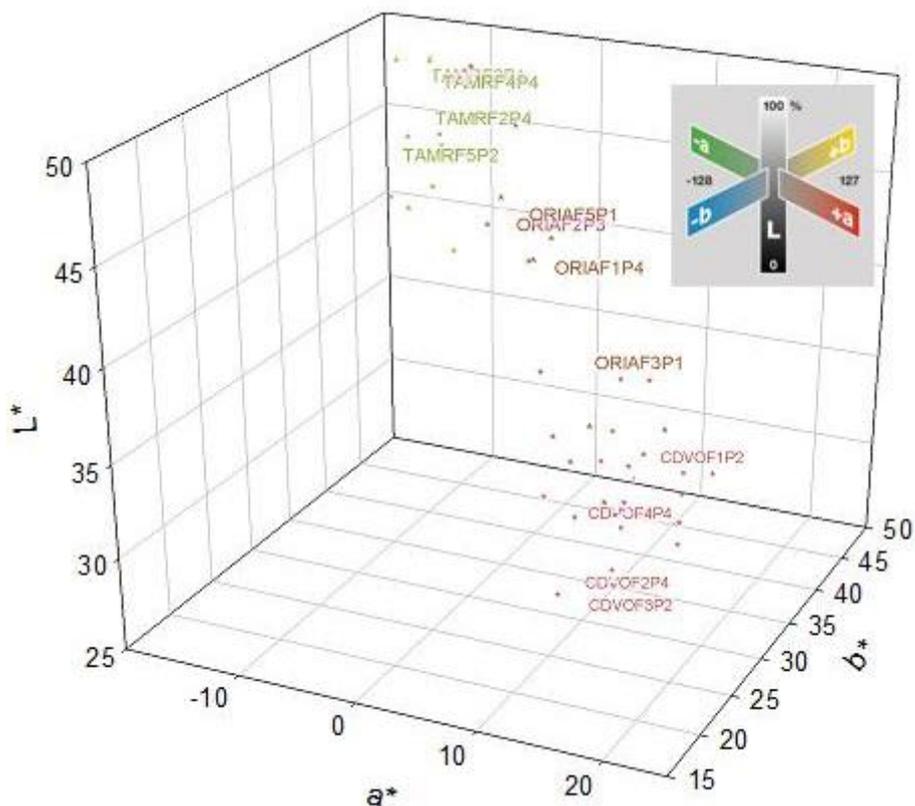


Figura 4. Variables cromáticas (L^* , a^* , b^*) de las familias elegidas como representantes de las 3 procedencias más contrastantes (CDVO, ORIA y TAMR).

Variables químicas

La concentración de los compuestos analizados en las procedencias seleccionadas como más contrastantes se muestra en la Tabla 3. Sólo se observan diferencias significativas ($P < 0,05$) en la concentración de antocianinas, siendo la más elevada en la población CDVO y, por el contrario, detectándose la menor cantidad en TAMR. Para el resto de parámetros las diferencias entre procedencias no son significativas ($P < 0,05$), sin embargo, se observa que TAMR tiende a poseer el mayor contenido en fenoles totales, flavonoides, clorofilas y carotenoides y, por el contrario, CDVO la menor concentración de estos compuestos.

En esta tabla se recogen, además, los coeficientes de variación (CV) por procedencia. Este coeficiente, que muestra la variabilidad ponderada respecto a la media, nos indica que los datos obtenidos para las familias de la procedencia CDVO son los que más variación presentan.

Tabla 3. Valores medios (\pm error estándar) y coeficiente de variación (CV) del contenido en fenoles totales (mg EAG g⁻¹ PS), flavonoides (mg EQ g⁻¹ PS), clorofila a, clorofila b, carotenoides y antocianinas (μ moles g⁻¹ PS) para las procedencias CDVO, ORIA y TAMR. Letras distintas muestran diferencias significativas entre procedencias. Test de Tukey P < 0,05.

	CDVO		ORIA		TAMR	
	Media \pm error	CV (%)	Media \pm error	CV (%)	Media \pm error	CV (%)
Fenoles totales (mg EAG g ⁻¹ PS)	24,53 \pm 0,55 a	21,91	26,16 \pm 0,50 a	18,85	28,26 \pm 0,39 a	13,47
Flavonoides (mg EQ g ⁻¹ PS)	4,10 \pm 0,14 a	33,92	5,20 \pm 0,09 a	17,89	5,57 \pm 0,07 a	13,12
Clorofila a (μ moles g ⁻¹ PS)	0,56 \pm 0,02 a	29,88	0,59 \pm 0,01 a	19,67	0,67 \pm 0,02 a	23,29
Clorofila b (μ moles g ⁻¹ PS)	0,22 \pm 0,01 a	23,61	0,22 \pm 0,00 a	20,81	0,24 \pm 0,01 a	23,61
Carotenoides (μ moles g ⁻¹ PS)	0,28 \pm 0,01 a	26,36	0,31 \pm 0,01 a	16,01	0,33 \pm 0,01 a	22,67
Antocianinas (μ moles g ⁻¹ PS)	0,79 \pm 0,03 a	42,83	0,45 \pm 0,01 b	23,69	0,25 \pm 0,01 c	38,18

Para los fenoles totales (Figura 5), por familias, observamos que existe bastante variabilidad, encontrándose la mayor concentración en la familia 1 de ORIA (29,64 \pm 0,66 mg EAG g⁻¹ PS) y la menor en la familia 4 de CDVO (20,01 \pm 0,92 mg EAG g⁻¹ PS).

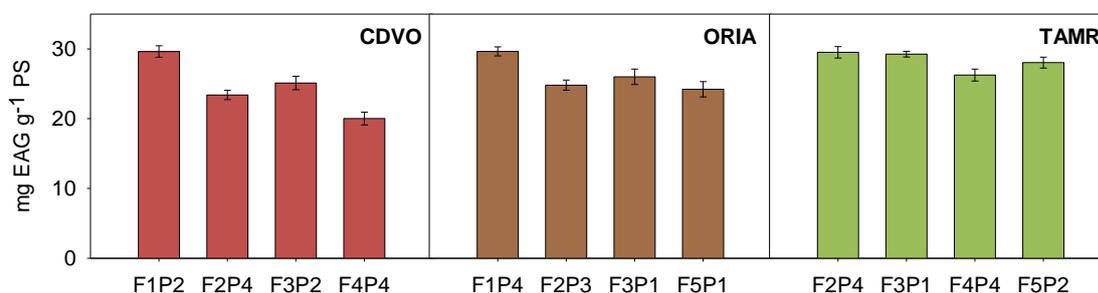


Figura 5. Valores medios (\pm error estándar) del contenido en fenoles totales en 4 familias de las 3 procedencias más contrastantes del ensayo (CDVO, ORIA y TAMR).

La familia 2 de TAMR muestra la concentración de flavonoides más elevada ($6,07 \pm 0,09$ mg EQ g^{-1} PS) y, al igual que en el contenido en fenoles totales, la familia 4 de CDVO es la que tiene un valor más bajo ($2,76 \pm 0,07$ EQ g^{-1} PS) (Figura 6).

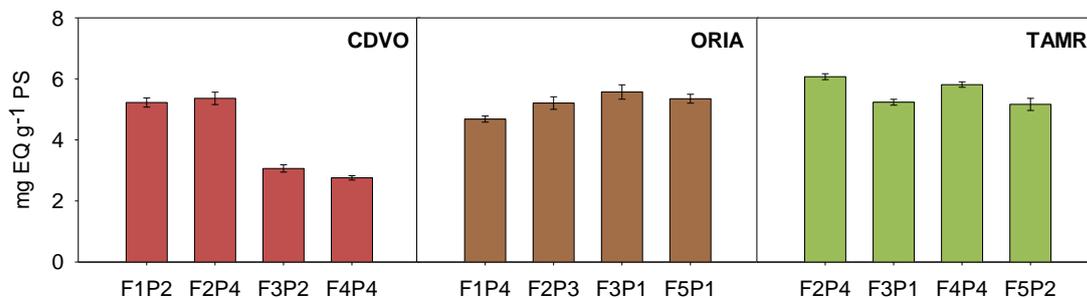


Figura 6. Valores medios (\pm error estándar) del contenido en flavonoides en 4 familias de las 3 procedencias más contrastantes del ensayo (CDVO, ORIA y TAMR).

En cuanto a los resultados de los distintos pigmentos analizados, clorofila a (Figura 7), clorofila b (Figura 8) y carotenoides (Figura 9), las concentraciones más altas se detectan en la familia 5 de TAMR ($0,78 \pm 0,04$; $0,29 \pm 0,01$ y $0,39 \pm 0,02$ μ moles mL^{-1} respectivamente) y los valores más bajos siguen observándose en la familia 4 de CDVO ($0,41 \pm 0,01$; $0,17 \pm 0,00$ y $0,23 \pm 0,01$ μ moles mL^{-1} respectivamente).

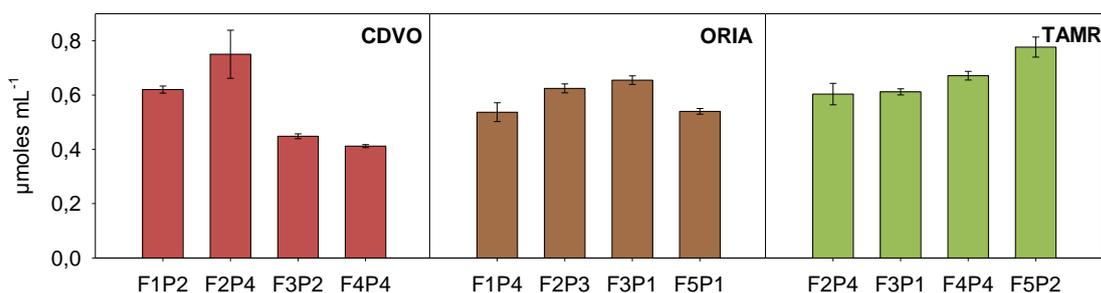


Figura 7. Valores medios (\pm error estándar) del contenido en clorofila a en 4 familias de las 3 procedencias más contrastantes del ensayo (CDVO, ORIA y TAMR).

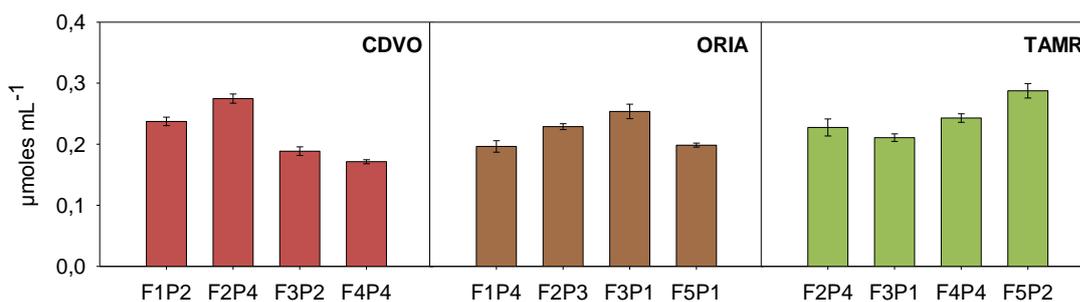


Figura 8. Valores medios (\pm error estándar) del contenido en clorofila b en 4 familias de las 3 procedencias más contrastantes del ensayo (CDVO, ORIA y TAMR).

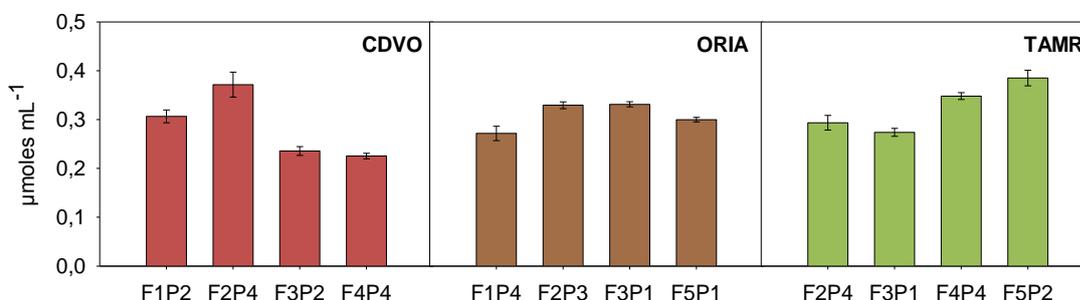


Figura 9. Valores medios (\pm error estándar) del contenido en carotenoides en 4 familias de las 3 procedencias más contrastantes del ensayo (CDVO, ORIA y TAMR).

La mayor concentración de antocianinas (Figura 10) se observa en la familia 3 de la procedencia CDVO ($0,95 \pm 0,02 \mu\text{moles mL}^{-1}$) y la que muestra un menor contenido de este compuesto es la familia 3 de TAMR ($0,20 \pm 0,01 \mu\text{moles mL}^{-1}$).

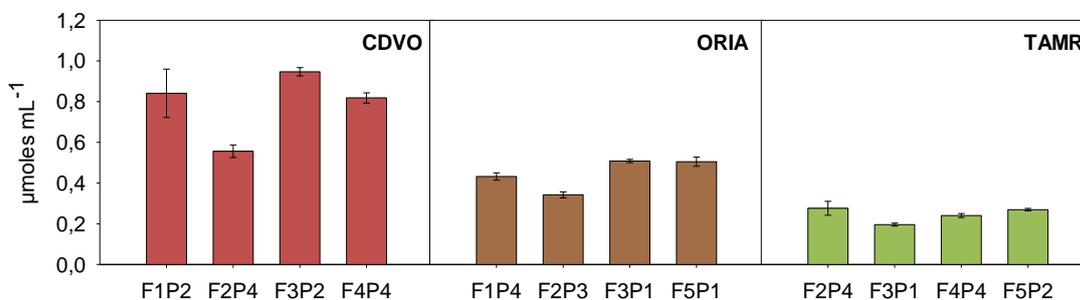


Figura 10. Valores medios (\pm error estándar) del contenido en antocianinas en 4 familias de las 3 procedencias más contrastantes del ensayo (CDVO, ORIA y TAMR).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en fenoles totales, flavonoides, carotenoides y antocianinas, para determinar la capacidad antioxidante se seleccionaron las procedencias más contrastantes, CDVO y TAMR, y, dentro de éstas, aquellos clones que mostraban mayores diferencias, F4P4 de CDVO y F2P4 de TAMR. En la Figura 11 se muestra la respuesta de la inhibición de la oxidación del DPPH a medida que se incrementa la concentración de la muestra. En ambos casos se ajusta a una curva sigmoide que no alcanza el 100%, por lo que el cálculo del IC_{50} se estima mediante los valores de las abscisas (concentración de la muestra en $\mu\text{g mL}^{-1}$) que corresponderían al valor de la ordenada (% de Inhibición) del 50%. Se observa que TAMR tiene una mayor capacidad antioxidante que CDVO, ya que para inhibir el 50% oxidación se necesita menor cantidad de muestra, $28,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente $37,88 \mu\text{g mL}^{-1}$.

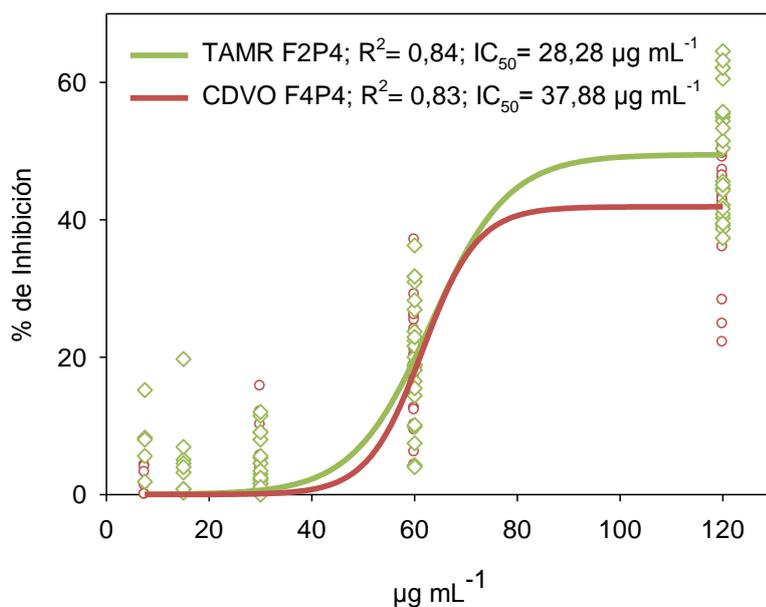


Figura 11. Curvas del % de Inhibición frente a la concentración de 2 familias de las 2 procedencias más contrastantes (CDVO y TAMR).

Relación entre variables cromáticas y variables químicas

Todas las variables cromáticas analizadas se correlacionan de manera significativa ($P < 0,05$) con el contenido en flavonoides y antocianinas. La componente b^* y el índice Hue también muestra una correlación significativa con el contenido en fenoles totales. Por el contrario, no parece existir correlación significativa de las variables e índices de color con las clorofilas y los carotenoides. La relación antocianinas/otros pigmentos muestra correlación con el color pero, en general, no mejora el valor del coeficiente obtenido con los pigmentos por separado (Tabla 4).

Tabla 4. Coeficientes de correlación de Pearson del contenido en fenoles, flavonoides, antocianinas, carotenoides, clorofila a, clorofila b y los índices formados por clorofila a+b, carotenoides/clorofilas, antocianinas/fenoles, antocianinas/flavonoides, antocianinas/carotenoides y antocianinas/clorofilas. Niveles de significación: (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$. N = 23 para todos los casos.

	L*	a*	b*	Chroma	Hue
Fenoles	0.292	-0.326	0.440*	0.334	0.491*
Flavonoides	0.539**	-0.453*	0.489*	0.464*	0.489*
Clorofila a	0.285	-0.362	0.187	0.350	0.158
Clorofila b	0.152	-0.293	0.037	0.223	0.021
Carotenoides	0.267	-0.306	0.134	0.310	0.080
Antocianinas	-0.663**	0.789**	-0.740**	-0.819**	-0.628**
Clorofila a+b	-0.054	0.216	-0.139	-0.141	-0.251
Carotenoides/Clorofilas	0.255	-0.335	0.153	0.322	0.126
Antocianinas/Fenoles	-0.652**	0.761**	-0.746**	-0.789**	-0.669**
Antocianinas /Flavonoides	-0.689**	0.687**	-0.683**	-0.718**	-0.617**
Antocianinas /Carotenoides	-0.628**	0.707**	-0.634**	-0.730**	-0.529**
Antocianinas /Clorofilas	0.641**	0.769**	0.721**	-0.803**	0.597**

DISCUSIÓN

Aunque prácticamente todos los estreses a los que se ven sometidas las plantas confluyen en último término en un estrés oxidativo, el frío y la luz son los dos factores que por excelencia conducen a este proceso químico a nivel celular. Ambos factores convergen en algunos de los ambientes en que crecen las coníferas. Así en especies perennes de climas fríos, como los *Juniperus* o *Piceas*, se ha visto que pueden sufrir fotoinhibición durante el invierno e incluso durante las primeras semanas de la primavera (Brzezinska y Kozłowska, 2008) debido a que la radiación activa absorbida por las hojas no puede ser utilizada en su totalidad para la fijación del CO₂ dada la temperatura ambiental baja. Este fenómeno no es solo habitual en las latitudes norte sino que también suele ocurrir en las zonas de montaña donde las primaveras continúan siendo frías.

La adaptación de la planta a este ambiente viene mediada por una mayor inversión en el metabolismo secundario. Para lograr esta inversión se ha visto que las plantas de climas fríos pueden mantener más altas tasas fotosintéticas a bajas temperaturas que las plantas de las zonas templadas, lo que les permite disponer de mayor cantidad de carbono para mantener el metabolismo secundario (Jaakola y Hohtola, 2010)

Una gran parte de los compuestos que forman parte del metabolismo secundario están implicados en las defensas de las plantas frente al estrés biótico y abiótico. Algunos de estos compuestos son los que además proporcionan coloración a los tejidos, tal es el caso de los carotenoides, que son los pigmentos que juegan un papel más importante en la protección del aparato fotosintético. Pueden actuar estabilizando las membranas de los cloroplastos o proporcionando energía para la fotosíntesis, pero también actúan disipando el exceso de energía (Demming *et al.*, 1997). En la misma situación estarían los flavonoides, que capturan las especies reactivas del oxígeno y evitan la peroxidación de los lípidos, existiendo evidencias de que las temperaturas bajas favorecen la producción de flavonoides con altos niveles de hidroxilación (Jaakola y Hohtola, 2010). En el caso de los antocianos, que darían el color rosa, violeta o rojo, actúan protegiendo a las hojas de los excesos de luz (Barker *et al.*, 1997; Dodd *et al.*, 1998).

La colección de materiales que se están ensayando en la parcela de *P. pinaster* de la finca de La Mata (SERIDA) alberga genotipos procedentes de todo el rango de latitudes correspondiente a la distribución natural de esta especie (Tabla 1; Figura 1). La apreciación visual de las diferencias de color en los brotes nos indujo a pensar en la posibilidad de que se tratase de un carácter diferencial y posiblemente debido al gradiente latitudinal de origen. Para corroborar que no se trataba de una apreciación subjetiva o de un efecto del ambiente diferencial, se optó por utilizar la herramienta más similar al ojo humano, pero que evita la componente subjetiva, y que fue el analizador de color en el Espacio de Color CIELAB.

La representación gráfica tridimensional de los parámetros obtenidos con este equipo (Figura 2) confirmó la diferencia de color según origen, pues agrupaba clones según su procedencia, fundamentalmente para aquellas del sur o mediterráneas. En las procedencias del norte se formaba un *pool* de puntos sin un orden aparente, lo cual podía deberse a que realmente no hubiese una separación o bien a que la representación tridimensional no permitiese observar las diferencias.

Con el objetivo de corroborar la separación de las procedencias del sur y comprobar si existía alguna tendencia al agrupamiento en las del norte se optó por realizar un análisis de *clusters* (Figura 3) en el que se utilizó, además de las variables representadas en el gráfico de color, los dos valores más ampliamente utilizados en la descripción de las tonalidades en este Espacio de Color, los parámetros Hue y Chroma.

Los parámetros L^* , a^* y b^* son utilizados en el campo de la alimentación para estandarizar el color (López y Gómez, 2004), siendo éste uno de los más apreciados por el consumidor, como calidad de los productos. No obstante, cuando se quiere correlacionar el color con la presencia de algún pigmento constitutivo del fruto se recurre al cálculo de índices que agrupen estas variables y, dentro de los existentes, quizá los más utilizados sean Hue y Chroma por representar un aspecto concreto del color, tono y saturación.

El dendrograma ratifica la separación de los materiales de latitudes sur, pues las familias de ORIA y TAMR se agrupan en un *cluster* separado de las procedencias de latitudes norte, pero también pone de manifiesto la alta homogeneidad de los materiales del sur pues todas las familias de cada una de las procedencias se agrupan en el mismo *cluster*. Respecto al norte, el dendrograma sólo corrobora la ausencia de

agrupación de las procedencias, siendo el rango de latitudes analizadas como norte superior al del sur, de los 40° 12' a 47° 47' en el norte y de los 33° 36' a 37° 30' en el sur.

Este hecho podría deberse a la ubicación del ensayo (43° 32' N 7° 00' W, 65 m), que por resultar mucho más contrastante para las procedencias del sur puede estar haciendo que éstas se comporten de forma homogénea y, por el contrario, que las del norte expresen su variabilidad y, por tanto, no seamos capaces de establecer diferencias entre procedencias. También cabe la posibilidad de que entre las procedencias del norte realmente no haya una diferencia clara, bien por menor aislamiento o por menor presión ambiental. La respuesta diferencial de las procedencias del sur se ha puesto de manifiesto en trabajos realizados con estos materiales en torno a la variabilidad genética y plasticidad de la respuesta a estrés hídrico (Aranda *et al.*, 2010; Sánchez-Gómez *et al.*, 2010). En este caso, la coloración diferencial no deja de ser presumiblemente una forma de adaptación a otro tipo de estrés provocado por un exceso de luz o por baja capacidad para su uso motivada por bajas temperaturas.

Los coeficientes de variación recogidos en la Tabla 3 correspondientes a los análisis de los pigmentos realizados en los brotes de las procedencias de *P. pinaster* seleccionadas corroboran la mayor variabilidad de CVDO, que fue la procedencia seleccionada como representante de la zona norte para todos los pigmentos analizados.

Los datos medios obtenidos en estos análisis confirman las diferencias entre procedencias solamente para el contenido en antocianinas, ya que es la única que muestra diferencias significativas entre los brotes de los clones de las tres procedencias. Que las antocianinas son las principales responsables del cambio de color se corroboró a través del análisis de correlaciones bivariadas entre las variables de color y los contenidos en pigmentos (Tabla 4). Todos los datos de color se correlacionan de forma significativa con el contenido en antocianinas y con las relaciones entre pigmentos de las que forma parte, aunque el coeficiente para las relaciones es siempre inferior al obtenido sólo con el compuesto.

Las correlaciones bivariadas nos ponen de manifiesto que otros pigmentos, los flavonoides, también podrían ser determinantes para el color a pesar de que no se observaron diferencias significativas entre las procedencias de *P. pinaster* estudiadas. El hecho de que no encontremos esta significación puede deberse al número de

muestras analizadas, pues las familias seleccionadas dentro de cada procedencia han resultado ser muy variables, sobre todo CDVO.

En cuanto al contenido en flavonoides, clorofilas, carotenoides y antocianinas, las familias de la procedencia CDVO se agrupan de dos en dos, siendo el comportamiento de dos de ellas, F1P2 y F2P4, (pero sobre todo la segunda) muy próximo a las procedencias sur, con una menor concentración de antocianinas y una tendencia a mayor contenido del resto de pigmentos (Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10). Sólo respecto al contenido en fenoles totales estas diferencias interfamilia no serían tan notables (Figura 5).

La mayor concentración de antocianinas detectada en la procedencia CDVO es acorde con todos los trabajos recogidos en torno a la distribución latitudinal de contenido en pigmentos. Según citan Jaakola y Hohtola (2010), de entre los flavonoides, los que se ven favorecidos por las condiciones climáticas del norte son fundamentalmente las antocianinas y flavonoles, habiéndose comprobado su gran capacidad antioxidante in vitro y que son los flavonoides capaces de absorber luz UV en la epidermis de las hojas y tallos, protegiendo los tejidos internos (Nybakken *et al.*, 2004; Treutter 2006).

No obstante, el estudio sobre la localización de las antocianinas en las hojas llevado a cabo por Gould y Quinn (1999) en un amplio rango de especies, demostró que éstas se distribuyen en mayor proporción en el mesófilo y en las capas bajas de la epidermis, donde su papel como protectores solares parece más reducido que si se situasen en las capas superficiales. En nuestro caso son los brotes de *P. pinaster* los que se han analizado por presentar diferente coloración en superficie, lo que nos hace pensar que probablemente su ubicación no sea profunda, aunque sería interesante comprobarlo.

Respecto a los flavonoles y flavonas, que son los flavonoides que se pueden analizar con la metodología empleada y que son los que se citan como más interesantes por su capacidad antioxidante dentro de los que poseen las coníferas, resulta llamativo no sólo que las diferencias encontradas no hayan sido significativas, quizás porque el número de muestras no fue suficiente, sino que el contenido en estos compuestos sea superior en TAMR y CDVO tenga el menor contenido.

Una posible explicación a este hecho es la diferencia de altitud de donde proceden estos materiales. Según podemos ver en la Tabla 1, la procedencia TAMR se sitúa a 1760 m de altitud, ORIA a 1150 m y CDVO a 180 m.

En una primera aproximación los cambios de latitud los asociamos a cambios en el fotoperiodo. Se sabe que éste afecta al crecimiento y desarrollo de las plantas, por lo que no es de extrañar que también afecte al metabolismo secundario. Así, por ejemplo, en *Ipomoea batata* (Carvalho *et al.*, 2010), se ha visto que un fotoperiodo de 16 h frente a 8 h promueve la expresión de genes relacionados con la síntesis de antocianinas, flavonoides y catequinas, siendo las antocianinas el grupo que más se incrementa. En *P. contorta* (Camm *et al.*, 1993) el día corto induce una reducción de antocianinas, mientras que proantocianidinas y flavan-3-ols no variaron significativamente.

Pero el efecto de la latitud no va a estar sólo mediado por el fotoperiodo, sino que se debe, en parte, a la calidad de la luz. El ángulo que forma el sol influye en la distribución espectral de la luz y, por tanto, en la relación rojo:rojo lejano (R:FR), que, a su vez, afecta a toda la fisiología de la planta y, por tanto, en el metabolismo secundario. En especies forestales se ha visto, por ejemplo, que FR promueve síntesis fenólica en *Betula pendula* (Tegelberg *et al.*, 2004). Además, en *B. pubescens* y *Picea abies* se requiere FR durante el periodo de luz para mantener el crecimiento y esta demanda se incrementa con la latitud de procedencia (Clapham *et al.*, 1998).

La luz UV también varía y, como consecuencia, también influye sobre el metabolismo de la planta. Esta radiación puede causar daños en las macromoléculas, tales como el DNA, por lo que la planta desarrolla adaptaciones, como incrementar la síntesis de flavonoles y antocianinas como mecanismo para proteger los tejidos internos (Nybakken *et al.*, 2004; Treutter, 2006).

El acúmulo de antocianinas tras tratamientos con UV-B se observó en varias especies (Zhou *et al.*, 2007) y en algunos casos, como en *P. banksiana*, este tipo de tratamientos incrementaron la resistencia a frío en un 48% (Nozolillo *et al.*, 2002).

El incremento en altura también incrementa la luz UV-B, si ésta estimula el metabolismo secundario, que, a su vez, aumenta la tolerancia a frío, se produce una típica adaptación a un co-estrés en la que la planta asocia efectos ambientales con la finalidad de optimizar su aptitud.

Nuestra procedencia TAMR, por la altitud en la que se encuentra, puede haber desarrollado mecanismos de adaptación en este sentido que hacen que los dos factores, altitud y latitud, se entremezclen en nuestro ensayo.

El efecto de la altitud sobre el metabolismo secundario se cree está mediado fundamentalmente por el efecto de la luz y en general responden mejor las plantas procedentes del sur (Turunen y Zatola, 2005). Sin embargo, las temperaturas altas disminuyen la concentración de algunos compuestos, como las antocianinas, bien a través de su degradación o de la inhibición de la transcripción de los RNAm (Mori *et al.*, 2007).

En una latitud sur son esperables temperaturas altas, sin embargo, la media anual de esta zona es de 10°C, lo que indica una oscilación térmica elevada. En esta situación cabría esperar que fuese TAMR la procedencia de *P. pinaster* que acumulase una mayor concentración de metabolitos secundarios, lo cual es cierto en tendencia aunque no de forma significativa; sin embargo, no tiende a acumular antocianinas, quizá debido a la interacción con la temperatura comentada anteriormente. Este mayor acúmulo de pigmentos llevaría a esta procedencia a presentar una mayor capacidad antioxidante, lo cual se confirma en el ensayo de actividad antioxidante llevado a cabo con los dos clones de las procedencias más contrastantes (TAMR y CDVO) (Figura 11) y por el menor valor de IC₅₀.

Por otro lado, la acumulación de antioxidantes jugaría un papel importante en la defensa frente a otros tipos de estrés, como la falta de agua. En la Tabla 1 se indica el índice de aridez del lugar de origen de las procedencias. Como podemos ver, TAMR tiene uno de los valores más altos de este índice, luego esta procedencia muestra también una adaptación frente a estrés hídrico (De la Torre *et al.*, 2013) que, en último término, ejerce un efecto a nivel de metabolismo oxidativo y, por tanto, en la concentración de antioxidantes. También en otros parámetros adaptativos al estrés hídrico, tales como el reparto de biomasa, ya se ha podido constatar el comportamiento diferencial de esta procedencia de *P. pinaster* (Sánchez- Gómez *et al.*, 2010; Aranda *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

1. En las procedencias de *P. pinaster* estudiadas, la altitud y la longitud condicionan la concentración de pigmentos al afectar al metabolismo secundario a través de su influencia en la calidad de luz y la temperatura
2. En *P. pinaster* los pigmentos más evidenciables por su color (antocianinas) no parecen ser los responsables de la mayor actividad antioxidante. Su papel podría ser de barrera para la luz.
3. Se puede establecer una correlación significativa en brotes de *P. pinaster* entre los datos de color y la concentración de antocianinas y flavonoides.
4. La colorimetría es una técnica no destructiva, rápida, sencilla y fiable que sirve para distinguir procedencias que muestren diferencias frente al ambiente respecto a la concentración de pigmentos, Esto permitía su utilización como herramienta eficaz para el fenotipado masivo de *Pinus sp.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alía R, Martín S (2009) Guía técnica para la conservación genética y utilización del pino negral (*Pinus pinaster*) en España. Foresta. Madrid. España. 2 pp

Aranda I, Alía R, Ortega U, Dantas A K, Majada J (2010) Intraspecific variability in biomass partitioning and carbon isotopic discrimination under moderate drought stress in seedlings from four *Pinus pinaster* populations. *Tree Genet Genomes* 6: 169–178

Baizán S, Feito I, Majada J, Kidelman, Â, Martínez-Alonso C (2011) Relationship of ABA and proline in stages of drought response in *Pinus pinaster* Ait. of Oria provenance. 25-29 Septiembre. 12 th EEF Congress Ávila. España

Barker D H, Seaton G G R, Robinson S A (1997) Internal and external photoprotection in developing leaves of the CAM plant *Cotyledon orbiculata*. *Plant Cell Environ* 20: 617–624

Beckman C (2000) Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol Mol Plant P* 57: 101-110

Brzezińska E, Kozłowska M. 2008. Effect of sunlight on phenolic compounds accumulation in coniferous plants. *Dendrobiology* 59: 3-7

Camm E L, McCallum J, Leaf E, Koupai-Abyazani M R (1993) Cold-induced purpling of *Pinus concorta* seedlings depends on previous daylength treatment. *Plant, Cell Environ* 16: 761-764

Carvalho I S, Cavaco T, Carvalho L M, Duque P (2010) Effect of photoperiod on flavonoid pathway activity in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) leaves. *Food Chem* 118: 384– 390

Clapham D, Dormling I, Ekberg I, Eriksson G, Qamaruddin M, Vince-Prue D (1998) Latitudinal cline of requirement for far-red light for the photoperiodic control of bud set and extension growth in *Picea abies* (Norway spruce). *Physiol Plantarum* 102: 71–78

CIE 1986. Publication 15.2 (E-1.3.1) (1986) Colorimetry, 2nd Edition Central Bureau of the CIE, PO Box 169, A-1033 Vienna, Austria

Davik J, Bakken A K, Holte K, Blomhoff R (2006) Effects of genotype and environment on total anti-oxidant capacity and the content of sugars and acids in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). Jof Hortic Sci Biotech 81: 1057–1063

De la Torre C, Granda V, Kidelman Â, Majada J P, Rodriguez A, Feito I (2013) Water stress related parameters in 3 provenances of *P. pinaster* showing different degrees of polycyclic growth. XIII Portuguese-Spanish Congress on Plant Physiology (FCUL, Lisboa 23-27 July 2013

Demmig-Adams B, Adams III W W (1996). The role of xanthophylls cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. Trends Plant Sci 1: 21– 27

Dodd I C, Critchley C, Woodall G S, Stewart G R (1998) Photoinhibition in differently coloured juvenile leaves of *Syzygium* species. J Exp Bot 49: 1437– 1445

Gould K S, Quinn B D (1999). Do anthocyanins protect leaves of New Zealand native species from UV-B? New Zeal J Bot 37: 175-178.

Harris A (1966) Introduction of *Pinus pinaster* in Western Australia. Second World Congress. On Forest Tree Breeding. FO/FTB, 64 9/10: 4

Jaakola I, Hohtola, A (2010) Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. Plant Cell Environ 33: 1239–1247

Lätti A K, Riihinen K R, Kainulainen P (2008) Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland. J Agr Food Chem 56: 190-196

López C A, Gómez P (2004) Comparison of color index for tomato ripening, en: Horticultura Brasileira. V.22, n.3, jul-set, pp. 534-537

Martínez-Alonso C, Baizán S, Kidelman Â, Majada J, Dieste A, Chambel MR, Feito I (2011) Freezing tolerance affected by water stress during cold-stress in *Pinus pinaster* Ait. clones. 27-29 Septiembre. Restoring Forest. Madrid. España

- Matziris D I (1982) Variation in growth and quality characters in *Pinus pinaster* provenances grown at seven sites in Greece. *Silvae Genetica* 31 (5/6): 168-173
- Meda A, Lamien C E, Romito M, Millogo J, Nacoulma O.G (2005) *Food Chem* 91: 571–577
- Molina F (1965) Comportamiento racial de *Pinus pinaster* en el Noroeste de España. *Anales del Instituto Forestal de Investigación Experimental* 11: 232-238
- Mori K, Goto-Yamamoto N, Kitayama M, Hashizume K (2007) Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *J Exp Bot* 58: 1935–1945
- Nair V D, Panneerselvam R, Gopi R (2012) Studies on methanolic extract of *Rauvolfia* species from Southern Western Ghats of India- *in vitro* antioxidant properties, characterisation of nutrient and phytochemicals. *Ind Crop Prods* 39: 17– 25.
- Nguyen A, Lamant A, 1989. Variation in growth and osmotic regulation of roots of water-stressed maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenances. *Tree Physiol* 5: 123-133
- Nozzolillo C, Isabelle P, Andersen Ø M Abou-Zaid M (2002) Anthocyanins of jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings. *Can J Botany* 80: 796–801.
- Nybakken L, Aubert S, Bilger W (2004) Epidermal UV-screening of arctic and alpine plants along a latitudinal gradient in Europe. *Polar Biol* 27: 391–398
- Oleszek W, Stochmal A, Karolewski P, Simonet A M , Macias F A, Tava A (2002) Flavonoids from *Pinus sylvestris* needles and their variation in trees of different origin grown for nearly a century at the same area. *Biochem Syst Ecol* 30: 1011–1022
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (2011) Compendium of International Methods of Analysis, Method OIV-MA-AS2-10 R2009 1 (extract of ISO 78-2:1999 Standards)
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

Rycroft H B, Witch C L (1947) Field trials of geographical races of *Pinus pinaster* in South Africa. British. Emp For Conj Great Britain. Pretoria, South Africa
Sharma O P, Bhat T K. 2009. Food Chem 113: 1202-1205

Sánchez-Gómez D, Majada JM, Ricardo A, Feito I, Aranda I (2010) Intraspecific variation in growth and allocation patterns in seedlings of *Pinus pinaster* Ait. submitted to contrasting watering regimes: can water availability explain regional variation? Ann For Sci 67: 505

Sharma O, Bhat K (2009) DPPH antioxidant assay revisited. Food Chem 113: 1202-1205

Simirgiotis M J, Schmeda-Hirschmann G (2010) Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD-ESI-MS and free radical quenching techniques. J Food Compos Anal 23: 545–553

Sims D A, Gamon J A (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote Sens Environ 81: 337-354

Stark S, Julkunen-Tiitto R, Holappa E, Mikkola K, Nikula A (2008) Concentrations of foliar quercetin in natural populations of white birch (*Betula pubescens*) increase with latitude. J Cheml Ecol 34: 1382–1391

Sweet G B, Thulin JJ (1962) Proveniences of *Pinus pinaster* Aiton. A five year progress report on a trial at Wood-Hill, New Zeal J For Sci 8: 570-586

Tegelberg R, Julkunen-Tiitto R, Aphalo P J (2004) Red: far-red ratio and UV-B radiation: their effects on leaf phenolics and growth of silver birch seedlings. Plant Cell Environ 27: 1005–1013

Treutter D (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. Environ Chem Lett 4: 147–157

Turunen M, Latola K (2005) UV-B radiation and acclimation in timberline plants. Environ Pollut 137, 390–403

Valledor L, Cañal MJ, Pascual J, Rodríguez R., Meijón (2012) Early induced protein 1 (PrELIP1) and other photosynthetic, stress and epigenetic regulation genes are involved in *Pinus radiata* D. don UV-B radiation response. *Physiol Plant* 147 (3): 407-407

Zivkovic J, Mujic I, Zekovic Z, Vidovic S, Mujic A, Jokic S (2009) Radical scavenging, antimicrobial activity and phenolic content of *Castanea sativa* extracts. *Journal Central European Agriculture* 10 (2): 175-182

Zhou B ,Yuhua L, Zhiru X, Haifang Y, Shinichiro H, Kawabata S (2007) Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis in the swollen hypocotyls of turnip (*Brassica rapa*). *J Exp Bot* 58: 1771–1781.