

## Influence of climatic conditions on volatile emission in snapdragon (*Antirrhinum majus*)

## Influencia de las condiciones ambientales en la emisión de volátiles en boca de dragón (*Antirrhinum majus*)

M.I. Terry\*, J. Weiss, M. Egea-Cortines

Universidad Politécnica de Cartagena, Instituto de Biología Vegetal, Genética Molecular. Plaza del Hospital s/n, 30202, Cartagena, Spain.

### **Abstract**

**The circadian clock is a mechanism that provides adaptive advantages being present in all living organisms. The circadian clock in plants, as described in Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), is comprised of a series of interlocked regulatory feedback loops, but there is not much information about its function on processes such as the emission of volatile organic compounds. In this study, we will analyze volatile emission under two different environmental conditions in snapdragon (*Antirrhinum majus*).**

**Keywords:** biological rhythm; photoperiod; thermoperiod; time series.

### **Resumen**

**El reloj circadiano es un mecanismo que proporciona ventajas adaptativas y está presente en todos los organismos. El reloj circadiano en plantas, como se describe en Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), está formado por una serie de bucles interconectados y retroalimentados, pero no existe mucha información sobre su función en procesos como la emisión de compuestos volátiles orgánicos. En el presente trabajo analizaremos la emisión de volátiles en dos condiciones experimentales (medio ambientales?) en la planta modelo boca de dragón (*Antirrhinum majus*).**

**Palabras clave:** fotoperiodo; ritmo biológico; series temporales; termoperiodo.

### **1. INTRODUCCIÓN**

El reloj circadiano es un mecanismo autorregulado y endógeno presente en la mayoría de los seres vivos, desde bacterias hasta humanos. Resultado de la alternancia del día y la noche, este reloj proporciona una serie de ventajas adaptativas. En plantas, según lo descrito en Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), los componentes más importantes de este reloj son los genes *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*, *LATE ELONGATE HYPOCOTYL (LHY)* y *TIMING OF CAB2 EXPRESSION 1 (TOC1)*. *CCA1* y *LHY* están estrechamente relacionados y su expresión máxima se produce durante el día. Por otro lado, *TOC1* se expresa durante la noche estableciéndose así un complejo sistema de tres bucles de retroalimentación junto con otros genes [1,2].

---

\* E-mail: mitl0@alu.upct.es

La boca de dragón (*Antirrhinum majus*), perteneciente a la familia de las plantagináceas, es una planta ornamental de interés en investigación, que está usada como modelo en estudios de desarrollo floral [3,4], emisión y biosíntesis de volátiles [5,6] y pigmentos [7], entre otros. Sin embargo, no existe mucha información sobre la estructura del reloj circadiano en esta especie y su posible implicación en procesos tan importantes como el desarrollo y el crecimiento, la floración o la emisión de volátiles.

La emisión de compuestos orgánicos volátiles tiene entre otras funciones, atraer a polinizadores y repeler a herbívoros. Además, se sabe que la emisión de ciertos compuestos en la boca de dragón varía a lo largo del día [8] y que esta especie es polinizada durante el día por abejorros, atraídos por algunos de estos volátiles [9].

El objetivo de este trabajo es estudiar la emisión de volátiles en boca de dragón, analizar los posibles efectos de las condiciones ambientales y comprobar si la temperatura puede actuar como sincronizador en ausencia de un ciclo luz-oscuridad.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal y condiciones experimentales

Las semillas de la línea Sippe 50 de boca de dragón fueron germinadas en vermiculita. Se mantuvieron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz (L, *light*) y 8 horas de oscuridad (D, *dark*) y la temperatura fue de 23 °C y 18 °C, respectivamente.

Para la aclimatación de las plantas se introdujeron en cámaras de cultivo por un periodo de 15 días donde las condiciones fueron:

- a) Ciclo LD: 12L:12D, temperatura 23 °C y 18 °C.
- b) Ciclo LL: 12L:12L, temperatura 23 °C y 18 °C.

### 2.2 Volátiles

Los volátiles se recolectaron mediante el sistema SPME (solid phase microextraction) a las tres horas del encendido de las luces (*Zeitgeber Time*, ZT 3) y cada seis horas durante un ciclo de 24 horas [10].

Posteriormente, los *Twisters* fueron analizados en un GC-MS, la identificación de los compuestos se basó en una librería estándar (*Standard Reference Database 1A NIST 2005*).

### 2.3 Análisis de datos

Se seleccionaron cuatro de los volátiles con un porcentaje superior al 2% (Tabla 1). Para la detección de ritmos se usó el paquete RAIN (R) [11].

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron cambios en los niveles de volátiles emitidos en el grupo de LD a lo largo del día. En esta especie se ha descrito que el ritmo en la emisión de volátiles persiste durante al menos 4 días, en condiciones de oscuridad o de luz continua [6, 8] lo que apoya que la emisión debe de estar regulada por el reloj circadiano; sin embargo, tras dos semanas de luz continua estas oscilaciones han desaparecido, pese a que sí existía un termoperiodo. En algunas plantas de interés agronómico bajo condiciones de luz continua se ha descrito que la existencia de un termoperiodo puede mitigar los daños causados por esta exposición [12, 13] pero no existen muchos datos sobre el efecto en el reloj circadiano.

Además, según los resultados obtenidos con RAIN, sólo uno de los volátiles, acetofenona en LL, mostró un ritmo en la emisión ( $P = 0,034$ ) que no existe en condiciones de LD ( $P = 0,209$ ). Este

compuesto tiene un importante papel como repelente de herbívoros [14] e influye en la polinización por parte de los abejorros, ya que resultan menos atraídos por dicho volátil [15].

Aunque se conoce que la emisión de volátiles puede aumentar con la intensidad lumínica [16], no tenemos datos sobre una exposición prolongada a la luz continua; en estas condiciones, la emisión ha sido menor en las plantas en LL (Figura 1).

#### 4. CONCLUSIONES

Una oscilación periódica en la temperatura no parece ser suficiente para sincronizar la emisión de volátiles en luz continua.

La exposición prolongada en condiciones de luz continua podría tener un efecto no deseado sobre herbívoros y/o polinizadores.

La emisión de volátiles disminuye en condiciones de luz continua.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

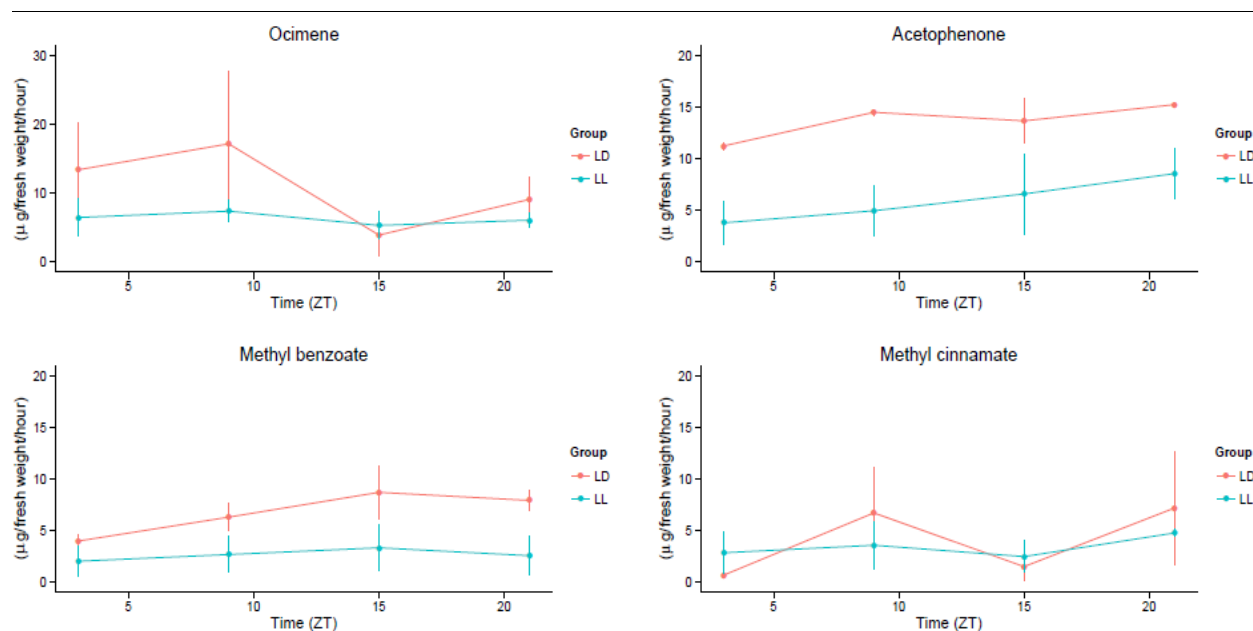
Agradecemos a la Dr. María José Roca el soporte ofrecido con los análisis GC-MS. El trabajo se realiza dentro del proyecto MICINN BFU-45148-R.

#### 6. REFERENCIAS

- [1] Huang, W., Perez-Garcia, P., Pokhilko, A., Millar, A. J., Antoshechkin, I., Riechmann, J. L., and Mas, P. (2012). Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science*, 336(6077), 75-79.
- [2] McClung, C. R. (2014). Wheels within wheels: new transcriptional feedback loops in the Arabidopsis circadian clock. *F1000Prime Rep*, 6(2), 10-12703.
- [3] Coen, E. S., Romero, J., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G., and Carpenter, R. (1990). *Floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63(6), 1311-1322.
- [4] Sommer, H., Beltran, J. P., Huijser, P., Pape, H., Lönning, W. E., Saedler, H., and Schwarz-Sommer, Z. (1990). *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J*. 9(3), 605.
- [5] Dudareva, N., Martin, D., Kish, C. M., Kolosova, N., Gorenstein, N., Fäldt, J. and Bohlmann, J. (2003). (E)- $\beta$ -ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *The Plant Cell* 15(5), 1227-1241.
- [6] Dudareva, N., Andersson, S., Orlova, I., Gatto, N., Reichelt, M., Rhodes, D. and Gershenzon, J. (2005). The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 102(3), 933-938.
- [7] Jackson, D., Roberts, K., and Martin, C. (1992). Temporal and spatial control of expression of anthocyanin biosynthetic genes in developing flowers of *Antirrhinum majus*. *The Plant J* 2(4), 425-434.
- [8] Kolosova, N., Gorenstein, N., Kish, C. M., and Dudareva, N. (2001). Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *The Plant Cell*, 13(10), 2333-2347.
- [9] Dudareva, N., Murfitt, L. M., Mann, C. J., Gorenstein, N., Kolosova, N., Kish, C. M. and Wood, K. (2000). Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. *The Plant Cell* 12(6), 949-961.
- [10] Ruiz-Ramón, F., Águila, D. J., Egea-Cortines, M., and Weiss, J. (2014). Optimization of fragrance extraction: Daytime and flower age affect scent emission in simple and double narcissi. *Ind Crop Prod* 52, 671-678.
- [11] Thaben, P. F., and Westermark, P. O. (2014). Detecting rhythms in time series with RAIN. *J. Bio. Rhythm* 0748730414553029.
- [12] Tibbitts, T. W., Bennett, S. M., and Cao, W. (1990). Control of continuous irradiation injury on potatoes with daily temperature cycling. *Plant Physiol* 93(2), 409-411.
- [13] Sysoeva, M. I., Shibaeva, T. G., Sherudilo, E. G., and Ikkonen, E. N. (2012, October). Control of continuous irradiation injury on tomato plants with a temperature drop. In VII International Symposium on Light in Horticultural Systems 956 (pp. 283-289).
- [14] Kergunteuil, A., Dugravot, S., Mortreuil, A., Le Ralec, A., and Cortesero, A. M. (2012). Selecting volatiles to protect brassicaceous crops against the cabbage root fly. *Delia radicum*. *Entomologia Exp Appl* 144: 69, 77.

[15] Suchet, C., Dormont, L., Schatz, B., Giurfa, M., Simon, V., Raynaud, C., and Chave, J. (2011). Floral scent variation in two *Antirrhinum majus* subspecies influences the choice of naïve bumblebees. *Behavior Ecol Sociobiol* 65(5), 1015-1027.

[16] Gouinguéné, S. P., and Turlings, T. C. (2002). The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiol* 129(3), 1296-1307.



**Figura 1.** Volátiles emitidos, expresados como microgramos por gramo de tejido por hora a lo largo de 24 horas.

**Tabla 1.** Lista de volátiles analizados.

Volátil	CAS	RT
Ocimeno	3779-61-1	7,10
Acetofenona	98-86-2	7,48
Metil benzoato	93-58-3	8,04
Metil cinnamato	103-26-4	12,89

CAS: número de registro *Chemical Abstracts Service*, RT: tiempo de retención