

Emisión diaria y nocturna de volátiles en *Antirrhinum majus*

(Recibido: 28/04/2016; Aceptado: 26/05/2016)

Ruiz-Hernández V.¹; Weiss J.¹; Egea-Cortines M.¹

¹Genética Molecular, Edificio I+D+i, Plaza del Hospital s/n, Universidad Politécnica de Cartagena, 30202 Cartagena

Teléfono: 868071081

Email: victoria.ruiz@upct.es

Resumen. *Antirrhinum majus* es una especie que sirve como modelo en estudios sobre emisión de aromas en flor y ritmos circadianos. Este trabajo refleja la emisión diferenciada de aromas entre el día y la noche en esta especie. Así, la media de emisión de volátiles es mayor durante el día que durante las horas de oscuridad en un fotoperiodo de 12-12h de luz-oscuridad. También se ha identificado la emisión exclusiva de volátiles secundarios durante las horas de luz: linalol, éster etílico del ácido benzoico, gardenol y decanal. Estos resultados han de tenerse en cuenta de cara a posibles muestreos y son relevantes para el estudio de las relaciones insecto-planta mediante volátiles, debido al posible efecto de atracción o repulsión que estos compuestos pueden tener.

Palabras clave. Ritmos circadianos; volátiles; cromatografía.

Abstract. *Antirrhinum majus* is a model species that is used for studies about floral scent and circadian rhythms. This study reflects the differentiated emission of volatiles between day and night in this species. Thus the average emission of volatiles is higher during the day than during dark hours, with a photoperiod of 12-12h light-dark. We also have identified the exclusive emission of secondary volatiles during light hours: linalool, benzoic acid - ethyl ester, gardenol and decanal. These results should be taken into account for samplings and for the study of insect-plant interactions, due to the feasible attracting or repelling effect caused by these compounds.

Keywords. Circadian rhythms; volatiles; chromatography.

1. Introducción

Se han identificado más de 1700 compuestos volátiles emitidos en unas 1000 especies con flor (Knudsen et al. 2006). Los perfiles de volátiles suelen ser complejos estando formados por mezclas de compuestos que dan lugar a un perfil aromático o bouquet floral. Esta complejidad en el aroma floral es el resultado de una co-evolución entre plantas-mutualistas-antagonistas. Resulta fácil de comprender que la emisión exclusiva de atrayentes para polinizadores las haría más fácil de localizar por insectos perjudiciales para las plantas). Es por ello que se requiere de un cierto nivel de complejidad que establezca un equilibrio entre la atracción y repulsión de animales. (Kessler et al. 2013).

La emisión de compuestos volátiles aparte de contribuir, junto con la forma y el color, a la comunicación entre plantas en insectos, también es conocida por su función en la comunicación entre plantas (Avdiushko et al. 1995).

La especie *Antirrhinum majus* ha servido como modelo en estudios de biología durante más de un siglo. Este género es originario de la cuenca mediterránea y tiene flores de una forma característica, conocidas comúnmente como bocas de dragón, conejitos, etc. Existen numerosos estudios

que han caracterizado el desarrollo y la coloración de estas flores (Delgado-Benarroch et al. 2009; Whitney et al. 2013). También ha servido como modelo en el estudio de la emisión de volátiles florales (Manchado-Rojo et al. 2014).

Diversos estudios en flores han demostrado que la emisión de aromas ocurre de manera diferenciada a lo largo del día y la noche. Este hecho tiene una relación directa con la actividad circadiana de los principales polinizadores de una especie. El caso opuesto es el caso de *Petunia exserta*, una especie que es polinizada por colibríes y que en la co-evolución entre especies ha perdido su capacidad de emitir aromas. Esto ocurre debido a unas mutaciones en dos *loci* que resultan en la no emisión de aromas (Klahre et al. 2011).

Debido a la importancia que tienen las plantas para la actividad humana ya que desde la alimentación, el cambio climático o la producción de energía, nuestra actividad está ligada a ellas. Así como la importancia que tienen los compuestos volátiles en los ecosistemas terrestres: bosques, praderas, cultivos, etc. Se presenta relevante el estudio de estos compuestos que comunican reinos de organismos. Para ello, el uso de organismos modelo como *A. majus* facilita la investigación de atributos tan relevantes como es la emisión de compuestos aromáticos. El objetivo de este estudio ha sido el de comparar la emisión de volátiles diaria y nocturna en

A. majus, así como caracterizar los principales compuestos emitidos a lo largo del día y de la noche.

2. Materiales y Métodos

El experimento ha consistido en el análisis de la variación de la emisión de compuestos volátiles durante el día y la noche en *A. majus*. Además se ha realizado una caracterización de los compuestos emitidos a lo largo del día y la noche y de los que han resultado ser emitidos exclusivamente durante el día.

2.1. Material vegetal

Se han utilizado flores de *A. majus*, de la línea consanguínea 165E. Se marcaron las flores el día 0 antes de la antesis y se tomaron las muestras el día 5° después de la apertura total de la flor, ya que es el momento de máxima emisión de aromas en esta especie (Weiss et al. resultados no publicados). Se han analizado volátiles de 3 flores independientes en un período de 12h de luz, 12h de oscuridad y 24h. Las plantas se encontraban antes del muestreo en un invernadero, con unas condiciones de luz y temperatura similares a las que tuvieron durante la acumulación de aromas.

2.2 Cromatografía

Se introdujeron las flores completas en un vaso de precipitado con 4ml de una disolución de agua con glucosa al 5% y un portaobjetos que servía de apoyo para la flor. Sobre el filo del vaso de precipitado, se colocó un clip adherido a un Twister™ que es una barra magnética cubierta de polidimetilsiloxano (PDMS) que permite la acumulación de compuestos volátiles en el espacio de cabeza (volumen en el que se encuentra el Twister™). Estos vasos se encontraban en desecadores de 1l en el interior de una cámara de crecimiento (modelo Sanyo MLR350) (Fig. 1). El fotoperiodo de las cámaras era de 12 horas de oscuridad y de luz. La temperatura se mantuvo a 23°C durante las horas de luz y los 18°C en las horas de oscuridad.

El análisis de los compuestos volátiles acumulados en los Twister™ se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, tal y como se describe en (Manchado-Rojo et al. 2012). Los compuestos detectados se identificaron por comparación con la base de datos NIST11. Las cantidades representadas en la Fig. 2 están calculadas en porcentajes de emisión. Para ello, se han seleccionado los compuestos comunes en las tres réplicas para cada muestreo (12h luz, 12h oscuridad y 24h) y con ello se ha establecido un listado con el perfil aromático de las muestras. Sobre este listado se ha calculado el total de emisión de aromas en 24h y el porcentaje de la emisión durante el día y la noche.



Fig. 1. Condiciones de realización del muestreo de volátiles.

3. Resultados y Discusión

El tiempo de muestreo utilizando Twisters™ determina el número de compuestos acumulados por los mismos. El hecho de que los Twister™ estuviesen acumulando los volátiles emitidos por las muestras durante 12 o 24h, ha permitido identificar un mayor número de compuestos en el muestreo durante 24h, dando lugar a ciertas diferencias en el cálculo del porcentaje de emisión durante el día y durante la noche.

La máxima emisión de aromas ocurre durante las horas de luz y se corresponde con aproximadamente el 50% de la emisión total diaria. Por el contrario, la emisión nocturna supone de media menos del 30% (Fig. 2). Estas diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas debido al alto valor de los errores estándar de las muestras, una mejora para futuros trabajos radica en el aumento del número de repeticiones para el análisis de volátiles ya que es un fenotipo altamente dependiente del entorno. En cambio, cuando no se analiza el conjunto de los volátiles emitidos y se observan los resultados de volátiles concretos, puede darse el caso de que sí se encuentren diferencias estadísticamente significativas (Ruiz-Hernández et al. resultados no publicados). Estas diferencias entre las emisiones diarias y nocturnas de compuestos concretos como el metil benzoato han sido encontradas por otros autores como (Kolossova et al. 2001).

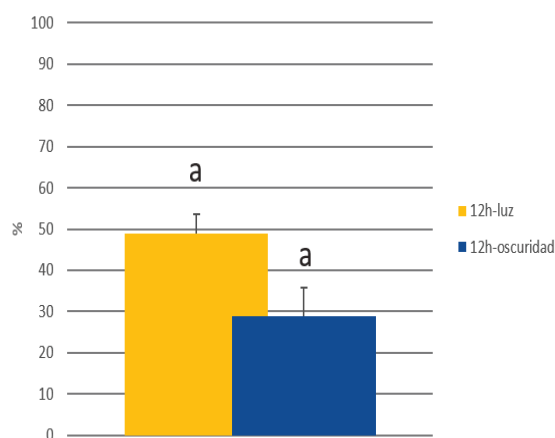


Fig. 2. Porcentaje de emisión durante 12h de luz y 12h de oscuridad con un fotoperíodo de 12-12h en *A. majus*. Porcentaje calculado en base a la emisión absoluta en 24h (media \pm ET; t-Student $p > 0,05$ las letras iguales no indican diferencias significativas).

Por otro lado los compuestos identificados como emitidos a lo largo del día/noche o exclusivamente durante el día, se encuentran en la Tabla 1. Todos estos compuestos se encuentran también en distintos géneros de plantas. Los volátiles que representan un porcentaje mayor son ocimeno, acetofenona, metil benzoato, β -miraceno y nonanal. El resto de compuestos son secundarios en cuanto a cantidad de emisión. Estos compuestos pertenecen a diferentes rutas metabólicas. Por ejemplo dentro de los fenilpropanoides están el metil benzoato, la acetofenona, el 2-acetilfenol y el éster etílico del ácido benzoico. Otros compuestos son terpenos, tales como el ocimeno y el β -miraceno. Algunos de ellos son conocidos por su emisión durante el día y la noche, tales como el metil benzoato (Kolossova et al. 2001), ocimeno, acetofenona, linalol y β -miraceno (Ruíz-Ramón et al. 2014). Otros en cambio, no se encuentran en la bibliografía consultada como compuestos emitidos exclusivamente durante las horas de luz: gardenol, decanal, o el éster etílico del ácido benzoico. Tampoco se encuentra descrito en la bibliografía la emisión circadiana o constitutiva del éster metílico del ácido butanoico, 2-metil-.

Entre los compuestos recopilados en la Tabla 1, existen algunos que han sido y son objeto de amplios estudios. Tales como el metil benzoato (Kolossova et al. 2001; Horiuchi et al. 2007), ocimeno (Dudareva et al. 2003; Byers et al. 2014), acetofenona (Wright et al. 2005), β -myrceno (Dudareva et al. 2003). En cambio otros como el éster metílico del ácido butanoico, 2-metil-, el 2-acetilfenol, nonanal, gardenol, decanal, o el éster etílico del ácido benzoico han sido menos estudiados. Aunque se ha estudiado el efecto repelente del 2-acetilfenol en pájaros (Nolte et al. 1993) y la actividad circadiana de los mosquitos en relación con la emisión de nonanal (Rund et al. 2013).

Diversos estudios han indicado que la co-evolución entre plantas y polinizadores ha derivado en patrones de actividad acompañados. Por ejemplo, *P. hybrida* es polinizada por polillas y su emisión de aromas es

mayor por la noche, cuando estos insectos tienen su mayor actividad (Kessler et al. 2013). En cambio, *A. majus* es polinizada por abejas y su emisión es mayor durante el día, como se ha podido observar en este estudio.

Tabla 1. Compuestos principales emitidos durante el día y la noche, o exclusivamente durante el día en *A. majus* (16SE). Porcentaje que representan estos volátiles en 12h de luz o 12h de oscuridad respecto a la emisión total en 24h.

| Compuesto | N° CAS | % día \pm SE | % noche \pm SE |
|--|----------|------------------|------------------|
| Éster metílico del ácido butanoico, 2-metil- | 868-57-5 | 0,14 \pm 0,01 | 0,14 \pm 0,02 |
| β -Miraceno | 123-35-3 | 4,39 \pm 0,49 | 0,89 \pm 0,29 |
| Ocimeno | Isómeros | 23,10 \pm 2,77 | 4,73 \pm 2,22 |
| Acetofenona | 98-86-2 | 10,27 \pm 1,02 | 2,18 \pm 1,14 |
| Metil benzoato | 93-58-3 | 7,11 \pm 1,66 | 3,29 \pm 0,56 |
| Nonanal | 124-19-6 | 0,09 \pm 0,00 | 9,26 \pm 2,84 |
| 2-Acetilfenol | 118-93-4 | 0,3 \pm 0,02 | 0,10 \pm 0,00 |
| Linalol | 78-70-6 | 0,49 \pm 0,05 | - |
| Éster etílico del ácido benzoico | 93-89-0 | 0,25 \pm 0,11 | - |
| Gardenol | 93-92-5 | 0,05 \pm 0,02 | - |
| Decanal | 112-31-2 | 0,06 \pm 0,01 | - |

3. Conclusiones

Algunos de los compuestos caracterizados en este trabajo aportan un nuevo conocimiento de la emisión de volátiles diurna y nocturna en *Antirrhinum majus*. La mayor emisión de volátiles durante el día y la diferenciación de la emisión de algunos compuestos en función del fotoperíodo son aspectos a tener en cuenta de cara a futuros estudios.

Agradecimientos

Al Ministerio de Educación y Cultura por la beca de Formación del Profesorado Universitario

(FPU13/03606). Este estudio se ha financiado en el marco del proyecto MCINN-FEDER BFU2010-15843. Además, agradecer la ayuda por M^a José Roca del Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica (SAIT) de la UPCT.

Referencias

- [1] Avdiushko S, Croft KP, Brown GC, Jackson DM, Hamilton-Kemp TR, Hildebrand D. (1995). "Effect of volatile methyl jasmonate on the oxylipin pathway in tobacco, cucumber, and *Arabidopsis*". *Plant Physiol.* 109:1227–1230.
- [2] Byers KJRP, Bradshaw HD, Riffell J. (2014). "Three floral volatiles contribute to differential pollinator attraction in monkeyflowers (*Mimulus*)". *J. Exp. Biol.* [Internet] 217:614–623.
- [3] Delgado-Benarroch L, Causier B, Weiss J, Egea-Cortines M. (2009). "FORMOSA controls cell division and expansion during floral development in *Antirrhinum majus*". *Planta* 229:1219–1229.
- [4] Dudareva N, Martin D, Kish CM, Kolosova N, Gorenstein N, Fäldt J, Miller B, Bohlmann J, Faldt 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". *Plant Cell* 15:1227–1241.
- [5] Horiuchi J, Badri D V, Kimball B a, Negre F, Dudareva N, Paschke MW, Vivanco JM. (2007). "The floral volatile, methyl benzoate, from snapdragon (*Antirrhinum majus*) triggers phytotoxic effects in *Arabidopsis thaliana*". *Planta* [Internet] 226:1–10.
- [6] Kessler D, Diezel C, Clark DG, Colquhoun TA, Baldwin IT. (2013). "*Petunia* flowers solve the defence/apparency dilemma of pollinator attraction by deploying complex floral blends". Irwin R, editor. *Ecol. Lett.* 16:299–306.
- [7] Klahre U, Gurba A, Hermann K, Saxenhofer M, Bossolini E, Guerin PM, Kuhlemeier C. (2011). "Pollinator choice in *Petunia* depends on two major genetic *Loci* for floral scent production". *Curr. Biol.* 21:730–739.
- [8] Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, Ståhl B, Stahl B. (2006). "Diversity and distribution of floral scent". *Bot. Rev.* 72:1–120.
- [9] Kolosova N, Gorenstein N, Kish CM, Dudareva N. (2001a). "Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants". *Plant Cell* 13:2333–2347.
- [10] Manchado-Rojo M, Delgado-Benarroch L, Roca MJ, Weiss J, Egea-Cortines M. (2012). "Quantitative requirements of *Deficiens* and *Globosa* for late petal development show a complex transcriptional network topology of B function". *Plant J.* 72:294–307.
- [11] Manchado-Rojo M, Weiss J, Egea-Cortines M. (2014). "Validation of *Aintegumenta* as a gene to modify floral size in ornamental plants". *Plant Biotechnol J.* 12:1053–1065.
- [12] Nolte DL, Mason JR, Clark L. (1993). "Nonlethal rodent repellents: Differences in chemical structure and efficacy from nonlethal bird repellent". *J. Chem. Ecol.* [Internet] 19:2019–2027.
- [13] Ruiz-Ramón F, Águila DJ, Egea-Cortines M, Weiss J. (2014). "Optimization of fragrance extraction: Daytime and flower age affect scent emission in simple and double narcissi". *Ind. Crops Prod.* 52:671–678.
- [14] Rund SSC, Bonar NA, Champion MM, Ghazi JP, Houk CM, Leming MT, Syed Z, Duffield GE. (2013). "Daily rhythms in antennal protein and olfactory sensitivity in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*". *Sci. Rep.* [Internet] 3:2494.
- [15] Whitney HM, Milne G, Rands SA, Vignolini S, Martin C, Glover BJ. (2013). "The influence of pigmentation patterning on bumblebee foraging from flowers of *Antirrhinum majus*". *Naturwissenschaften* [Internet] 100:249–256.
- [16] Wright GA, Lutmerding A, Dudareva N, Smith BH. (2005). "Intensity and the ratios of compounds in the scent of snapdragon flowers affect scent discrimination by honeybees (*Apis mellifera*)". *J. Comp. Physiol. a-Neuroethology Sens. Neural Behav. Physiol.* 191:105–114.