



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Caracteres químico - taxonómicos de las plantas. Compuestos volátiles (VOCs) de *Asparagus albus* L. y *Asparagus acutifolius* L.

Teresa Sastre Nadal

Grado de Biología

Año académico 2013-14

DNI del alumno: 43178626J

Trabajo tutelado por Lleonard Llorens García

Departamento de Botánica

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Palabras clave del trabajo:

Asparagus, fenología, compuestos volátiles, polinizadores, taxonomía.

ÍNDICE

	Página
1 - Resumen	4
2 - Introducción	5
3 - Objetivos	10
4 - Materiales y Métodos	
4.1 - Materiales, especies.....	11
4.2 - Materiales, instrumentos.....	12
4.3 - Métodos, fenología.....	13
4.4 - Métodos, polinizadores.....	14
4.5 - Métodos, VOCs y su análisis.....	14
4.6 - Métodos, ensayos de auto - compatibilidad.....	15
5 - Resultados	
5.1 - Fenología.....	16
5.2 - Polinizadores.....	17
5.3 - VOCs.....	18
5.4 - Auto - compatibilidad.....	22
6 - Discusión	23
7 - Agradecimientos	26
8 - Referencias	26

1 - RESUMEN

A lo largo del experimento se llevan a cabo diversos métodos con la finalidad de saber si dos especies próximas son realmente parecidas, en referencia a los aromas que producen sus flores. No solo se tendrán en cuenta los aromas, sino que también se realizarán estudios sobre los polinizadores de ambas especies. Con el trabajo se pretende adquirir conocimientos no solo sobre Compuestos Volátiles, sino también sobre el manejo de instrumental básico y conocer nuevas líneas de investigación.

Sobre los Compuestos Volátiles se realizan numerosos experimentos con tal de obtener más información sobre los aromas de las plantas, lo cual puede ser importante en el sector industrial o en la elaboración de productos contra animales herbívoros que atacan cultivos. Estos nuevos experimentos también se llevan a cabo con el fin de obtener información esencial sobre las rutas de formación de los compuestos y sobre nuevos compuestos sintetizados por las plantas, con lo que se puede facilitar la determinación de las plantas. Como es en el caso del trabajo, donde se pretende averiguar si ambas especies vegetales son semejantes también en cuanto a los Compuestos Volátiles que producen.

2 - INTRODUCCIÓN

Actualmente se conoce como planta aromática aquella que secreta compuestos químicos volátiles usados en farmacología, así como también secreta otros aromas a partir del tejido vegetativo (hojas y raíces) para repeler herbívoros o protegerse ante patógenos. Si se mira desde el punto ecológico, dicha definición incluiría también todos los aromas producidos por las flores, los cuales son generalmente usados para atraer a los insectos (Caissard, 2004).

Los Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs) son moléculas orgánicas que presentan una alta presión de vapor o una alta volatilidad (se evaporan con facilidad a la atmósfera) y son producidos a partir de rutas metabólicas secundarias. Así pues, son todos aquellos compuestos producidos con la finalidad de proteger la planta o atraer polinizadores; en algunos casos son utilizados para sellar heridas producidas (Maffei, 2010).

Es en el Amazonas, donde se encuentra la mayor emisión de VOCs, de todo el carbono asimilado por la planta liberan un 36% en forma de VOCs a través de las flores. Cuando algunos de estos compuestos se encuentran en altas concentraciones, pueden llegar a ser tóxicos para el hombre u otras especies animales. Además de ello, junto con la acción de óxidos de nitrógeno son capaces de regular la capacidad oxidativa de la troposfera y por tanto regular el O₃ (Maffei, 2010).

Como se ha mencionado, los VOCs pueden ser emitidos por diferentes partes de la planta. Así pues las plantas emiten aromas a través de las flores para atraer a los polinizadores (Fig. 1). En algunos casos también hay nectarios los cuales son capaces de atraer a determinados animales gracias al néctar que ofrecen. La llegada de determinados animales a la planta, crea una reacción en el vegetal con lo que produce compuestos de defensa o atrayentes del depredador del primer animal visitante. La parte que se ha tenido en cuenta en el experimento han sido básicamente los aromas florales.

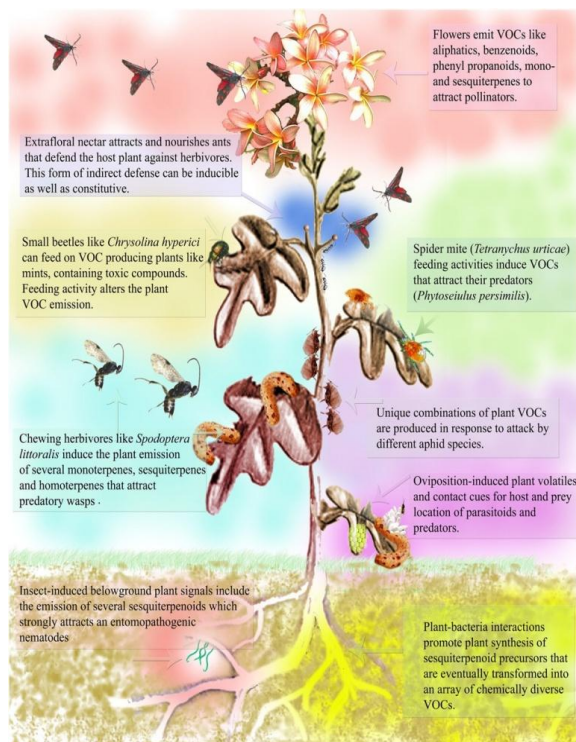


Figura 1. Representación de los aromas emitidos por la planta y sus consecuencias. (Maffei, 2010).

Los VOCs son producidos en células especiales, las cuales se clasifican según su estructura o según la sustancia química secretada. La mayoría de los compuestos son lipofílicos, con lo que se secretan a modo de aceites esenciales; si bien es cierto, existen algunos como los carotenoides solubles en agua. Según Maffei (2010) existen cuatro lugares diferentes de secreción de VOCs.

El primero de ellos son las glándulas tricomas. Éstas suelen liberar compuestos en respuesta a daños en los tejidos (defensa microbiana o contra herbívoros) y presentan una gran variabilidad morfológica. El segundo grupo es el que abarca a los conductos secretores y cavidades, son los que se encuentran menos visibles al estar en las capas más internas de los tejidos de la planta. Este tipo de estructura almacena los VOCs que serán utilizados en el caso de ruptura tisular. Las células secretoras de flores y raíces, son el tercer tipo y se encargan de acumular los compuestos a secretar en el interior de sus vacuolas; las sustancias producidas en ambos casos son lipofílicas. Finalmente, se encuentra la estructura de néctar extra - floral, es un tipo especial que ocurre en distintos tipos de plantas, por ejemplo en diferentes Acacias; las cuales secretan néctar extra - floral que atrae a las hormigas para que defiendan a la planta de hospedadores; llegando así a una relación simbiótica entre plantas y hormigas.

Existen tres tipos importantes de VOCs: compuestos bencenoides o fenólicos, derivados de ácidos e isoprenoides.

Los compuestos bencenoides, fenólicos o aromáticos, provienen del triptófano, fenilalanina o tirosina (Fig. 2) (Caissard, 2004). Estos compuestos son producidos tanto por flores como por hojas. Contienen un anillo aromático, así como también presentan nitrógeno o sulfuro en su estructura. Uno de los más importantes es el indol, el cual es producido en respuesta a herbívoros. Un compuesto derivado de la fenilalanina es el fenilacetaldehído, el cual a menudo se presenta en frutos, como en el tomate (Maffei, 2010).

Un segundo tipo de compuestos, abarca a los derivados de ácidos u oxilipinas, derivan de ácidos grasos insaturados; los cuales suelen estar asociados con el color de la hoja después de la descomposición y la acción de la lipoxigenasa¹ (tras haber sufrido daños mecánicos). Aunque algunos de ellos son producidos por flores, tales como el ácido jasmónico (Fig. 2).

Los isoprenoides son compuestos de vital importancia para la planta ya que constituyen un sistema de defensa crucial para ésta. Dichas moléculas son hidrocarburos formados por cinco átomos de carbono (unidad básica). Dentro de los isoprenoides, diferenciamos los hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, los cuales están formados respectivamente por una,

¹ Familia de enzimas que contienen hierro, encargadas de la catalización de la dioxigenación de ácidos grasos poliinsaturados. En la planta actúan en el crecimiento, desarrollo, resistencia a plagas, senescencia y como respuesta a lesiones.

dos, tres o cuatro unidades básicas (Dudareva, 2006). La proporción de la emisión de dichos compuestos en las plantas es mayoritariamente de isoprenos o monoterpenos. Mientras que los sesquiterpenos están en menor proporción (Ormeño, 2011). Los terpenos provienen de la vía del Isopentenil Difosfato (IPP) - Dimetilalil Difosfato (DMAPP) (Caissard, 2004). Dicha vía puede formarse en dos lugares diferentes, una proveniente del citoplasma u otra de los plastos, siendo la primera la que da lugar a los sesquiterpenos y algunos hemiterpenos, mientras que la segunda da lugar al resto de isoprenoides.

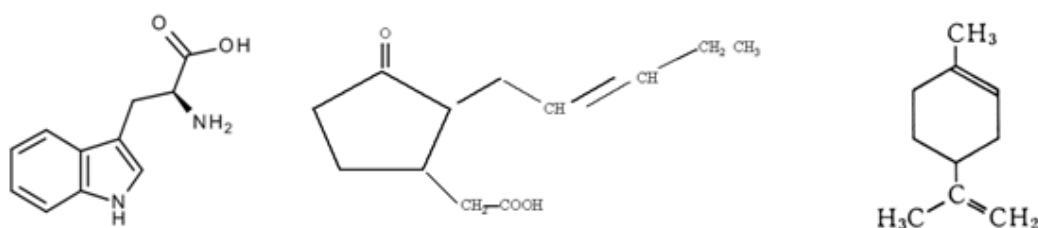


Figura 2. La primera de las estructuras representa el triptófano, el cual participa en la formación de los compuestos fenólicos. La segunda estructura corresponde al ácido jasmónico, un derivado de ácido, una de sus funciones es la senescencia de la planta y regulador del crecimiento. La tercera estructura corresponde al limoneno, un tipo concreto de terpeno.

Los diferentes compuestos aromáticos de las plantas, provienen de rutas metabólicas totalmente distintas (Fig. 3). Las diferentes vías metabólicas (Maffei, 2010) dan lugar a productos como son por ejemplo el isopreno, la β - ionona, TMTT o linalol que provienen de la ruta de síntesis de DMAPP e IPP, como se ha mencionado anteriormente es una ruta producida en el interior de los plastos. En una vía contigua se da lugar a los sesquiterpenos, de los cuales podemos obtener dos rutas más que dan lugar a compuestos tales como β - farneseno o DMNT, las cuales tienen lugar en el citoplasma de la célula. Otra ruta de síntesis, es la que da lugar a las oxilipinas, las cuales se originan a partir de ácidos grasos. Otras vías producen compuestos bencenoides tales como indol, eugenol o MeSA. Tanto las oxilipinas como los bencenoides son producidos en el citoplasma de la célula.

cuantitativa sobre los compuestos emitidos. El método consiste en la volatilización de los compuestos del material vegetal al espacio libre y desde allí se captura una fracción de los compuestos producidos (Fig. 4). En dicha figura se observa cómo se utiliza un vial para la obtención de los VOCs, pero en algunos casos se puede utilizar también una bolsa de plástico específica, donde se almacenaran los compuestos y así podrán ser absorbidos por la fibra. En cuando a la metodología dinámica, es inicialmente similar a la anterior, pero se inyecta una cantidad de aire conocida, el cual será posteriormente adsorbido junto con los aromas del vegetal. Finalmente las fibras del SPME, necesitará una desorción térmica en el GC - MS, analizador de gases - masas (Raguso, 2004).

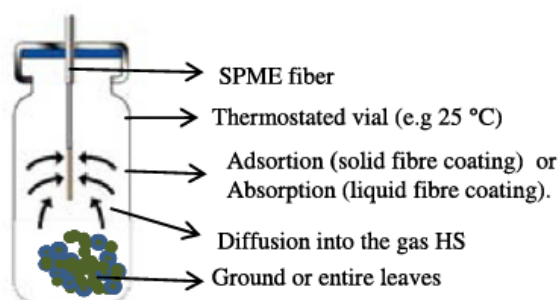


Figura 4. Técnica SPME. Observamos el paso de los compuestos volátiles almacenados en el material vegetal al medio que lo rodea y desde allí es absorbido / adsorbido por la fase líquida o sólida (dependiendo del método). (Ormeño, 2011).

En los últimos años, se ha incrementado el número de investigaciones relacionadas con los VOCs, dando así un enfoque ecológico basado en las funciones moleculares de las plantas. El estrés que sufre la planta, tanto biótico como abiótico, se ve reflejado en los compuestos volátiles que forma y por tanto afecta al ecosistema. Con todo ello, podemos empezar a comprender las respuestas elaboradas por las plantas, así como también la comunicación con otros organismos. Ello está relacionado con el cambio climático, ya que produce estrés a la planta, tanto biótico como abiótico. Por ello es una nueva vía de estudio, cada vez más amplia.

3 - OBJETIVOS

Como objetivo general se tiene la realización del estudio de dos especies del mismo género (*Asparagus albus* L. y *Asparagus acutifolius* L.). Dichas especies presentan diferencias en la sexualidad de las flores y coinciden a veces tanto en el hábitat (espacio que ocupan) como en el periodo de floración. El estudio en concreto se basará en el análisis inicial de la fenología de la floración. El análisis de los VOCs producidos en la floración. Así como el análisis de las diferencias entre ambas especies, y cómo puede esto afectar a las visitas de los polinizadores. Con todo ello se pretende extraer una conclusión sobre si los VOCs tienen relevancia taxonómica entre las dos especies citadas.

4 - MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 - Materiales, especies

En el trabajo realizado, son utilizadas dos especies de *Asparagus* próximas taxonómicamente. *A. acutifolius* (Fig. 5), es una planta verde, con rizoma corto y raíces cilíndricas y suculentas. Las hojas están reducidas a escamas membranosas, siendo de color marrón; las inferiores presentan un espolón espinescente o un poco obtuso. Forman turiones (brotes que nacen de un tallo subterráneo) o espárragos verdes, finos y largos, con gusto dulce o un poco amargo. Dichos turiones (espárragos) dan lugar a un tallo cilíndrico muy ramificado (una mata densa), pudiendo llegar a medir hasta un metro. La floración se da entre los meses de Agosto y Septiembre. Son plantas dioicas (plantas masculinas y plantas femeninas), y presentan las flores generalmente de forma solitaria, unidas al tallo mediante pedúnculos cortos. El periantio tiene forma campanilleada, pudiendo llegar a medir 3mm de longitud. Los tépalos que forman la flor están soldados en casi su totalidad o al menos hasta la mitad de éstos, presentan un color amarillento - verdoso. Los estambres presentan un filamento dos veces más largo que las anteras y están insertados sobre la base de los tépalos. El ovario se presenta de forma blanquecina y globulosa en las flores femeninas, los estilos son más cortos que los estambres, terminando en un estigma bifido y amarillo. Dicho ovario, está formado por tres cavidades, al ser fecundado dará lugar a una baya de color verde, que al madurar cambiará a color negro.



Figura 5. Imagen de *A. acutifolius*, pueden observarse las flores.

La segunda especie tratada a lo largo del experimento es *A. albus* (Fig. 6). Dicha planta presenta tallos blancos, con un rizoma corto y ramificado, del cual salen raíces cilíndricas y suculentas como en el caso anterior. Los tallos por otro lado son erectos y bastante gruesos, pudiendo llegar a alcanzar el metro de altura, formando también una mata espinosa. Las hojas están reducidas a escamas membranosas marrones, con un espolón leñoso y espinoso; las

superiores pueden llegar a medir 12 mm. Presenta cladodios fasciculados de hasta 3cm de longitud, cuando éstos se caen, dejan el tallo desnudo y blanco, momento en el que se lleva a cabo la floración. Dan lugar a espárragos amargos, que formarán los tallos y ramas blancos y lisos. En este caso, las ramas se disponen de forma abierta, un poco curvadas y más o menos en zig - zag. La floración tiene lugar en los meses de Julio a Octubre. Dicha planta da lugar a flores hermafroditas (flores masculinas y femeninas), situadas bajo las hojas, agrupadas en 6 - 12 flores por hoja. Presentan color blanco, pedúnculos erectos y lisos en la mitad inferior. El perianto que forma la flor puede medir hasta 4mm y está constituido por tépalos soldados en la base formando un tubo muy corto. Los estambres quedan dentro del perianto al ser más cortos, el filamento es más grueso en la base y están insertados en la mitad de los tépalos. Las anteras son dos o tres veces más cortas que el filamento. En cuanto al ovario, cabe decir que es ovado o globuloso, con tres cavidades y un estilo muy corto, terminado en un estigma trífidio. El fruto formado es una baya globulosa y roja, que al madurar torna de color negro. Del fascículo de flores solo producen fruto una o dos, el resto suelen ser estériles.



Figura 6. Imagen de *Asparagus albus*, pueden observarse tanto las flores como el fruto.

Cabe mencionar que a pesar de que la floración de ambas especies se da a finales de verano, se han encontrado algunos ejemplares aislados en flor. Esto es debido a cambios bruscos en el clima.

4.2 - Materiales, instrumentos

Otro instrumental utilizado fueron pinzas y viales cerrados para la recogida de flores. Para la estabilización de la producción de VOCs, los viales se dispusieron al baño maría durante 30 minutos. Dicho aparato permite el calentamiento de sustancias mediante la ebullición de

agua. La extracción de los compuestos se realizó mediante un pincel PDMS/DVD y un cromatógrafo de gases. El primero sirve para capturar los olores que se encuentran en el tubo con las flores; consta de una membrana flexible, la cual es muy útil para la acumulación de compuestos muy concentrados (Oliveira, 2014). Dicho pincel cuenta además de una fibra de divinilbenzeno para la extracción de los compuestos. Para la fijación por la fibra, se dejó en contacto durante 30 minutos en el head space. Por lo que se refiere al cromatógrafo de gases (Fig. 7) sirve para separar y analizar las sustancias volátiles de una mezcla; cuya técnica se basa en la distribución de los componentes en dos fases, una fija y otra móvil. Es en la fase móvil donde el gas fluye a través de una columna donde se encuentra la fase fija que analiza la muestra. El cromatógrafo de gases - masas acopladas a espectrometría de masas (GC - MS) es un Agilent 6980 GC - MDS 5975 inerte XL, el cual presenta una columna capilar Supelcowax 10 (60 x 0.25mm de diámetro interno y 0.25mm de espesor de la película).



Figura 7. Cromatógrafo de gases, instrumento utilizado para la extracción de compuestos volátiles.

Los datos obtenidos en la cromatografía son leídos por el software de GC - MS, el cual detalla qué compuesto volátil contiene la muestra. Se comparan los resultados de dicho software con la biblioteca de VOCs de NIST MS 2.0, con tal de obtener el nombre del compuesto de forma más precisa.

Para la determinación de las especies polinizadoras, se utilizó una manga entomológica para intentar capturar el animal. Otro elemento de ayuda a la hora de determinar la especie fue el material fotográfico que se pudiera hacer del animal. Para la determinación de los géneros de especies polinizadoras, se usó el libro "Las familias y géneros de las abejas en España" de Carlos Pérez - Íñigo Mora (Universidad Complutense, 1982).

Finalmente, una vez recogidos todos los datos, se procederá a su análisis mediante un el programa Excel. Con dicho programa podrán extraerse gráficas y el índice de retención, entre otros resultados.

4.3 - Métodos, fenología

De ambas especies se realizó un seguimiento fenológico, en el que se contaban el número de flores abiertas que había en cinco ramas marcadas al azar, de cinco plantas diferentes

en la misma localidad (Tabla 1). Dicho seguimiento se realizó cada 3 días en *A. acutifolius* mientras que en *A. albus* se realizó cada 5 - 7 días. Dicha medida era tomada a la misma hora del día, a primeras horas de la mañana.

4.4 - Métodos, polinizadores

Para el seguimiento de polinizadores y su relación con las especies estudiadas, se tuvieron que recoger ejemplares de los animales polinizadores. Se capturaban los insectos mediante una manga entomológica, guardándose en un recipiente para su posterior determinación. También se hicieron fotografías de algunos polinizadores como ayuda a la hora de determinarlos. La determinación se llevó a cabo mediante el libro de determinación citado anteriormente en el apartado de materiales. Además de ello, se contaban el número de visitas por planta un día durante el periodo de floración. La observación se llevaba a cabo en tres plantas a la vez, cada hora desde las 6:00 a las 16:00 hora meridiana, durante diez minutos cada hora. La observación se llevó a cabo en cada localidad de seguimiento (Tabla 1) en tres plantas siempre y cuando las condiciones climáticas fueran normales.

4.5 - Métodos, VOCs y su análisis

Para la extracción de Compuestos Volátiles fueron recogidas diez flores, de tres plantas diferentes por cada especie, en momentos distintos del día (las horas fueron 8:00, 12:00 y 16:00). La diferencia horaria de recogida de muestras es importante ya que según Raguso (2004), es importante conocer la relación entre los aromas producidos a diferentes horas y sus polinizadores, ya que puede ser vital a la hora de seleccionar la especie a polinizar. Se recogieron flores que habían florecido hacía un día, dos o tres (que es el total de la duración de la floración de ambas especies); para observar las diferencias a lo largo de la floración. De cada una de las plantas muestreadas se hicieron tres réplicas para obtener resultados representativos. Las flores recogidas se guardaron a una temperatura entre 18 - 23° C durante el traslado al laboratorio de análisis, guardándose en botellas de vidrio. Esto se hizo con la finalidad de homogeneizar los aromas de las diferentes flores, ya que fueron recogidas en sitios con distancias distintas con respecto al lugar de análisis. Los lugares de recogida de muestras fueron los descritos en la Tabla 1.

Para la extracción de VOCs de las flores, primero se deben poner las muestras al baño maría durante 30 minutos a 30°C. De esta manera se consigue homogeneizar los aromas. Posteriormente se coloca el pincel (en esta extracción se usó el modelo PDMS/DVD) durante media hora en el vial donde se encuentran las flores para extraer los aromas. A continuación, se introduce el pincel en el cromatógrafo, dejándolo tres minutos (donde un minuto son cien segundos), para que todos los aromas pasen al cromatógrafo, fase de desorción térmica. Una vez

se ha realizado la transferencia de los aromas del pincel a la máquina, se deja unos 48 minutos, en los cuales se va aumentando la temperatura desde 45°C hasta alcanzar los 280°C. Se inicia el proceso en 45°C durante dos minutos, después asciende a 250°C y se va incrementando la temperatura en cinco grados cada minuto; finalmente se llega a los 280°C donde permanece durante cinco minutos más. De esta manera se consiguen extraer todos los Compuestos Volátiles, dependiendo de la temperatura se expresarán en un tiempo determinado u otro. La cromatografía obtenida, junto con el software GC - MS y el NIST MS 2.0 de determinación de volátiles, permitirá hallar con precisión qué compuestos presentan las flores de la planta. Dicha base de datos nos presenta mediante porcentajes los posibles compuestos determinados en la cromatografía; si el porcentaje del programa es inferior al 50% no lo tendremos en cuenta y habrá de buscarse el compuesto en otra base de datos, mediante un código proporcionado por el cromatógrafo (denominado CAS). Aun así hay veces en los que el compuesto no es identificado, teniendo que dejarse así sin clasificar. Todos estos datos, fueron tratados con el programa Excel, de esta manera se pudieron obtener unos resultados más visuales y representativos.

4.6 - Métodos, ensayos de auto - compatibilidad

Se realizaron también ensayos de auto - compatibilidad, para saber cuál es la tasa de fructificación en caso de flores unisexuales y hermafroditas, en condiciones similares a las naturales. En esta parte, se cultivaron tres ejemplares de *A. albus* y seis ejemplares de *A. acutifolius* (tres hermafroditas y tres femeninas). Estos individuos fueron sembrados a como mínimo 100 metros de distancia para evitar el cruzamiento y observar así la producción de frutos. Para saber la localización de los cultivos aislados ver la tabla conjunta de datos (Tabla 1).

Localidad	UTM	Fenología	Polinizadores	VOCs	Cultivos	Bioclima
1	DD67	Albus	Albus	Albus	Albus	TS
2	DD69	Acutifolius	Acutifolius	Acutifolius	Albus	TS
3	DD69		Albus	Albus		
4	DE70	Albus	Albus	Albus		TSH
5	DD79	Albus; Acutifolius	Albus; Acutifolius	Albus; Acutifolius		TSH
6	DD89	Acutifolius		Acutifolius	Acutifolius	TSH

Tabla 1. Localidades de muestreo y cultivo. 1= Palma-Génova; 2= Palma-UIB-Can Quintana; 3= Palma-Poliesportiu UIB; 4= Entre Bunyola i Coll de Sóller; 5= Son Termes; 6= Entre Alaró i Orient; Albus= *Asparagus albus*; Acutifolius= *Asparagus acutifolius*; TS= termomediterráneo seco; TSH= termomediterráneo subhúmedo.

5 - RESULTADOS

5.1 - Fenología

Los resultados obtenidos del seguimiento fenológico, para ambas especies, fueron los representados en la Figura 8. La fecha de inicio del estudio fenológico fue el día 15 de Agosto de 2013 y se obtuvieron resultados durante los siguientes 42 días.

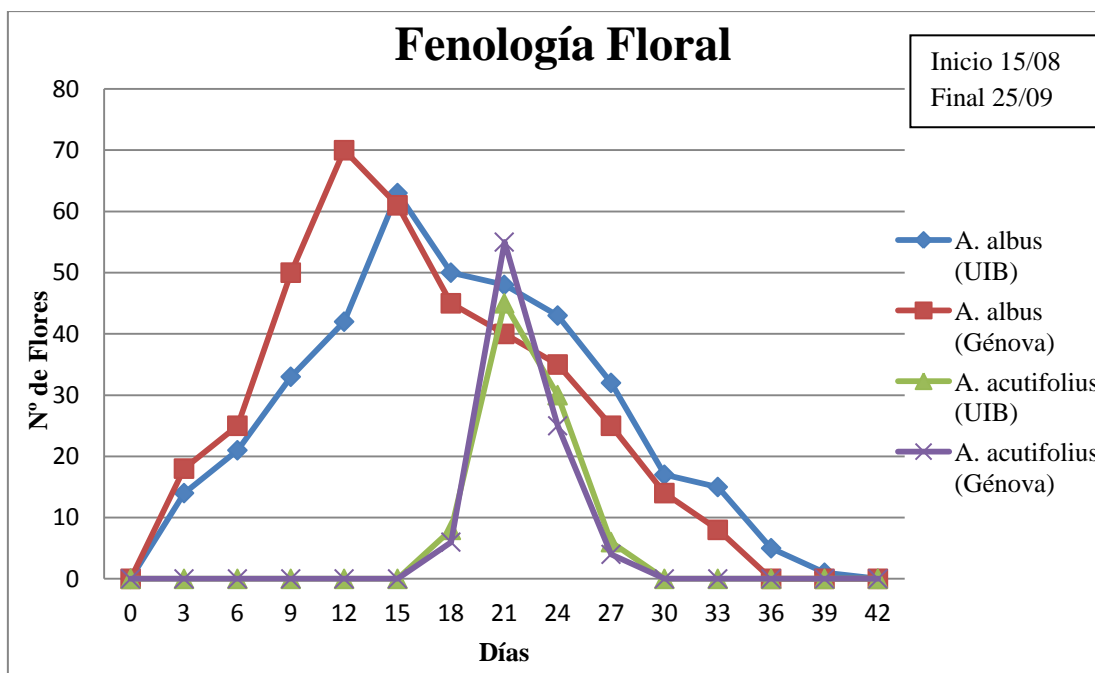


Figura 8. Representación de los resultados fenológicos de ambas especies de *Asparagus*, a lo largo de 42 días de observación.

Se puede observar en la gráfica anterior, como el periodo de floración de *A. albus* es mucho más longevo que el periodo de *A. acutifolius*. En este segundo caso, vemos como se centra básicamente en seis días, presentando un mayor número de flores al tercer día del inicio de la floración. Por el contrario, *A. albus* presenta una floración de alrededor de 39 días. Si bien es cierto que presenta su punto más álgido entre los 10 - 20 días, el resto de días presenta floración aunque sea en menor proporción. Al presentar una floración más duradera, está más expuesta a poder ser polinizada por insectos durante más tiempo. Como no es el caso de *A. acutifolius* que al presentar una floración tan corta los polinizadores tienen menos tiempo para poder polinizar las plantas vecinas.

A lo largo de las primeras semanas de Junio como se ha mencionado anteriormente, se han encontrado varios ejemplares florecidos de ambas especies. Causa de una sequía y posteriores lluvias. Al ser una floración a destiempo y con muy pocos ejemplares, no se ha tenido en cuenta a la hora de realizar estos resultados, ya que son poco significativos.

5.2 - Polinizadores

En cuanto al seguimiento de polinizadores, se observaron en *A. albus* principalmente los géneros *Apis mellifera* y una especie del género *Lasioglossum* (Fig. 9 y 10). Además de éstos, se pudieron observar otros polinizadores, pero en una proporción menor. Tan solo se llegó a nivel de género a la hora de determinar algunos de los polinizadores. Por lo que se refiere a *A. acutifolius*, solo se observó presencia de *Apis mellifera*.

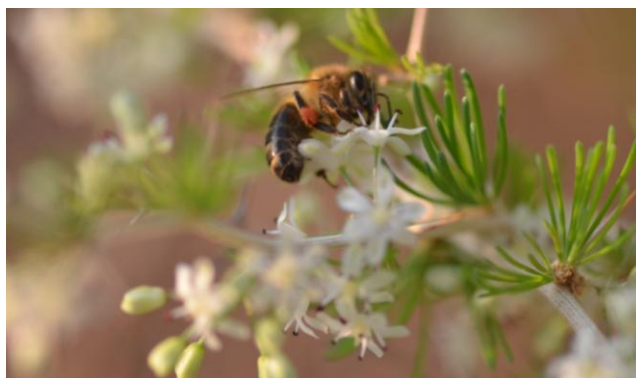


Figura 9. Polinizador de *A. albus*. Especie del género *Apis*.



Figura 10. Género *Lasioglossum* polinizador de *A. albus*.

En cuanto al número de visitas por parte de los diferentes polinizadores en *A. albus*, se puede decir, que el polinizador mayoritario es *Lasioglossum* (Fig. 11). El momento donde se encuentra mayor número de polinizadores, es justo en el tercer muestreo, el cual se realizó al mediodía. Este alto valor de polinizadores coincide con un alto valor de VOCs. Se comprueba en la gráfica que son las especies de *Apis* y *Lasioglossum* las más abundantes, ya que el resto de especies no determinadas se encuentran en una proporción muy baja; siendo éstas últimas más abundantes durante la tarde (muestreos tres, cuatro y cinco; con una, dos y una visita respectivamente). Por lo que se refiere a *Apis*, presenta un alto porcentaje a primeras horas de la mañana sufriendo un gran descenso a lo largo del día, teniendo un porcentaje nulo de visitas a partir del mediodía.

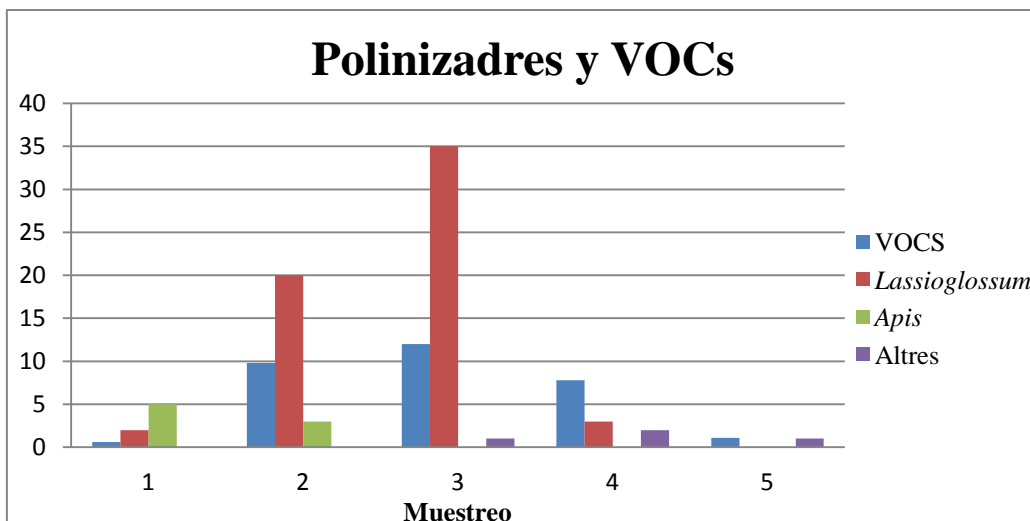


Figura 11. Gráfica representativa del número de polinizadores que visitaron las diferentes plantas observadas, frente a la cantidad total de aromas encontrados en *A. albus*.

5.3 - VOCs

Una vez realizada la extracción de aromas, VOCs, se obtienen del cromatógrafo gráficas como la siguiente Figura 12. Se pueden reconocer los diferentes compuestos presentes en los aromas recolectados.

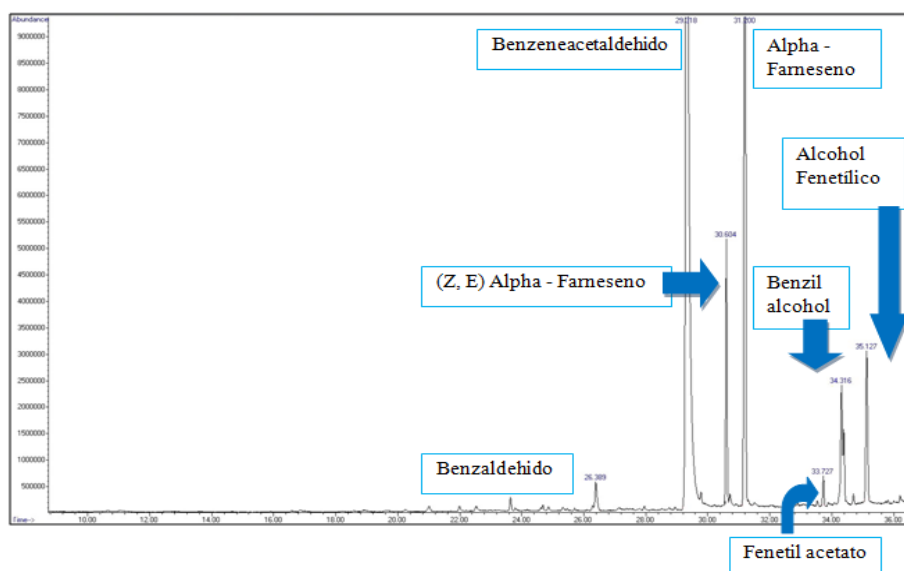


Figura 12. Cromatografía obtenida de las muestras de *A. albus*, extraídas en el Coll de Sóller por la tarde.

Primeramente, cabe mencionar los diferentes compuestos que se obtuvieron en *A. albus*, como se muestra en la gráfica siguiente (Fig. 13) y en la tabla conjunta con *A. acutifolius* (Tabla 2), donde aparecen las medias de las cantidades de cada uno de ellos. Como se puede observar hay uno de los componentes que sobresale por encima del resto, dicho compuesto es el benzeneacetaldehido. Otro compuesto a remarcar, sería el α - farneseno. Así pues vemos como

los compuestos mayoritarios son bencenoides (bencenacetaldérido) y sesquiterpenos (farneseno)

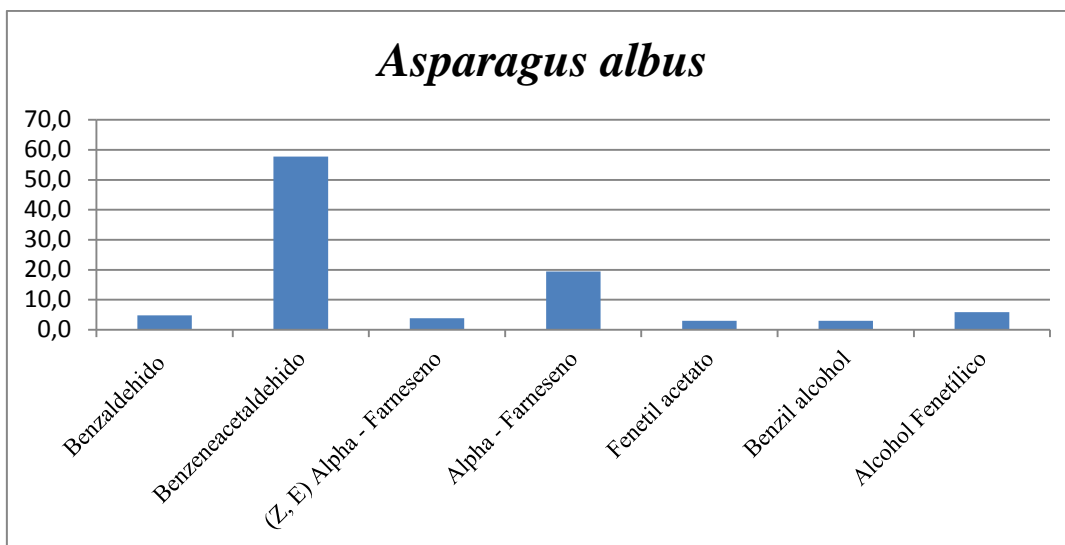


Figura 13. Valores medios de las proporciones de los VOCs presentes en los aromas de *A. albus* (en %).

A continuación se presenta una gráfica representativa del cambio de los dos aromas mayoritarios de *A. albus* a lo largo del primer día de floración (Fig. 14).

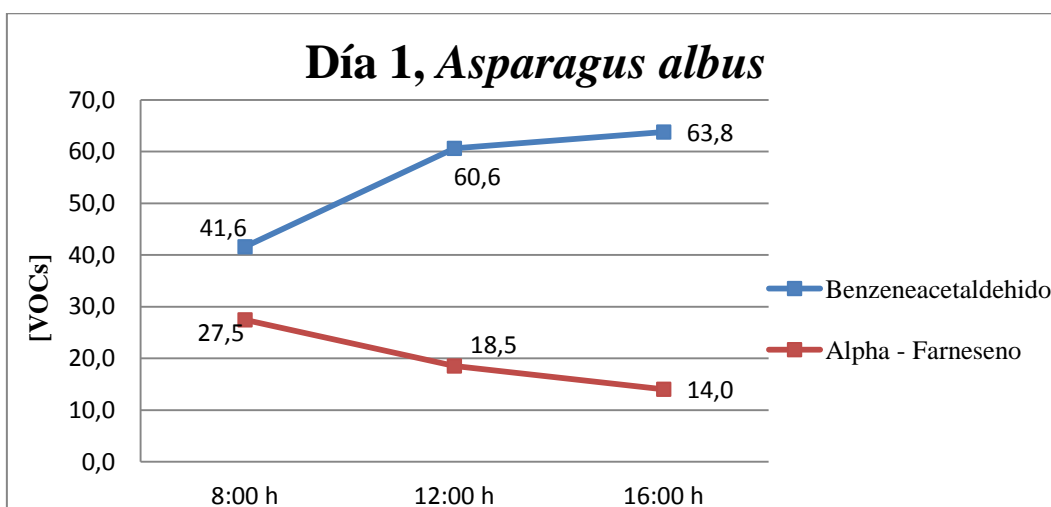


Figura 14. Evolución de las concentraciones de los dos principales VOCs presentes en las flores de *A. albus* durante el primer día de floración (en %).

Se puede observar en la gráfica como el Benzeneacetaldérido, muestra un incremento de concentración según avanza el día, llegando a su punto máximo por la tarde. Por otro lado, el α - Farneseno, muestra un descenso en su concentración. El punto más alto de dicho compuesto es a primera hora de la mañana, aunque no llega a superar las concentraciones de Benzeneacetaldérido. Sin embargo cabe considerar la evolución diaria del contenido total de VOCs en las flores (Fig. 11).

De *A. acutifolius*, se obtuvo el siguiente cromatograma de aromas (Fig. 15). En él se reconoce la importancia del compuesto dihidro - β - ionona y similares, así como también la menor importancia del α - farneseno. Es notable destacar la ausencia de compuestos benzoicos.

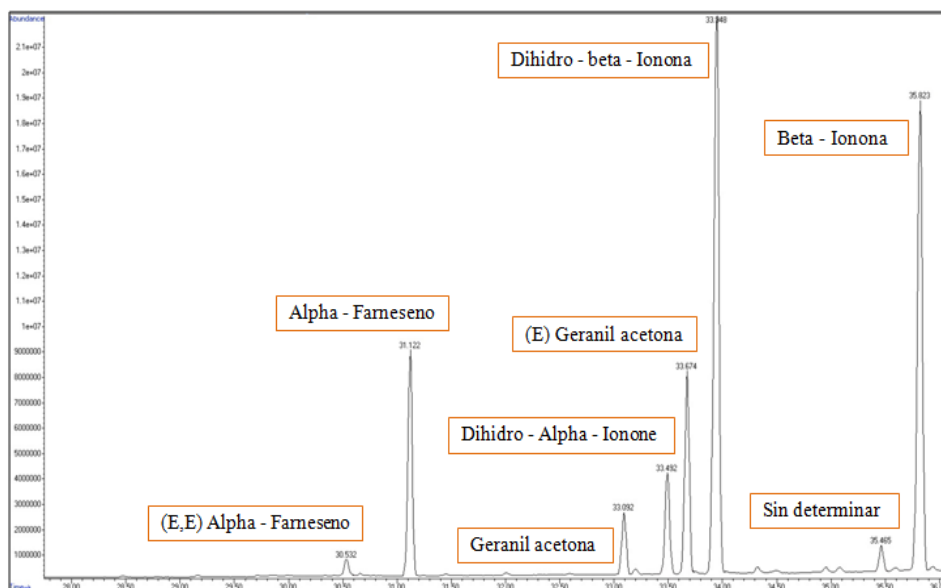


Figura 15. Cromatografía obtenida de las muestras de *A. acutifolius*, extraídas en la zona entre Alaró i Orient al mediodía.

En la Figura 16 y la tabla 2, se observa que los componentes mayoritarios de *A. acutifolius* son dihidro - β - ionona y β - Ionona (con valores similares). Pese a su presencia menor, a éstos se les puede agregar por su similitud química la dihidro - α - ionona. A diferencia de la otra especie, vemos como el α - farneseno no es muy abundante, pero aun así presenta dos isómeros de éste. Por otro lado, también se constata la presencia de geranil acetona.

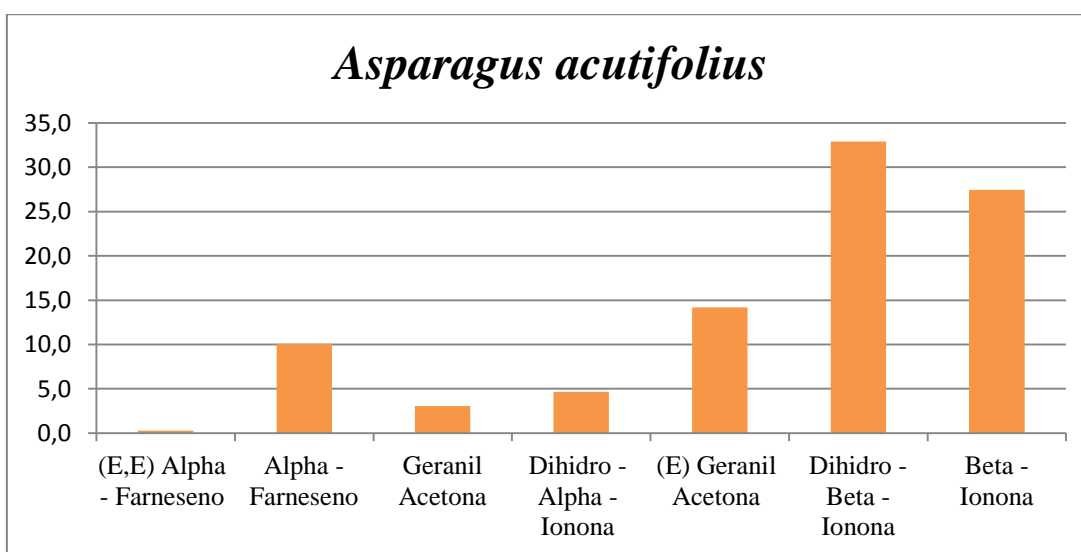


Figura 16. Gráfica que representa las medias de las concentraciones de los diferentes compuestos obtenidos para la especie *A. acutifolius*.

A continuación se muestran una gráfica representativa de los compuestos mayoritarios de ambas especies (Fig. 17), y una tabla con las medias de todos los compuestos presentes en las dos especies de *Asparagus*, remarcándose los compuestos mayoritarios de ambas así como aquellos que son diferenciales de cada una de las especies (Tabla 2).

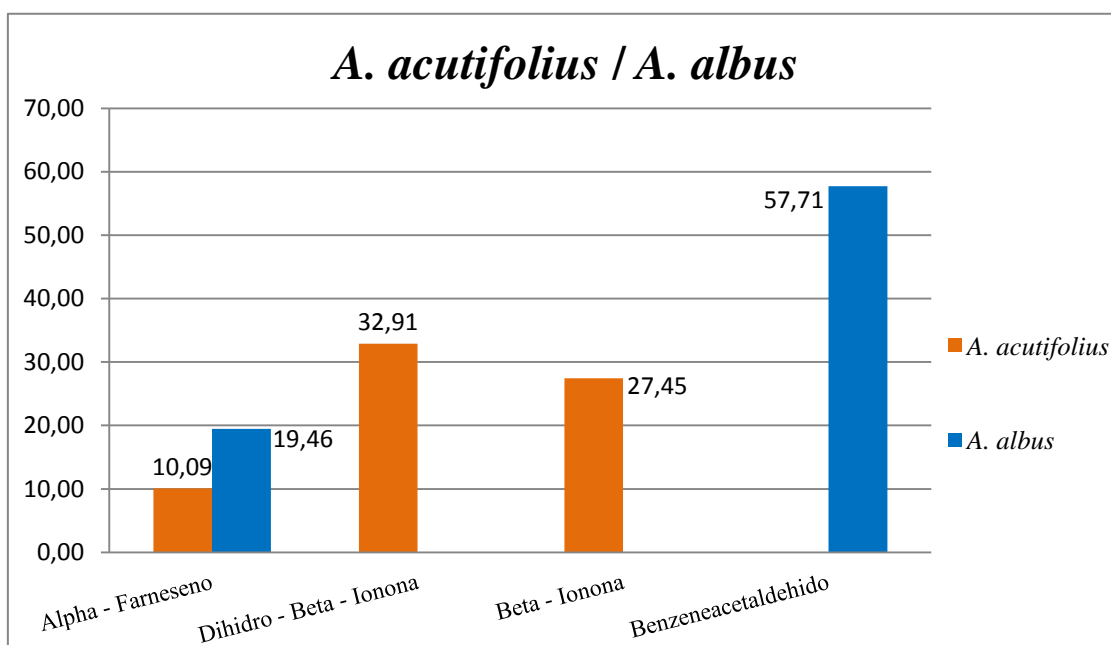


Figura 17. Representación de las cantidades más elevadas de los compuestos de ambas especies de *Asparagus*.

<i>A. albus</i>		<i>A. acutifolius</i>	
Compuesto	%	Compuesto	%
Benzaldehído	4,86		
Benzeneacetaldehido	57,71		
		(E,E) α -Farneseno	0,30
(Z, E) α -Farneseno	3,90		
α-Farneseno	19,46	α -Farneseno	10,09
		Geranil Acetona	3,06
		(E) Geranil Acetona	14,19
		Dihidro- α -Ionona	4,66
		Dihidro-β-Ionona	32,91
		β-Ionona	27,45
Fenetil acetato	2,98		
Benzil alcohol	3,02		
Alcohol Fenílico	5,85		

Tabla 2. Tabla representativa de los diferentes compuestos de ambas especies. Presenta remarcados los compuestos mayoritarios de ambas especies. Así como también se observan aquellos compuestos diferenciales.

Como se puede ver en la gráfica, *A. albus* presenta un compuesto con una alta concentración, el benzeneacetaldehído, posteriormente encontraríamos el α - farneseno. Si estas cantidades las comparamos con *A. acutifolius*, podemos comprobar cómo no llegan a concentraciones tan elevadas como el primero. Si bien es cierto, *A. albus* llega a unas cantidades tan elevadas de un compuesto, el resto de ellos son cantidades muy bajas, más parecidas a las que presenta *A. acutifolius* en el resto de sus componentes. Además cabe resaltar que *A. albus* presenta un contenido de volátiles cuatro veces superior que la especie *A. acutifolius* (Tabla 1).

5.4 - Ensayos de auto - compatibilidad

Por lo que respecta a los ensayos de auto - compatibilidad, se puede decir que los cultivos de *A. albus* no presentaron autofecundación. Mientras que *A. acutifolius* presentó entre un 8 - 12% de fructificación, pero sólo en las flores hermafroditas. Por lo que se refiere a las flores femeninas, no se observó ningún tipo de fructificación. Con todo ello se puede concluir que *A. acutifolius* sí es auto - compatible. Por el contrario, podemos decir que *A. albus* se comportó como auto - incompatible por lo que depende totalmente de la actividad de los polinizadores, que permitan el transporte del polen de plantas próximas.

Un aspecto que cabe remarcar del experimento, es que éste forma parte de un experimento mayor, en el cual se realizan las extracciones de los aromas de las flores blancas de verano. Por ello, en el caso de *A. acutifolius* no se han podido obtener los mismos resultados que en *A. albus*. Es el motivo por el que no se puede realizar la comparativa de los VOCs a lo largo del día de ambas especies. Además este año se realizarán más exhaustivamente pruebas de auto - compatibilidad, para saber en qué medida actúan los polinizadores, ya que en el experimento no se aislaron por completo las flores.

6 - DISCUSIÓN

Como se ha observado en los resultados de fenología, el periodo de floración de ambas especies es diferente, aunque coincidan temporalmente. *A. albus*, amplia, de tanto a tanto; *A. acutifolius* corta intensa y con una gran sincronía individual y poblacional.

Según Knudsen (1999), dos especies de un mismo taxón pueden compartir características muy similares tanto morfológicas como fenológicas, pero en su análisis floral presentar grandes diferencias. Según los resultados obtenidos de la fenología y los conocimientos previos de las especies a tratar, se puede decir que sí presentan similitudes. Pero para verificar nuestras hipótesis se deben contrastar los resultados obtenidos de la extracción de compuestos volátiles con la información fenológica y previa al experimento.

Como ya se ha mencionado, es cierto que se han encontrado ejemplares en flor en otras épocas (Junio). Esta floración solo es parcial (% de ejemplares menor). Esta floración extemporánea parece estar determinada por condiciones climáticas (meso o micro - climáticas) particulares.

A menudo la composición de los VOCs es un rasgo peculiar para cada especie (Grajales, 2011), aunque también pueden presentarse similitudes entre determinadas especies. Entre *A. albus* y *A. acutifolius* podemos comprobar que existen diferencias cualitativas y cuantitativas entre ellas, de modo que existen compuestos comunes (aunque en proporciones distintas) y compuestos diferenciales. Un compuesto común es el α - farneseno (diferentes isómeros). De modo que es mayoritario en *A. albus*, pero minoritario en *A. acutifolius*. Por el contrario, son diferenciales el grupo de los bencenoides en *A. albus* y el de las iononas (*A. acutifolius*).

Como se ha explicado anteriormente (Maffei, 2010) existen tres vías principales de síntesis de VOCs (Fig. 18). Los compuestos obtenidos pertenecen a diferentes grupos, tales como terpenos (farneseno, geranil e ionona) y bencenoides (compuestos aromáticos). Dudareva (2006) explica las diferentes vías de síntesis para los grupos de terpenos, los cuales son: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y hemiterpenos. De todos estos, *A. acutifolius* presenta diterpenos (Geranilacetato e Ionona) y sesquiterpenos (Farneseno), estos últimos también presentes en *A. albus*. Ambos provienen de una misma ruta metabólica. Es de esta forma cómo podemos decir que ambas especies están relacionadas quimio - taxonómicamente, ya que presentan compuestos provenientes de una misma ruta metabólica, confirmando así la principal hipótesis. Si bien es cierto que la mayoría de los compuestos presentes en *A. albus* son bencenoides (los cuales siguen otra ruta metabólica totalmente distinta) uno de los principales es un sesquiterpeno. Son estos sesquiterpenos los que dan lugar mayoritariamente a las fragancias

de las flores (Maffei, 2010). Es por esta razón por la que podemos confirmar que ambas especies son similares, compartiendo así un mismo género, ya que nos basamos en la composición de sus aromas florales.

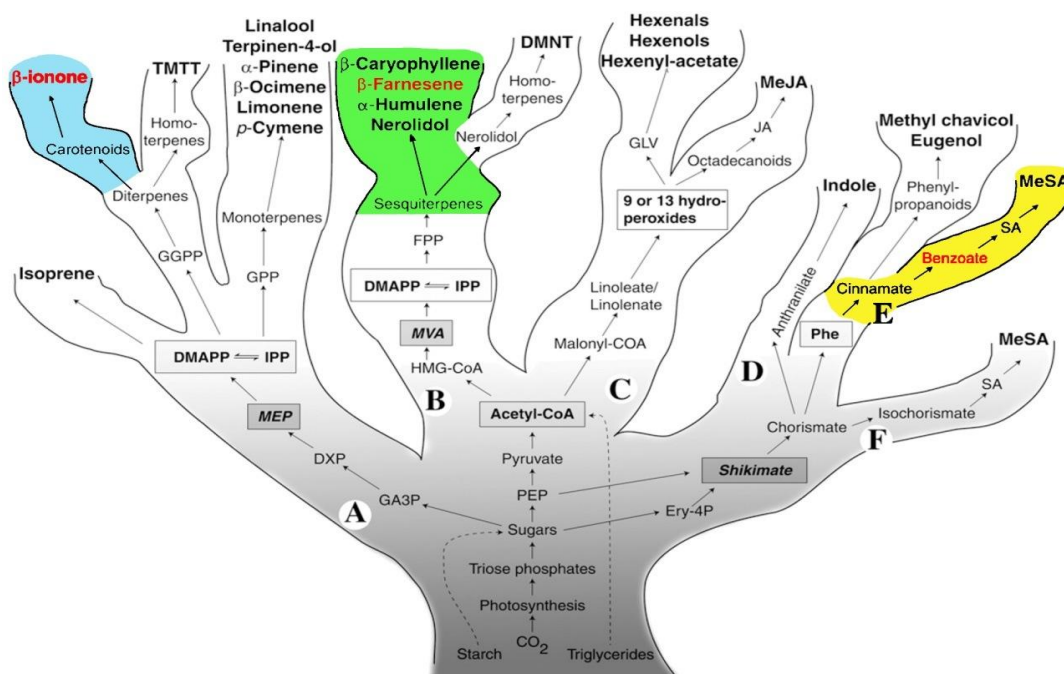


Figura 18. Árbol representativo de las diferentes vías de síntesis de VOCs, remarcando las vías obtenidas en el experimento.

La mayoría de estudios realizados en cuanto a la relación de plantas y polinizadores es a nivel visual. Pero actualmente se sabe que una combinación de la parte visual con la olfatoria podría ser el motivo por el cual un polinizador visita una especie determinada y no otra (Armengol, 2013). Además dicha combinación puede favorecer a la recuperación de recuerdos en polinizadores a la hora de visitar una planta, así como también encontrar la localización de más individuos de una especie (Maffei, 2010). Si bien es cierto que faltan estudios sobre los polinizadores de las especies de *Asparagus* se puede decir que, *A. acutifolius* es menos específica a la hora de ser polinizada, ya que tan solo se observó un tipo de polinizador. Lo cual puede estar relacionado con el hecho de que presentó unos resultados más positivos en los ensayos de auto - compatibilidad. Además de ello, es la especie que presenta una época de floración más corta, lo cual podría explicar porqué presenta una tasa mayor de auto - compatibilidad. Por otro lado, *A. albus* presenta diversos tipos de polinizadores y una capacidad inferior de auto - compatibilidad, el primer caso está ligado a la combinación de los compuestos aromáticos que expresa la planta, los cuales no son específicos de una sola especie. Dicha especie es la que presenta mayores cantidades de sesquiterpenos y bencenoides, que como se ha mencionado anteriormente son los que producen mayormente las fragancias de las flores y por

tanto atraen a los insectos. De las dos especies es la que presenta mayor cantidad de VOCs y por ello las visitas de polinizadores son mucho mayores en *A. albus*, lo que hace pensar que por esta razón presenta tasa de auto - compatibilidad menores. Ya que cuando hay polinizadores no tiene la necesidad de auto - fecundarse, no como en el caso de *A. acutifolius* que no emite tantos VOCs y sí tiene una alta tasa de autofecundación.

Como se muestra en los resultados de *A. albus* las cantidades de VOCs varían a lo largo del día. Según Grajales (2011) esto puede darse debido a cambios en la temperatura, humedad relativa, exposición al sol o si ha sido visitada o no por el polinizador. Se realizó un estudio con dos especies de cardos donde se observó como los compuestos volátiles disminuían en plantas que ya habían sido polinizadas (Grajales, 2011). Como se observa en la Figura 14, uno de los compuestos mayoritarios disminuye durante el día, mientras que otro de los mayoritarios aumenta. Esto puede ser debido a la visita del polinizador o simplemente a los propios cambios de la flor para intentar atraer a los diferentes polinizadores a distintas horas. Como ya se ha mencionado, es a las horas donde los VOCs son más abundantes, donde se registran una mayor cantidad de polinizadores.

Para saber cómo afectan los diferentes polinizadores a las poblaciones a las que sirven, se realizan estudios genéticos, no vinculados directamente a los volátiles; pero que permiten saber el efecto de polinizadores sobre plantas auto - compatibles (Whitehead, 2009). Dicho método podría ser interesante en el experimento llevado a cabo para aportar información más concreta sobre la forma de polinización de ambas especies.

7 - AGRADECIMIENTOS

Dedicarle todos los agradecimientos a Leonard Llorens, que ha estado ayudándome desde el primer momento.

8 - REFERENCIAS

ARMENGOL, G.; FILELLA, I.; LLUSIA, J.; PEÑUELAS, J. 2013. *Floral volatile organic compounds: Between attraction and deterrence of visitors under global change*. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, Vol. 15, 56 - 67.

AUGUSTO, F.; LEITE E LOPES, A.; ALCARAZ, C. 2003. *Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances*. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 22, No. 3, 160 - 169.

CAISSARD, J.; JOLY, C.; et al. 2004. *Secretion mechanism of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants*. Recent Research Developments in Cell Biology, Vol. 2, 1 - 15.

DICKE, M.; LORETO, F. 2010. *Induced plant volatiles: from genes to climate change*. Trends in Plant Science, Vol. 15, No. 3, 115 - 117.

DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D.; ORLOVA, I. 2006. *Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives*. Critical Reviews in Plant Science, Vol. 25, No. 5, 417 - 440.

GRAJALES, J.; MELÉNDEZ, V.; CRUZ, L. 2011. *Aromas florales y su interacción con los insectos polinizadores*. Revista Mexicana de Biodiversidad, Vol. 82, 1356 - 1367.

KNUDSEN, J. 1999. *Floral scent differentiation among coflowering, sympatric species of Geonoma (Aracaceae)*. Plant Species Biology, Vol. 14, 137 - 142.

KUNERT, M.; DAVID, A.; BECHER, J.; BOLAND, W. 2009. *Volatile Sampling from Biological Sources by the Closed - Loop - Stripping Technique*. Cold Spring Harbor Protocols, Vol. 4, 1 - 6.

MAFFEI, M.E. 2010. *Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles*. South African Journal of Botany, Vol. 76, 612 - 631.

OLIVEIRA, A.; et al. 2013. *Identification and Recovery of Volatiles Organic Compounds (VOCs) in the Coffee - Producing Wastewater*. *Journey of Water Resource and Protection*, Vol. 6, 375 - 380.

ORMEÑO, E.; GOLDSTEIN, A.; NIINEMETS, U. 2011. *Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stores in plant species*. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 30, No. 7, 978 - 989.

ORMEÑO, E.; FERNÁNDEZ, C. 2012. *Los terpenos de las plantas*. *Investigación y Ciencia*, 62 - 69.

PICHERSKY, E.; NOEL, J.; DUDAREVA, N. 2006. *Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity*. *Science*, 808 - 811.

RAGUSO, R. 2004. *Floral Scent Analysis: a primer for the collection and characterization of fragrance*. University of South Carolina.

WHITEHEAD, M.; PEAKALL, R. 2009. *Integrating floral scent, pollination ecology and population genetics*. *Functional Ecology*, Vol. 23, 863 - 874.