



**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESIS DOCTORAL**  
**2023**

**ROLES BIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS DE LOS  
COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (COV)  
DE PLANTAS DE LAS ISLAS BALEARES**

**Juan Tomàs De Mata**



**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESIS DOCTORAL**  
**2023**

**Programa de Doctorado en Biología de las Plantas**

**ROLES BIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS DE LOS  
COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (COV)  
DE PLANTAS DE LAS ISLAS BALEARES**

**Juan Tomàs De Mata**

**Director: Llorenç Gil Vives**  
**Director: Leonardo Llorens García**  
**Tutor: Llorenç Gil Vives**

**Doctor por la Universitat de les Illes Balears**

*Voler l'impossible ens cal,  
i no que mori el desig.*

Marià Villangómez

Al meu padrí i al meu fill

## **Agraïments**

Agraït per tots aquells horabaixes jugant a “fixxetes” devora sa xemeneia, un tassó de llet amb una goteta de cafè i una llesca de pa amb oli, sa coca de flam dels dimecres de C’as Currot, encetar ametlles dins sa cuina quant era sa temporada, jugar per dins es torrent, i sobretot, per totes aquelles hores a sa Rota, per damunt una figuera, recollint els ous de les gallines dins aquell galliner, que estava davall una figuera de moro molt grossa, anant a encaçar ses ovelles, a cercar espàrrecs i caragols per ses marjades de Sa Clara Boia, o a fer llenya i a cercar esclata-sangs i cames seques per Sa Granja.

Molt agraït al meu mestre i director de tesi, Lleonard Llorens, per ensenyar-me a estimar, veure, conèixer, interpretar i entendre les plantes i el seu entorn, com ell.

Agraït al meu director i tutor de tesi, Llorenç Gil, per acompanyar-me en aquesta aventura de fer una tesi sobre botànica i ecologia, sense una beca i venint d’enginyeria agroalimentària.

Agraït a les hores per C’an Quintana, a les sortides de camp i a les moltes hores davant el cromatògraf.

Agraït als viatges viscuts durant aquest camí a Menorca, Formentera, Eivissa, Narbona, Fréjus, Finale Ligure, Lanzarote, Konjic i una partida de congressos.

Agraït als meus companys d’FP, de carrera, de màster i d’aventures botàniques.

Agraït a Trinidad García per la seva ajuda permanent amb el cromatògraf, a Marta Pol per els dibuixos amb llapis de colors, a Carles Cardona, Herminio Boira, Juan Rita, Joana Cursach, Miquel Capó, Juan Antonio Llorens-Molina, i Pere Ferriol, per haver-me ajudat i ensenyat.

Agraït a tot l’equip de neonatologia i cirurgia pediàtrica de Son Espases.

Agraït a Ca Nostra, per confiar sempre amb jo i deixar-me estudiar tot el que he volgut.

Agraït a la meua companya de vida i al meu fill



## Publicaciones derivadas de la presente Tesis

La presente tesis doctoral se presenta como un compendio de cuatro manuscritos, ya sea publicados, presentados o en preparación.

Tomàs J, Gil L, Llorens-Molina JA, Cardona C, García MT, Llorens L (2019) Biogenic volatiles of rupicolous plants act as direct defenses against molluscs: The case of the endangered *Clinopodium rouyanum*. *Flora*. 258:151428. Doi: 10.1016/j.flora.2019.151428

Tomàs J, Cardona C, Ferriol P, Llorens L, Gil L. 2022. Floral traits and reproductive biology of two Mediterranean species of *Clematis*, asynchronous and sympatric, are key food sources for pollination survival. *South African Journal of Botany*. 151: 85-94. 10.1016/j.sajb.2022.09.027.

Tomàs J, Gil L, Ferriol P, Llorens L (202X) Can floral volatile organic compounds contribute to the taxonomy of the genus *Rhamnus* sect. *Alaternus*? *Plant Systematics and Evolution*. (Under Review).

Tomàs J, Gil L, Ferriol P, García MT, Llorens L (202X) Floral scent, flowering phenology, and pollinators of two autumnal synchronic and sympatric Mediterranean *Asparagus*. *Arthropod-Plant Interactions* (Under Review).

Tabla de contenido

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
<b>RESUM</b> .....	<b>11</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
LA DIVERSIDAD QUÍMICA DE LOS AROMAS FLORALES .....	16
FUNCIONALIDADES DE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS .....	17
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>21</b>
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS FLORALES.....	22
TÉCNICAS DE MUESTREO Y EXTRACCIÓN.....	22
SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES .....	24
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>26</b>
BIOGENIC VOLATILES OF RUPICOLOUS PLANTS ACT AS DIRECT DEFENCES AGAINST MOLLUSCS: THE CASE OF THE ENDANGERED <i>CLINOPODIUM ROUYANUM</i> .....	26
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>28</b>
FLORAL TRAITS AND REPRODUCTIVE BIOLOGY OF TWO MEDITERRANEAN SPECIES OF <i>CLEMATIS</i> , ASYNCHRONOUS AND SYMPATRIC, ARE KEY FOOD SOURCES FOR POLLINATION SURVIVAL .....	28
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>30</b>
CAN FLORAL VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS CONTRIBUTE TO THE TAXONOMY OF THE GENUS <i>RHAMNUS</i> SECT. <i>ALATERNUS</i> ? .....	30
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>32</b>
FLORAL SCENT, FLOWERING PHENOLOGY, AND POLLINATORS OF TWO AUTUMNAL SYNCHRONIC AND SYMPATRIC MEDITERRANEAN <i>ASPARAGUS</i> .....	32
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>35</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>43</b>

## **ABREVIATURAS**

<b>AI</b>	acceptability index
<b>ANOSIM</b>	analysis of similarities
<b>COV</b>	compuestos orgánicos volátiles
<b>EO</b>	essential oil
<b>FID</b>	flame ionization detector
<b>GA</b>	glycolic acid
<b>GC-MS</b>	gas chromatography – mass spectrometry
<b>HS</b>	headspace
<b>IM</b>	identification method
<b>NMDS</b>	non-metric multidimensional scaling
<b>PCA</b>	principal component analysis
<b>PDMS-DVB</b>	polydimethylsiloxane divinylbenzene
<b>RI</b>	retention index
<b>SEM</b>	scanning electron microscopy
<b>SDE</b>	simultaneous distillation-extraction
<b>SIMPER</b>	similarity percentages
<b>SPME</b>	solid phase microextraction
<b>ST</b>	silicon tube
<b>T</b>	traces
<b>TD</b>	thermal desorption
<b>TIC</b>	total ion scan
<b>VOCs</b>	volatile organic compounds



## RESUMEN

Las plantas, como organismos sésiles, han desarrollado estrategias complejas que les permiten evolucionar e interactuar con los factores bióticos y abióticos del entorno. Además del despliegue floral y de ofrecer recompensas nutricionales, las plantas sintetizan y emiten una gran variedad de compuestos orgánicos volátiles (COV) que desempeñan diversas funciones fisiológicas y ecológicas. La atracción química de polinizadores, los fenómenos alelopáticos o la síntesis de sustancias tóxicas como mecanismo de defensa frente a herbívoros, son algunas de las funciones ecológicas más distinguidas de los COV.

Los COV pueden ser sintetizados en diferentes tejidos vegetales a partir de procesos fisiológicos complejos y diversos. Además, se ha corroborado una gran variabilidad temporal y espacial de las tasas de emisión de los COV, debido a la complejidad de los factores internos (genéticos y bioquímicos) y externos (abióticos y bióticos) que los regulan. Estas mezclas de aromas, permiten a las plantas ofrecer información detallada sobre su estado fisiológico y fenológico (el estado de la flor, el ataque de herbívoros, la infección por microbios, la recompensa floral disponible, etc.), que puede ser procesada por otros organismos, tanto beneficiosos como perjudiciales, que interactúan directa o indirectamente con ellas.

En la presente tesis, se ha pretendido contribuir al conocimiento de la flora balear, desde una perspectiva bioquímica, a partir del estudio de los perfiles volátiles, mediante diferentes técnicas de extracción y análisis, de un conjunto de especies mediterráneas, seleccionadas con el objetivo de considerar y evaluar diferentes aspectos ecológicos.

El primer capítulo de la tesis, representa una contribución al conocimiento de las estrategias desarrolladas por las especies rupícolas frente a los depredadores invertebrados. *Clinopodium rouyanum* (Briq.) Govaerts, es una especie endémica de Mallorca (Baleares), en peligro de extinción (VU), que crece entre 900-1400 m. Para esta especie, se describieron las características micromorfológicas de las partes verdes, mediante microscopía electrónica de barrido, se identificaron los aceites esenciales mediante destilación SDE, y los COV emitidos por las partes verdes, las flores enteras, y las corolas aisladas mediante HS-SPME-GC-MS, así como los volátiles internos de los tubos de la corola mediante ST-TD-GC-MS. Finalmente se evaluaron los efectos disuasorios de los aceites esenciales y la emisión de COV contra los invertebrados. Desde una perspectiva ecológica, concluimos que la composición de los aceites esenciales y COV que emite *C. rouyanum*, son clave para la defensa contra los herbívoros invertebrados, y su conocimiento, podría contribuir a la conservación de esta especie amenazada.

La gran variedad de formas florales de las angiospermas y la diversidad de aromas florales se han descrito como características evolutivas que han definido sus interacciones con los visitantes florales. En el segundo capítulo, identificamos y analizamos, mediante HS-SPME-GC-MS, los COV florales emitidos por dos especies simpátricas y asincrónicas arbustivas trepadoras: *Clematis cirrhosa* L. y *C. flammula* L. Documentamos los visitantes florales, y probamos el grado de dependencia de los polinizadores en el éxito reproductivo de las plantas, en función de las características florales (forma y disposición), la fenología floral, el aroma y la época de floración de cada una. La floración de estas especies en períodos de mayor estrés para los polinizadores, debido a la baja disponibilidad de especies florecidas, resulta fundamental para la supervivencia de una parte importante de la entomofauna polinizadora.

En el tercer capítulo, se enfocó desde el valor taxonómico y filogenético que representa la química de las plantas, así como el uso reciente de los COV en los estudios taxonómicos. Se identificaron los COV florales de dos especies del género *Rhamnus* (*Rh. alaternus* L. y *Rh. ludovici-salvatoris* Chodat.), así como del híbrido entre estos taxones (*Rh. Xbermejoi* Fraga & Rosselló). Los perfiles volátiles obtenidos presentaron diferencias cuantitativas y cualitativas significativas, que corroboraron su valor quimiotaxonómico como carácter discriminante entre taxones muy cercanos.

Finalmente, en el cuarto capítulo, se capturaron e identificaron los COV emitidos por las flores enteras, mediante HS-SPME-GC-MS, de dos esparragueras sincrónicas mediterráneas: *Asparagus acutifolius* L. y *A. albus* L. Para estas especies se monitorizaron diferentes poblaciones naturales de las Islas Baleares, y se estudió su fenología floral, sus polinizadores y el éxito reproductivo. Además, se discutió el fenómeno de la ginodioecia en *A. acutifolius*. La evolución de los aromas y la diversificación de los COV florales, entre especies simpátricas y sincrónicas, se entiende como una importante estrategia biológica para coexistir en un ecosistema en el que la competencia por los polinizadores puede ser un factor clave para el éxito reproductivo.

De esta manera, la presente tesis, aporta nuevos conocimientos sobre diferentes roles que desempeñan los COV de una representación de plantas mediterráneas, así como su repercusión en las interacciones con otros organismos y potencial aplicación en la quimiotaxonomía.

### **Palabras clave**

Compuestos orgánicos volátiles (COV); HS-SPME; Interacción planta - polinizadores; Aroma floral, Especies mediterráneas

## RESUM

Les plantes, com a organismes sèssils, han desenvolupat estratègies complexes que els permeten evolucionar i interaccionar amb els factors biòtics i abiòtics de l'entorn. A més del desplegament floral i d'oferir recompenses nutricionals, les plantes sintetitzen i emeten una gran varietat de compostos orgànics volàtils (COV) que exerceixen diverses funcions fisiològiques i ecològiques. L'atracció química de pol·linitzadors, els fenòmens al·lelopàtics o la síntesi de substàncies tòxiques com a mecanisme de defensa front herbívors, són algunes de les funcions ecològiques més reconegudes dels COV.

Els COV poden ser sintetitzats en diferents teixits vegetals a partir de processos fisiològics complexos i diversos. A més, s'ha corroborat una gran variabilitat temporal i espacial de les taxes d'emissió dels COV, a causa de la complexitat dels factors interns (genètics i bioquímics) i externs (abiòtics i biòtics) que els regulen. Aquestes mescles d'aromes permeten a les plantes oferir informació detallada sobre el seu estat fisiològic i fenològic (l'estat de la flor, l'atac d'herbívors, la infecció per microbis, la recompensa floral disponible, etc.), que pot ser processada per altres organismes, tant beneficiosos com perjudicials, que hi interactuen directament o indirectament.

En aquesta tesi, s'ha pretès contribuir al coneixement de la flora balear, des d'una perspectiva bioquímica, a partir de l'estudi dels perfils volàtils, mitjançant diferents tècniques d'extracció i anàlisi, d'un conjunt d'espècies mediterrànies, seleccionades amb l'objectiu de considerar i avaluar diferents aspectes ecològics.

El primer capítol de la tesi representa una contribució al coneixement de les estratègies desenvolupades per les espècies rupícules front dels depredadors invertebrats. *Clinopodium rouyanum* (Briq.) Govaerts, és una espècie endèmica de Mallorca (Balears), en perill d'extinció (VU), que creix entre 900-1400 m. Per a aquesta espècie, es van descriure les característiques micromorfològiques de les parts verdes, mitjançant microscòpia electrònica d'escombrada, es van identificar els olis essencials mitjançant destil·lació SDE, i els COV emesos per les parts verdes, les flors senceres, i les corol·les aïllades mitjançant HS-SPME -GC-MS, així com els volàtils interns dels tubs de la corol·la mitjançant ST-TD-GC-MS. Finalment es van avaluar els efectes dissuasius dels olis essencials i l'emissió de COV contra els invertebrats. Des d'una perspectiva ecològica, concloem que la composició dels olis essencials i COV que emet *C. rouyanum* són clau per a la defensa contra els herbívors invertebrats, i el coneixement d'aquests podria contribuir a la conservació d'aquesta espècie amenaçada.

La gran varietat de formes florals de les angiospermes i la diversitat d'aromes florals s'han descrit com a característiques evolutives que n'han definit les interaccions amb els visitants florals. En el segon capítol, identifiquem i analitzem, mitjançant HS-SPME-GC-MS, els COV florals emesos per dues espècies simpàtriques i asincròniques arbustives enfiladisses: *Clematis cirrhosa* L. i *C. flammula* L. Documentem els visitants florals, i provem el grau de dependència dels pol·linitzadors en l'èxit reproductiu de les plantes, en funció de les característiques florals (forma i disposició), la fenologia floral, l'aroma i l'època de floració de cadascuna. La floració d'aquestes espècies en períodes de més estrès per als pol·linitzadors, a causa de la baixa disponibilitat d'espècies florides, és fonamental per a la supervivència d'una part important de l'entomofauna pol·linitzadora.

En el tercer capítol, es va enfocar des del valor taxonòmic i filogenètic que representa la química de les plantes, així com l'ús recent dels COV als estudis taxonòmics. Es van identificar els COV florals de dues espècies del gènere *Rhamnus* (*Rh. alaternus* L. i *Rh. ludovici-salvatoris* Chodat.), així com de l'híbrid entre aquests tàxons (*Rh. Xbermejoi* Fraga & Rosselló). Els perfils volàtils obtinguts van presentar diferències quantitatives i qualitatives significatives, que van corroborar el seu valor quimiotaxonòmic com a caràcter discriminant entre tàxons molt propers.

Finalment, el quart capítol es van recollir i identificar els COV emesos per les flors senceres, mitjançant HS-SPME-GC-MS, de dues esparregueres sincròniques mediterrànies: *Asparagus acutifolius* L. i *A. albus* L. Per a aquestes espècies es van monitoritzar diferents poblacions naturals de les Illes Balears, i se'n va estudiar la fenologia floral, els seus pol·linitzadors i l'èxit reproductiu. A més, es va discutir el fenomen de la ginodioècia a *A. acutifolius*. L'evolució de les aromes i la diversificació dels COVs florals, entre espècies simpàtriques i sincròniques, s'entén com una important estratègia biològica per coexistir en un ecosistema en què la competència pels pol·linitzadors pot ser un factor clau per a l'èxit reproductiu.

Així, aquesta tesi aporta nous coneixements sobre diferents rols que exerceixen els COV d'una representació de plantes mediterrànies, així com la seva repercussió en les interaccions amb altres organismes i potencial aplicació a la quimiotaxonomia.

### **Paraules clau**

Compostos orgànics volàtils (COV); HS-SPME; Interacció planta - pol·linitzadors; Aroma floral, Espècies mediterrànies

## SUMMARY

Plants, as sessile organisms, have developed complex strategies that allow them to evolve and interact with biotic and abiotic environmental factors. In addition to floral display and providing nutritional rewards, plants synthesise and emit a wide range of volatile organic compounds (VOCs) that perform various physiological and ecological functions. The chemical attraction of pollinators, allelopathic phenomena or the synthesis of toxic substances as a defence mechanism against herbivores are some of VOCs' most distinguished ecological functions.

VOCs can be synthesised in different plant tissues by complex and diverse physiological processes. In addition, a large temporal and spatial variability of VOCs emission rates has been corroborated due to the complexity of internal (genetic and biochemical) and external (abiotic and biotic) factors that regulate them. These scent mixtures allow plants to provide detailed information about their physiological and phenological state (flower condition, herbivore attack, microbial infection, available floral reward, etc.), which can be processed by other organisms, both beneficial and detrimental, that interact directly or indirectly with them.

This thesis aims to contribute to the knowledge of the Balearic flora, from a biochemical perspective, by studying the volatile profiles, using different extraction and analysis techniques, of a group of Mediterranean species selected to consider and evaluate various ecological aspects.

The first chapter of the thesis contributes to the knowledge of the strategies developed by rupicolous species against invertebrate predators. *Clinopodium rouyanum* (Briq.) Govaerts is a species endemic to Mallorca (Balearic Islands), in danger of extinction (VU), which grows between 900-1400 m. For this species, the micromorphological characteristics of green parts were described by scanning electron microscopy, essential oils were identified by SDE distillation, and VOCs emitted from green parts, whole flowers, and isolated corollas by HS-SPME-GC-MS, as well as internal volatiles from corolla tubes by ST-TD-GC-MS. Finally, the deterrent effects of essential oils and VOCs emission against invertebrates were evaluated. From an ecological perspective, we conclude that the composition of essential oils and VOCs emitted by *C. rouyanum* are key to its defence against invertebrate herbivores, and knowledge of these could contribute to the conservation of this endangered species.

The variety of angiosperm floral forms and the diversity of floral scents have been described as evolutionary characteristics defining their interactions with floral visitors. In the second chapter, we identify and analyse, by HS-SPME-GC-MS, the floral VOCs emitted by two sympatric and asynchronous climbing shrub species: *Clematis cirrhosa* L. and *C. flammula* L. We documented floral visitors and tested the degree of pollinator dependence on the reproductive success of the plants as a function of floral characteristics (shape and arrangement), floral phenology, scent and flowering time of each. The flowering of these species during periods of increased stress for pollinators due to the low availability of flowering species is essential for the survival of an important part of the pollinating entomofauna.

The third chapter focused on plant chemistry's taxonomic and phylogenetic value and the recent use of VOC in taxonomic studies. Floral VOCs were identified for two species of the genus *Rhamnus* (*Rh. alaternus* L. and *Rh. ludovici-salvatoris* Chodat.) and for the hybrid between these taxa (*Rh. Xbermejoi* Fraga & Rosselló). The volatile profiles obtained showed significant quantitative and qualitative differences, which corroborated their chemotaxonomic value as a discriminant character between closely related taxa.

Finally, in the fourth chapter, VOCs emitted by whole flowers were captured and identified by HS-SPME-GC-MS from two Mediterranean synchronous asparagus species: *Asparagus acutifolius* L. and *A. albus* L. For these species, different natural populations of the Balearic Islands were monitored, and their floral phenology, pollinators and reproductive success were studied. In addition, the phenomenon of gynodioecy in *A. acutifolius* was discussed. Finally, the evolution of scent and diversification of floral VOCs between sympatric and synchronous species is an important biological strategy to coexist in an ecosystem where competition for pollinators may be a key factor for reproductive success.

Thus, the present thesis provides new knowledge on different roles played by VOCs in a representation of Mediterranean plants, as well as their impact on interactions with other organisms and their potential application in chemotaxonomy.

### **Keywords**

Volatile organic compounds (VOCs); HS-SPME; Plant-pollinator interaction; Floral scent; Mediterranean species.

# **INTRODUCCIÓN**

## LA DIVERSIDAD QUÍMICA DE LOS AROMAS FLORALES

Todas las plantas producen una gran diversidad de compuestos químicos. Parte de estos compuestos (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>), se sintetizan en las rutas del metabolismo primario, y son esenciales en el proceso de la fotosíntesis y de la respiración. Sin embargo, los compuestos orgánicos volátiles (COV) son metabolitos secundarios, emitidos por la gran mayoría de plantas, como consecuencia de su interacción con los factores bióticos y abióticos, y tienen importantes implicaciones ecológicas en la evolución de las plantas.

Es sabido que el genoma vegetal contiene entre 20.000 y 60.000 genes, de los cuales se estima que entre un 15 y un 25% están implicados en el metabolismo secundario (Pichersky & Gang, 2000). Estos compuestos lipofílicos, emitidos mayoritariamente por las flores, aunque también por las hojas, tallos, frutos y las raíces, se caracterizan por su bajo peso molecular (de 30 a 300 amu) y altas presiones de vapor para ser liberados a temperatura ambiente (Knudsen et al., 2006).

Se acumulan en estructuras secretoras características, como son los tricomas glandulares y los conductos resiníferos (Cagliero et al., 2021; Wu et al., 2021). Bajo condiciones de estrés abiótico: temperatura, intensidad de la luz, ozono (Loreto et al., 2006, Holopainen & Gershenzon, 2010), características hídricas (Vallat et al., 2005) y salinas del suelo (Loreto & Delfine, 2000) y/o de estrés biótico: herbivoría (Dicke et al., 2020), infección de patógenos (Cardoza et al., 2002), alelopatías (Xie et al., 2021), etc., las plantas pueden regular la concentración de metabolitos secundarios en sus tejidos, incluidos los COV, o liberar espontáneamente estos COV como mecanismos de respuesta. Estas respuestas al estrés, están moduladas principalmente por la activación de tres vías de señalización, reguladas por las hormonas ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno (Bari & Jones, 2009).

Cada planta es capaz de sintetizar de forma diferencial, tanto espacialmente como temporalmente, a lo largo de su ciclo de vida, una mezcla de volátiles única, en diferentes tejidos y a partir de rutas metabólicas complejas y diversas (Pichersky et al., 2006). Además, es razonable que estos COVs se encuentren bajo una fuerte presión de selección y se vean moldeados por las interacciones ambientales de cada taxón (Dicke & Baldwin, 2010). Algunos compuestos, como el limoneno o benzaldehído, son comunes en las emisiones de muchas especies (Knudsen et al., 2006), mientras que otros compuestos, como el 8-metil-2-propil-1,7-dioxaspiro [5.5] undecano y la N-(3-metilbutil) acetamida solo se han documentado para una única especie (Heiduk et al., 2015).

En el trabajo de Knudsen et al. (2006), se recogen datos de más de 1.700 COV, tanto de gimnospermas como angiospermas, incluyendo un total de 90 familias y 38 órdenes (990 taxones). El 78% de los taxones, pertenece a 19 familias de plantas: Orchidaceae (417), Araceae (55), Arecaceae (40), Magnoliaceae (26), Rosaceae (24), Cactaceae (21), Rutaceae (21), Solanaceae (21), Caryophyllaceae (20), Nyctaginaceae (20), Fabaceae (18), Amaryllidaceae (17), Moraceae (15), Ranunculaceae (14), Asteraceae (13), Lecythidaceae (13), Oleaceae (13), Apiaceae (11) y Rubiaceae (10). Estos COV, pertenecen mayoritariamente a los grupos: terpenoides (isoprenoides), bencenoides/ fenilpropanoides, derivados de los ácidos grasos y derivados de los aminoácidos (Dudareva et al., 2004). Son menos habituales los COV que contienen nitrógeno y azufre, los diterpenos y los terpenos irregulares (Knudsen et al., 2006). El isopreno, los monoterpenos, los sesquiterpenos y otros terpenos irregulares, pertenecientes a la gran familia de compuestos isoprenoides o terpenoides, constituyen el grupo predominante de



compuestos volátiles (>30.000 compuestos) emitidos por las plantas (Owen & Peñuelas, 2005). La mayoría de los isoprenoides (ácido abscísico, ácidos giberélicos, esteroides, carotenoides), son esenciales para el desarrollo de las especies vegetales, y desempeñan funciones bioquímicas y fisiológicas importantes (Laule et al., 2003). Sin embargo, el isopreno, los monoterpenos y los sesquiterpenos, son COV y semivolátiles, que representan una pequeña parte del gran grupo de los isoprenoides. Además, al no ser emitidos por todas las especies vegetales, no significan un rol fundamental y universal en el proceso evolutivo de las plantas (Owen & Peñuelas, 2005).

Finalmente, la extracción y el uso de los aceites esenciales, extraídos de plantas aromáticas, ha sido bien documentada desde los antiguos egipcios (4.500 a.C.) y en la medicina tradicional oriental (3000 y 2000 a.C.) (Baser & Buchbauer, 2010). Durante las últimas décadas, se ha intensificado el estudio de la composición química y actividad biológica de los aceites esenciales vegetales, y se han descrito propiedades antimicrobianas (Camele et al., 2010), antifúngicas (Mancini et al., 2014), disuasorias de herbívoros gasterópodos (Radwan & Gad, 2021), además de muchas otras propiedades farmacológicas y medicinales (Abobakr et al., 2022). La composición química de los aceites esenciales vegetales está constituida principalmente por hidrocarburos mono y sesquiterpénicos y sus derivados oxigenados, junto con otros aldehídos alifáticos, alcoholes y ésteres (Baser & Buchbauer, 2010).

## FUNCIONALIDADES DE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS

El aroma floral es una compleja mezcla de compuestos volátiles producidos por los tejidos florales que tiene una gran diversidad de funciones ecológicas, relevantes en el entorno abiótico y biótico de las plantas (Dudareva et al., 2006; Kegge & Pierik, 2010) (Tabla 1). Además, los COV también constituyen una fuente infraexplotada de compuestos bioactivos útiles para el ser humano: usos medicinales (aromaterapia, remedios tradicionales, etc.), alimenticios (aromatizantes, sabores artificiales, etc.), agrícolas (pesticidas, fungicidas, etc.), farmacéuticos y cosméticos (perfumes, cremas, etc.).

Estos analitos desempeñan un rol fundamental en las interacciones directas e indirectas, planta-polinizador, planta-herbívoro/patógeno, planta-planta, así como en interacciones con otros microorganismos. Entre todas las funciones de los COV relacionados con los agentes biológicos, destacan las interacciones entre las plantas y sus polinizadores, fundamentales para el éxito reproductivo y el mantenimiento de la biodiversidad. Los aromas, potencian el atractivo de las flores, participan en la localización de las flores, modulan la frecuencia y duración de las visitas (Kessler et al., 2008; Majetic et al., 2009), proporcionan información sobre el estado fisiológico y fenológico de las flores (Goodrich & Raguso, 2009), así como la calidad de las recompensas florales (Wright & Schiestl, 2009).

**Tabla 1.** Principales funciones ecológicas y fisiológicas descritas, de los COV vegetales.

<b>Funciones</b>	<b>Referencias</b>
Atracción de polinizadores	Dobson, 2006; Kessler et al., 2008
Actividad antifúngica o antimicrobiana	Hammer et al., 2003; Huang et al., 2012
Atracción de depredadores y parasitoides contra herbívoros	Dicke & Baldwin, 2010; Junker et al., 2011
Disuasión de herbívoros	Kessler et al., 2011
Alelopatías	Glinwood et al., 2011; Gagliano & Renton, 2013.
Interacción con microorganismos beneficiosos	Heil 2014; Kessler, 2015
Tolerancia estrés abiótico	Dudareva et al., 2006; Holopainen & Gershenzon, 2010
Comunicación intraespecífica	Baldwin et al., 2006
Señalización a nivel intraespecífico (entre diferentes órganos de una misma planta)	Heil & Silva Bueno, 2007
Dispersión de semillas	Dudareva et al., 2013
Caracterización del sabor de frutas y hortalizas	Baldwin et al., 2008
Estabilización y protección de las membranas vegetales contra las altas temperaturas	Peñuelas & Llusà, 2002
Retroalimentación positiva sobre la formación de ozono (O <sub>3</sub> ) troposférico	Llusia et al., 2022
Valor taxonómico	Feulner et al., 2011; Jaeger et al., 2016

Estas mezclas se componen principalmente de compuestos terpenoides y bencenoides (Knudsen et al., 2006), y cada mezcla de COV específica para cada especie, está compuesta por varios compuestos comunes (Okamoto & Su, 2021), que actúan como atrayentes generalistas de una amplia gama de polinizadores, mientras que otros actúan como atrayentes específicos, para una o unas pocas especies de polinizadores, y suelen contener COV inusuales, estableciendo unos “canales privados” de comunicación (Raguso 2008b; Schiestl & Glaser, 2012). Por ejemplo, las flores polinizadas por murciélagos suelen contener azufre (Knudsen & Tollsten 1995). Por otra parte, las especies polinizadas por pájaros, suelen estar poco perfumadas (Knudsen et al. 2004)

Estas señales olfativas, suelen complementarse con otros rasgos y estímulos visuales (pigmentación, morfología, disposición de las flores, etc.) y/o de recompensa para los polinizadores (Wright & Schiestl, 2009). La composición del aroma floral puede variar de manera significativa a nivel intraespecífico e interespecífico y a pesar de estar genéticamente definida, la mezcla de COV evoluciona bajo la presión de selección de sus polinizadores y florívoros, al igual que ocurre con otros rasgos florales (Raguso, 2008b).

Además de atraer a los polinizadores, los olores florales pueden atraer a otros agentes antagonistas. Estos insectos, se benefician de los aromas florales para localizar a las plantas huéspedes, donde se alimentan, ovipositan, o bien ocupan sus flores como lugares de caza. La consecuencia para las plantas, es el robo de las recompensas (néctar y polen), para sus potenciales polinizadores, sin que resulte la polinización, la destrucción de órganos florales, la disminución de las tasas de visita de los polinizadores y en general, el empobrecimiento del éxito reproductivo (McCall & Irwin, 2006; Bruinsma et al., 2014). Así, las plantas con flores, suelen emplear mecanismos de defensa morfológicos (p.ej., tricomas o espinas) y/o químicos para protegerse de los antagonistas florales. Los COV, especialmente los terpenoides, desarrollan funciones defensivas directas (p. ej., acumulación de terpenoides en glándulas secretoras) e indirectas (p. ej., atracción de enemigos naturales de los herbívoros atacantes), cuando son atacadas por herbívoros o infectadas por patógenos fúngicos y bacterianos (Cheng et al., 2007; Dicke et al., 2020).

En la comunicación planta-planta, mediadas por los COV, existen interacciones intrapalantares (en una misma planta), intraespecíficas (entre individuos de la misma especie) e interespecíficas (individuos de diferentes especies). (Oriens, 2005). Es sabido, que algunos monoterpenos, pueden proporcionar información sobre los competidores vecinos (Kegge & Pierik, 2010; Pierik & De Wit, 2014), y/o actuar como aleloquímicos, inhibiendo la germinación de semillas o el crecimiento de sus competidores (Owen & Peñuelas, 2005). Este canal de comunicación entre plantas puede darse a través de los COV en el aire (Karban et al., 2010), a través de compuestos solubles que se intercambian a nivel de la rizosfera (Johnson & Gilbert, 2015) y ocasionalmente, a través del sonido (Gagliano, 2013).

En esta tesis doctoral, se investiga el papel que juegan los COV vegetales desde una perspectiva ecológica, en funciones defensivas, en las interacciones planta-polinizador y su uso como caracteres taxonómicos, para discriminar entre especies filogenéticamente cercanas. En el trabajo de *Clinopodium rouyanum* (Lamiácea), nuestra hipótesis se basa en que la mezcla de compuestos volátiles de una lamiácea rupícola y endémica de Mallorca (Islas Baleares), tiene un valor ecológico relacionado con la defensa química de esta especie, y pretendemos dar valor a estos compuestos, como estrategia de conservación de esta planta amenazada. Por otra parte, utilizamos el trabajo de Ferriol et al. (2009), como punto de partida, para pretender demostrar que los COV florales, podrían servir como potenciales caracteres quimiotaxonómicos, para diferenciar los híbridos entre *Rhamnus alaternus* y *Rh. ludovici-salvatoris*, en las poblaciones naturales donde coexisten ambas especies, y en las que se tiene constancia de que hibridan (Llorens, 1979). Finalmente, para estudiar la interacción planta-polinizador, mediada por los COV florales, seleccionamos dos géneros diferentes (*Asparagus* y *Clematis*), de amplia distribución y que, al florecer en los meses de mayor estrés alimentario, para la entomofauna, los aromas florales, podrían tener mayor importancia ecológica en este tipo de interacciones mutualistas.

Así, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, contribuyen el conocimiento del aroma floral, para un grupo de especies de distribución mediterránea y desde diferentes enfoques ecológicos, aplicando diferentes técnicas de muestreo, extracción y análisis de los COV vegetales. Integrar la ecología química de las plantas es clave para la interpretación de las interacciones complejas entre las plantas y su entorno biótico y abiótico (Raguso, 2008a).

## OBJETIVOS

Este trabajo pretende contribuir al conocimiento de los compuestos orgánicos volátiles que emiten las plantas y sus funciones ecológicas. Así el objetivo general de la tesis es:

**Caracterizar los compuestos orgánicos volátiles (COV), de una selección de plantas autóctonas mediterráneas, y evaluar los diferentes roles ecológicos que representan dichos compuestos, para cada una de estas especies.**

A continuación, se desglosan los objetivos específicos dispuestos por capítulos:

### Capítulo 1.

1. Obtener conocimientos adicionales para la conservación de especies rupícolas endémicas de las Islas Baleares.
2. Estudiar los mecanismos químicos de defensa frente a la depredación por herbívoros invertebrados.
3. Conocer los tipos y la distribución de los tricomas glandulares en *Clinopodium rouyanum*.

### Capítulo 2.

1. Determinar los perfiles químicos de dos especies asincrónicas del género *Clematis*.
2. Evaluar la relación entre el tipo de polinizadores y características de las flores (morfología, disposición floral, néctar, etc.) según la época del año.

### Capítulo 3.

1. Demostrar que los compuestos orgánicos volátiles tienen implicaciones taxonómicas y pueden discriminar especies estrechamente relacionadas.
2. Identificar los compuestos orgánicos volátiles de *Rhamnus alaternus*, *Rhamnus ludovicisalvatoris* y el híbrido entre estas dos especies.

### Capítulo 4.

1. Evaluar la competencia interespecífica por los polinizadores de dos especies autumnales simpátricas del género *Asparagus*.
2. Identificar los compuestos orgánicos volátiles principales para estas especies.

## **METODOLOGÍA**

## DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS FLORALES

Pocos estudios han intentado explorar los límites de la capacidad sensorial de la nariz del ser humano. El trabajo de Bushdid et al. (2014) demostró empíricamente que la nariz humana puede distinguir al menos un billón de estímulos olfativos. Si bien es cierto, que el humano puede detectar estas moléculas en el aire, su capacidad para discriminar, de forma clara y objetiva, mezclas de olores complejas con un número variable de componentes compartidos, es limitada y confusa. A partir de los recientes avances metodológicos e instrumentales para capturar, separar e identificar los compuestos volátiles aromáticos, la investigación en el ámbito de los aromas florales y sus funcionalidades, ha incrementado significativamente.

### TÉCNICAS DE MUESTREO Y EXTRACCIÓN

La investigación de estrategias analíticas adecuadas para investigar el perfil volátil de las plantas es esencial para la correcta caracterización de su metabolismo y su relación con un ecosistema. Las principales técnicas utilizadas para los análisis de los compuestos orgánicos volátiles (COV), incluyen el espacio de cabeza dinámico (D-HS), el espacio de cabeza estático (S-HS) y, recientemente, los métodos de contacto directo (DC) en asociación con la cromatografía de gases (GC) y la espectrometría de masas (MS).

En la presente tesis se han utilizado los métodos extractivos de: espacio de cabeza estático - microextracción en fase sólida (S-HS-SPME) y espacio de cabeza dinámico - desorción térmica directa (D-HS-TD), para la extracción de los aromas florales, y la hidrodestilación como método destilativo para la extracción de los aceites esenciales, mediante la técnica de extracción por destilación simultánea (SDE). (Figura 1).

#### 1.- Microextracción en fase sólida (SPME)

La microextracción en fase sólida (SPME), se desarrolló con el objetivo de agilizar la toma de muestras tanto en condiciones de laboratorio como de campo, debido a su facilidad de manejo, durabilidad y capacidad de proporcionar resultados repetibles (Pawliszyn, 1997; Pasquini et al., 2021). Esta técnica, no requiere disolventes y se utiliza ampliamente para la recolección de muestras biológicas, toxicológicas, ambientales y forenses.

La extracción mediante SPME se basa en un proceso de adsorción-desorción, en el que los compuestos orgánicos de una muestra son retenidos por una fibra inerte recubierta de un material adsorbente, como sistema de preconcentración. La SPME puede utilizarse para el muestreo, tanto en receptáculos de muestreo estáticos (S-HS) como dinámicos (D-HS). Las fibras SPME también pueden exponerse directamente al aire libre, para monitorizar y cuantificar contaminantes orgánicos volátiles en el medio ambiente urbano mediante muestreo estático (Cagliero et al., 2021).

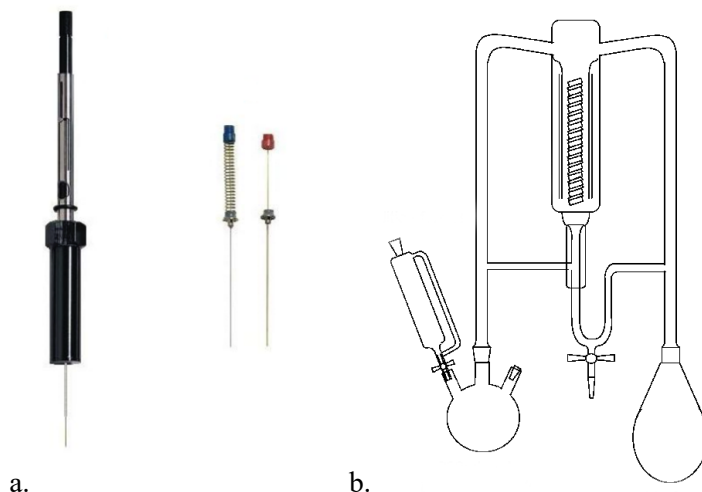


Figura 1. Dispositivo SPME con el detalle de las fibras. Aparato de Likens-Nickerson para la extracción por SDE (Simultaneous Distillation Extraction).

Para el desarrollo de esta tesis, se ha utilizado el adsorbente depolidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB; espesor de la película 100  $\mu\text{m}$ ; Supelco Inc. Bellefonte, PA, USA). Esta fibra está alojada en una aguja protectora de acero inoxidable acoblada a un pistón del mismo material, y fijada a un soporte en forma de jeringa, comercializado por la casa comercial Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA) que permite atravesar el septum del recipiente colector y/o del cromatógrafo de gases y extender la fibra fuera de la aguja, empujando el émbolo y exponiendo la fibra a los volátiles de la muestra, durante un período de tiempo y temperatura definidos.

En esta primera etapa, la fibra se expone a una muestra sellada en un recipiente, donde se concentran los COV y se separan los analitos de la matriz de la muestra hacia la fibra (fase estacionaria), hasta que se alcanza un equilibrio (Pawliszyn, 2000). Durante la segunda etapa, después de un tiempo predefinido, se retira la fibra y se inserta directamente en un cromatógrafo de gases (GC) para la desorción de los analitos por desorción térmica o desorción por adición de un disolvente orgánico, según la técnica que se vaya a utilizar y su propósito.

## 2.- Extracción por desorción térmica (TD) directa

La desorción térmica (TD), se originó a medianos de la década de los 1970 como una adaptación y mejora al procedimiento de inyección para GC (Woolfenden, 2012). Este método de extracción se aplica en procedimientos de vigilancia ambiental al aire libre, emisión de volátiles contaminantes, sistemas biológicos (interacción entre organismos), defensa y seguridad contra agentes químicos, seguridad sanitaria, etc.

En el caso de que la concentración de analitos sea muy baja, se requiere un aislamiento y un enriquecimiento de los COV de la muestra. La técnica de espacio de cabeza dinámico de la TD, no requiere alcanzar el equilibrio en un recipiente sellado, sino que consiste en arrastrar los COV de la cámara donde se halla la muestra, a una temperatura controlada, y mediante un gas inerte a un flujo constante, y pasarlos a través de una trampa donde quedan retenidos en un material adsorbente.

Así, y a diferencia del método HS-SPME, los COV quedan retenidos en un material adsorbente que va insertado en un tubo de vidrio o metal. La selección del tipo de adsorbente como la cantidad de material adsorbente se define según las propiedades químicas de la muestra, volumen, caudal de recogida y adsorción de la matriz. Además, en un mismo tubo, se puede incorporar una mezcla de materiales adsorbentes, aumentando la gama de COV que podrán ser capturados (Dam et al. 2010).

Para el muestreo de COV florales, los adsorbentes más utilizados son: el carbón activo, el Poropak Q® y la versión Super Q® (malla de 80 a 100; Alltech Associates; Supelco, Taufkirchen, Alemania), el Tenax GC® y su versión mejorada Tenax TA® (malla de 60 a 80; Alltech Associates). Este último adsorbente, se ha utilizado en la tesis para capturar los compuestos emitidos por los pequeños órganos florales (cáliz y corola) de *C. rouyanum*, siguiendo el procedimiento de Kallenbach et al. (2014).

### 3.- Extracción por destilación simultánea (SDE)

El método de extracción de los aceites esenciales, por destilación simultánea (SDE) o método de extracción de Likens & Nickerson (1964), consiste en que la muestra diluida en agua y el disolvente orgánico (en esta tesis, el diclorometano), realizan la destilación por separado y condensan en un mismo punto, donde se produce la extracción y separación de los compuestos, y posteriormente se recirculan las dos fases, repitiendo el mismo proceso. Este método es ampliamente utilizado en la obtención de COV de muestras naturales, ya que permite concentrar los COV hasta valores muy elevados en poco tiempo en una sola operación, y que requiere poca cantidad de disolvente, lo que minimiza la contaminación de la muestra por el propio disolvente. No se adecua a la extracción de COV termolábiles (Mateos, 1990). El análisis de los extractos de SDE se realiza mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).

## SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES

Los COV se analizan por diferentes métodos, siendo la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) el más utilizado y el más eficaz en los estudios de olores florales (Knudsen et al., 2006). La cromatografía de gases (GC) es una técnica de separación muy versátil, que permite la separación y determinación de los diferentes componentes de una mezcla compleja de sustancias volátiles (líquida, gaseosa o sólida previa disolución).

Estos compuestos, previamente capturados y concentrados en una matriz adsorbente, son separados en una columna capilar de GC y detectados mediante un detector de ionización de llama (FID) o por un espectrómetro de masas (MS). En ambos casos, se obtiene un cromatograma como resultado. Mediante estos equipos, se analizan, por ejemplo: aromas de bebidas alcohólicas, ácidos grasos volátiles, gases procedentes de fermentaciones, entre otras aplicaciones industriales, así como para el análisis de muestras vegetales de diferentes tejidos.

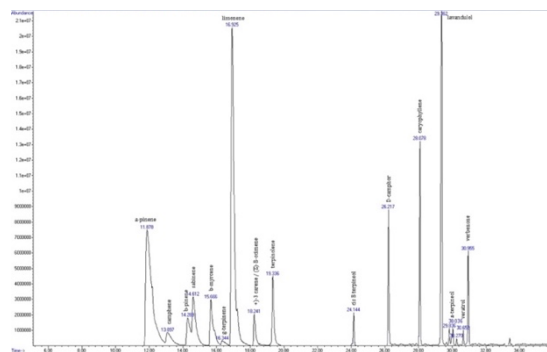
La GC, durante su fase móvil, utiliza un gas portador inerte (He, N o H), previamente calentado, que entra en el equipo a través del inyector de forma continua, hasta que realiza el recorrido por todo el equipo y se estabiliza. Una vez estabilizado el gas portador, se inyecta la muestra en el interior de la cámara del inyector, mediante un inyector manual (micro jeringuilla) o automatizado. Una vez inyectada la muestra, esta es volatilizada instantáneamente y mezclada



con el gas portador, para ser arrastrada hacia la columna capilar, que contiene la fase estacionaria. Una vez que la muestra llega a la columna, se inicia el proceso de separación de las partículas en función de la polaridad de cada una de ellas (distintas velocidades de desplazamiento), adhiriéndose a la columna cromatográfica. Los componentes que quedan retenidos con mayor fuerza por la fase estacionaria se desplazan más lentamente con el flujo de fase móvil, mientras que los que se retienen más débilmente prosperan con mayor rapidez. Conforme van atravesando el detector, cada uno de los componentes expresa una señal que se va registrando en el cromatograma. En función de la fase estacionaria, se han desarrollado bases de datos de índices de retención de cientos de COV, para facilitar su caracterización e identificación, entre los que destaca, el sistema de Índices de Kovats (KI).

La detección se realiza mediante FID o por ionización de llama, a pesar de ser ampliamente utilizada, solo proporciona información sobre los tiempos de retención y se utiliza principalmente para el análisis cualitativo de compuestos. El tiempo de retención es un parámetro característico de cada componente, siempre que sea para un sistema cromatográfico determinado (utilizando la misma columna), y que se utilicen unos patrones de referencia preinstalados, en las mismas condiciones cromatográficas, para su correcta detección e identificación en una muestra.

La MS es un método altamente sensible, que permite realizar análisis cualitativos y cuantitativos. Este último análisis se basa en la comparación del área o altura de pico de cada componente, con los estándares de una sustancia de concentración conocida. El método se basa en la ionización (por impacto de electrones o por ionización química) de la muestra en iones gaseosos y posteriormente identificación de los iones por su relación masa-carga y abundancia relativa. Tras la detección de los iones, se obtiene un cromatograma de iones totales que proporciona información sobre los tiempos de retención de cada compuesto, así como su espectro de masas, constituyendo un patrón de fragmentación de iones característico, acorde con su naturaleza química y la energía interna que poseen (Figura 2). Este patrón puede ser comparado, mediante un algoritmo, con otros espectros registrados en diferentes bases de datos o bibliotecas espectrales comerciales (por ejemplo: NIST MS Data base o WILEY Online Library), obteniendo las coincidencias más probables para su identificación. Cuando la comparación de sus tiempos de retención y espectros de masas no son suficientes para descifrar e identificar con elevado grado de confianza las estructuras moleculares, ya que las bases de datos pueden no contener todos los compuestos/sustancias-patrón certificadas, que eventualmente pueden hallarse en una mezcla compleja, se recurre a la comparación de patrones y bases de datos propias o al análisis “manual” y específico de los patrones de fragmentación e iones-fragmento típicos, como base experimental para la elucidación de sus estructuras moleculares (Stashenko & Martínez, 2010).



## CAPÍTULO 1



**Biogenic volatiles of rupicolous plants act as direct defences against molluscs: The case of the endangered *Clinopodium rouyanum***

**Biogenic volatiles of rupicolous plants act as direct defenses against molluscs: The case of the endangered *Clinopodium rouyanum***

**Tomàs J.<sup>a</sup>, Gil L.<sup>a</sup>, Llorens-Molina J.A.<sup>b</sup>, Cardona C.<sup>a</sup>, García M.T.<sup>c</sup>, Llorens L.<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> *Department of Biology (Botany), University of the Balearic Islands (UIB), Palma de Mallorca, Spain*

<sup>b</sup> *Mediterranean Agroforestry Institute, Universitat Politècnica de València (UPV), València, Spain*

<sup>c</sup> *Scientific & Technical Services, University of the Balearic Islands (UIB), Palma de Mallorca, Spain*

Corresponding author: Leonardo Llorens. E-mail: [lleonard.llorens@uib.es](mailto:lleonard.llorens@uib.es)

ORCID ID 0000-0002- 9264-8394

*Flora* 258: 151428, 2019.

DOI: [10.1016/j.flora.2019.151428](https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.151428)

## CAPÍTULO 2



**Floral traits and reproductive biology of two Mediterranean species of *Clematis*, asynchronous and sympatric, are key food sources for pollination survival**

## **Floral traits and reproductive biology of two Mediterranean species of Clematis, asynchronous and sympatric, are key food sources for pollinator survival**

**Juan Tomàs<sup>a</sup>, Carles Cardona<sup>b</sup>, Pere Ferriol<sup>b</sup>, Leonardo Llorens<sup>b</sup> \*, Lorenzo Gil<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> *Department of Biology (Botany). University of the Balearic Islands (UIB). Carretera de Valldemossa Km. 7,5. E-07122 Palma de Mallorca. joantomas1@gmail.com*

<sup>b</sup> *Interdisciplinary Ecology Group, Department of Biology, University of the Balearic Islands (UIB), Car. de Valldemossa Km. 7,5. E-07122 Palma, Balearic Islands, Spain. pere.ferriol@uib.es; lorenzo.gil@uib.es; aigolob@hotmail.com*

Corresponding author: Leonardo Llorens. E-mail: lleonard.llorens@uib.es

ORCID ID 0000-0002- 9264-8394

*South African Journal of Botany* 151:85-94, 2022

DOI: 10.1016/j.sajb.2022.09.027

## CAPÍTULO 3



**Can floral volatile organic compounds contribute to the taxonomy of the genus *Rhamnus* sect. *Alaternus*?**

*-The original article submitted in the present thesis has subsequently been published with some modifications-*

**Can floral volatile organic compounds contribute to the taxonomy of the genus *Rhamnus* sect. *Alaternus*?**

Leonardo Llorens<sup>1</sup>, Pere Ferriol<sup>1</sup>, Joan Tomàs<sup>2</sup>, Maria Trinidad García<sup>3</sup>, Lorenzo Gil<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Interdisciplinary Ecology Group, Department of Biology, University of the Balearic Islands (UIB), Ctra. Palma-Valldemossa Km. 7,5. E-07122 Palma, Balearic Islands Spain.*

<sup>2</sup> *Department of Biology (Botany). University of the Balearic Islands (UIB). Ctra. Palma-Valldemossa Km. 7,5. E-07122 Palma, Balearic Islands, Spain.*

<sup>3</sup> *Scientific and Technical Services. University of the Balearic Islands (UIB). Ctra. Palma- Valldemossa Km. 7,5. E-07122 Palma, Balearic Islands, Spain.*

Corresponding author: Leonardo Llorens. E-mail: lleonard.llorens@uib.es

ORCID ID 0000-0002- 9264-8394

*Italian Botanist* 16:149-164 (2023)

DOI: 10.3897/italianbotanist.16.116255

## CAPÍTULO 4



### **Floral scent, flowering phenology, and pollinators of two autumnal synchronic and sympatric Mediterranean *Asparagus***



*-The original article submitted in the present thesis has subsequently been published with some modifications-*

## **Floral Aroma and Pollinator Relationships in Two Sympatric Late-Late-Summer-Flowering Mediterranean Asparagus Species**

Leonardo Llorens<sup>1</sup>, Joan Tomàs<sup>2</sup>, Pere Ferriol<sup>1</sup>, Maria Trinidad García<sup>3</sup>, Lorenzo Gil<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Interdisciplinary Ecology Group, Department of Biology, University of the Balearic Islands (UIB), Ctra. Palma-Valldemossa Km. 7,5. E-07122 Palma, Balearic Islands Spain.*

<sup>2</sup> *Department of Biology (Botany). University of the Balearic Islands (UIB). Ctra. Palma-Valldemossa Km. 7,5. E-07122 Palma, Balearic Islands, Spain.*

<sup>3</sup> *Scientific and Technical Services. University of the Balearic Islands (UIB). Ctra. Palma- Valldemossa Km. 7,5. E-07122 Palma, Balearic Islands, Spain.*

Corresponding author: Leonardo Llorens. E-mail: lleonard.llorens@uib.es

ORCID ID 0000-0002- 9264-8394

*Plants* 12(18), 3219 (2023)

Doi.org/10.3390/plants12183219



## **DISCUSIÓN GENERAL**

La presente tesis aporta nuevos conocimientos descriptivos y empíricos, sobre las múltiples respuestas ecológicas, mediadas por los COV, que desempeñan una selección de plantas autóctonas mediterráneas, como mecanismos de comunicación, de adaptación y evolución con el entorno biótico y abiótico que las rodea. A medida que ha aumentado el conocimiento sobre estas interacciones ecológicas, debido al mayor interés por parte de la comunidad científica, y paralelamente el desarrollo de nuevas herramientas de captura y análisis de estos metabolitos, la complejidad de estos canales de comunicación entre organismos, han resultan cada vez más complejos. Asimismo, queda mucho por aclarar sobre los factores internos y externos que intervienen en la biosíntesis de estos COV y cómo son utilizados por las plantas (Pichersky et al 2006).

El estudio de los aceites esenciales y COV vegetales, ha sido ampliamente abordado con especies de distribución mediterránea, desde diferentes perspectivas ecológicas y mediante la aplicación de diferentes métodos de extracción y análisis (Caissard et al., 2004; Ormeño et al., 2007; Pasquini et al., 2021). Sin embargo, este campo de estudio, presenta menor representación a nivel de las Islas Baleares. Sanz et al. (2000) analizaron los COV de tres taxones del complejo *Teucrium marum* L., y encontraron diferencias cuantitativas y cualitativas inter e intraespecíficas, señalando los COV como caracteres de diferenciación microgeográfica. En otro trabajo, se comparó la composición de los aceites esenciales de distintas poblaciones relictuales y fragmentadas de *Thymus richardii* Pers., y discutieron las variaciones geográficas y fenotípicas de los quimiotipos diferenciados (Llorens et al., 2014). En la tesis de Pizà (2017), se discutieron las repercusiones ecológicas de los COV para un grupo de especies dunares, y se estudió la actividad alelopática de sus aceites esenciales. Recientemente, se han estudiado los COV florales de la especie endémica de las Islas Baleares *Aristolochia bianorii*, y se ha explicado la interacción del aroma floral con sus polinizadores (Alpuente et al., 2022).

En un contexto de relaciones entre química vegetal, defensa contra herbívoros y conservación de especies, los resultados obtenidos del estudio *C. rouyanum* (capítulo I), denotan las implicaciones ecológicas que pueden tener los compuestos volátiles en especies endémicas, cuyos hábitats naturales son reducidos. La actividad antimicrobiana, antifúngica y antioxidante para este género de plantas aromáticas, ha sido descrita por varios autores (Conforti et al., 2012; Dobravalskyté et al., 2012; Cavar et al., 2013), en nuestro trabajo, describimos por primera vez la función defensiva que ejercen los COV, contra herbívoros gasterópodos para este género. Tanto la pulegona como el mentol, componentes principales en *C. rouyanum*, han sido identificados en otros taxones de la familia de las lamiáceas por lo que debería contrastarse esta actividad disuasoria, en otras especies, ricas en monoterpenos oxigenados.

La composición del aroma floral varía tanto cuantitativa como cualitativamente en muchos niveles diferentes de organización y, al igual que ocurre con otros rasgos florales, estas mezclas de volátiles, estén sujetas a selección mediada por los polinizadores (Whitehead & Peakall, 2009), aunque, a diferencia de otros rasgos, estas mezclas, pueden cambiar y adaptarse rápidamente a las condiciones cambiantes del entorno. Diversos estudios han informado de variaciones en los patrones de emisión bajo condiciones de estrés por sequía y calor (Akula & Ravishankar, 2011; Farré-Armengol et al., 2013) y calor (Tattini & Loreto, 2014). A pesar de que las mezclas de COV pueden contener decenas de componentes, tan solo uno o unos pocos volátiles, provocan una respuesta y suelen tener un rol relevante a nivel ecológico (Junker, 2016), como, por ejemplo, en la atracción de polinizadores (Schäffler et al., 2015) o en la repelencia de un antagonista (Junker et al., 2011). El aprendizaje por parte de los polinizadores para asociar estos compuestos volátiles

florales con el alimento, ha sido clave en el proceso evolutivo de las angiospermas (Wright & Schiestl, 2009). Son mayoritarias las plantas que atraen a sus polinizadores por el olor que emiten las flores, sin embargo, algunas especies, como *Chamaerops humilis* L., utilizan otros órganos vegetales como emisores de COV atrayentes (Dufay, et al., 2003). Se ha demostrado que tanto la composición de las mezclas, como las tasas de emisión, se regulan siguiendo los patrones de actividad de los polinizadores (Dötter et al., 2005; Friberg et al., 2014; Jürgens et al. 2014). Esta interacción específica entre planta-polinizador, es un indicativo claro de que los atrayentes químicos son claves en la coevolución (Thompson et al., 2013; Friberg et al., 2014).

La variación de los COV florales, ocurre tanto a nivel intraespecífico como interespecífico. A nivel intraespecífico, por ejemplo, Zhang et al. (2020), encontraron diferencias entre las composiciones volátiles entre cultivares de flores blancas y de flores rosas en *Prunus mume* Siebold & Zucc. Además, se han descrito diferentes cambios ontogénicos en la composición volátil (Quintero et al., 2013; Çirak et al., 2022), y variaciones diurnas/nocturnas de las emisiones (Friberg et al., 2013), así como corroboran los resultados obtenidos para *A. albus* (capítulo IV). Por otra parte, el estudio de la composición de COV florales del grupo mediterráneo *Hippocrepis balearica*, describe dos quimiotipos muy diferenciados, para un mismo taxón (*H. balearica* Jacq subsp. *balearica*) (Tomàs et al., 2019), de los cuales, todavía no se conocen las implicaciones ecológicas y evolutivas que puedan tener estos quimiotipos, aunque alertan de la importancia de conocer estos quimiotipos de cara a su conservación.

A nivel interespecífico, la mayoría de taxones, dentro unos límites que podrían estar definidos geográficamente y/o fenológicamente, producen su propia mezcla de COV característica de cada taxón. Sin embargo, hay pocos estudios que demuestran que, entre especies de un mismo género, estas manifiesten perfiles volátiles muy similares, como ocurre con *Salix caprea* L. y *Salix cinerea* L. (Tollsten & Knudsen, 1992), o *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. Y *T. tartonraira* (L.) All. Subsp. *valentina* (Pau) O. Bolòs & Vigo, en la isla de Mallorca (Manuscrito en preparación).

A nivel de comunidad, la coexistencia entre especies que comparten el mismo hábitat se consigue mediante un equilibrio entre la capacidad de tolerar condiciones menos favorables y la capacidad de competir en el ecosistema (McGill et al. 2006). Integrar la ecología de los COV vegetales en la dinámica de un ecosistema, supone considerar cada mezcla de COV que es emitida individualmente y particularmente por cada taxón de la comunidad (Knudsen et al., 2006), al conjunto de olores totales que se emiten en una misma comunidad. Es probable que, la contribución química (aromas) que aporta cada taxón a una comunidad, conlleve costes energéticos y ecológicos, ya que pueden influenciar las interacciones mutualistas (p. ej., alterar el éxito reproductivo) y atraer antagonistas (p. ej., herbívoros o ladrones de néctar y polen) (Moeller 2004; Wright & Schiestl, 2009; Pellegrino et al. 2016). Los estudios sobre ecología química a nivel de comunidades, todavía son escasos, debido a la complejidad técnica y multidisciplinar que conllevan. Se ha demostrado que las especies de una comunidad que florecieron antes, presentaban un aroma más intenso que las especies que lo hicieron más tarde, y además sugiere que las especies que compiten por los mismos polinizadores, cuando coinciden muchas especies en flor, requieren invertir más recursos florales, que en situaciones de menor competencia (Filella et al., 2013). Hemos corroborado esta premisa, entre especies simpátricas, sincrónicas y que comparten características morfológicas similares, como ocurre en *A. acutifolius* y *A. albus* (capítulo IV), que diversifican sus aromas florales, como estrategia eficiente para coexistir entre ellas, y con otras especies que potencialmente pueden atraer a los mismos polinizadores (Huber et al., 2005), complementariamente a otras adaptaciones fenológicas. En *A. albus* la floración

parece estar regulada por el fotoperíodo y suele florecer antes que *A. acutifolius*, que está más condicionada por las primeras lluvias de finales de verano, del clima mediterráneo. Además *A. albus*, muestra un patrón de emisión variable durante el día, más complejo (pentadecano) durante las primeras horas del día, mientras que el aroma de *A. acutifolius* se mantiene constante. A nivel interespecífico, la pantalla visual que producen estas esparragueras, debido a la intensidad de su floración, también son importantes en la atracción de polinizadores.

En el segundo capítulo de la tesis, describimos para dos especies simpátricas de *Clematis*, como la estacionalidad de la floración, condiciona cualitativamente el perfil volátil de cada especie, a pesar de que ambas presentan unas combinaciones de COV diferentes, formadas por compuestos típicos en interacciones planta-polinizador, y relacionados con la atracción de polinizadores generalistas, como los himenópteros: *Apis mellifera* L. y *Bombus terrestris* L.

A nivel de comunidad, discutimos el papel de estas plantas, que florecen abundantemente en dos períodos críticos para la entomofauna. La floración invernal de *C. cirrhosa* supone una importante fuente de recompensas para sus polinizadores, período en el cual la disponibilidad de plantas mediterráneas en flor, es muy baja (Herrera, 1985). Además, las flores en forma de campana y su disposición hacia abajo, son rasgos característicos en especies de *Clematis* que florecen en épocas lluviosas. Durante el verano mediterráneo, ocurre la misma situación. Solo unas pocas especies autóctonas permanecen en flor, como *C. flammula*, *Capparis spinosa* L., *Daucus carota* L., o *A. albus*, limitando los recursos para los polinizadores. Buena parte de estas especies, disponen las flores hacia arriba y combinan una floración abundante y vistosa, que junto con la emisión de COV, como estrategias para atraer a sus polinizadores. La fuerte introducción de especies alóctonas (p. ej., *Lantana camara* L., *Lonicera japonica* Thunb., o *Carpobrotus* sp.) que se ha producido durante las últimas décadas, puede contribuir a modular esta situación.

La comparación de las diferencias cualitativas y cuantitativas de los COV entre taxones estrechamente relacionados y la evaluación de los efectos del medio ambiente en sus emisiones son pasos importantes para deducir la función de los COV y su importancia evolutiva (Jaeger et al., 2016). El valor taxonómico de los aromas florales se ha demostrado en algunos trabajos, aunque son escasos los estudios que comparan los COV florales de las especies parentales y de sus híbridos, en sus poblaciones naturales (Feulner et al., 2011; Bischoff et al., 2014). Los trabajos en orquídeas de Salzman et al. (2007) y de Cortis et al. (2009), muestran patrones del aroma floral, intermedios, como ocurre con *Rh. xbermejoi* (capítulo 3). Sin embargo, en otras orquídeas, se han detectado compuestos que no estaban presentes en las emisiones de los parentales (Vereecken, et al., 2010). El destino evolutivo de los híbridos en sus poblaciones naturales podría depender de los COV florales resultantes y su capacidad para atraer polinizadores, entre otras adaptaciones fisiológicas.

La comprensión de la evolución de los COV en las plantas con flores, químicamente complejos y dinámicos, requiere estandarizar los métodos de captura y análisis, especialmente en las comparaciones interespecíficas, inclusive ciertos factores ambientales. El desarrollo de técnicas estáticas y dinámicas para la captura de COV, las herramientas de análisis (GC-MS), y la disponibilidad de bases de datos y bibliotecas de espectros de masas, han favorecido la investigación del volatilo vegetal y su ecología. Durante la planificación de una investigación, cabe considerar que cada método de captura de COV, así como los procedimientos, van influenciar más o menos, en la composición volátil resultante (Cagliero et al., 2021). De la misma manera, el perfil químico de cualquier aceite esencial, estará condicionado por el procedimiento de extracción que se lleve a cabo y las características de cada material vegetal (Elshafie & Camele, 2017). En los próximos años se espera un incremento de estos estudios, y la aplicación de nuevas técnicas, como la integración de datos a gran escala y el análisis de redes, que supondrán un importante avance en el conocimiento e interpretación del significado ecológico y biológico de los COV (Cuperlovic-Culf, 2018). Sin embargo, aún quedan muchas preguntas por responder. Para continuar con los avances en este campo de investigación, parece que serán claves una serie de premisas: adoptar un enfoque multidisciplinar y comunitario, que englobe las diferentes interacciones ecológicas de una comunidad, integrar la dinamicidad química de las variaciones ontogenéticas y fisiológicas, ampliar el rango de especies vegetales estudiadas, así como los hábitats más singulares, o explorar las interacciones volátiles entre plantas y microorganismos, que se producen en el subsuelo, etc. Finalmente, y desde una perspectiva global, es imprescindible seguir evaluando el impacto del cambio climático en la emisión y funcionalidad de los COV vegetales, considerando que estos pueden varían de forma sustancial, debido a factores abióticos (temperatura, radiación, estrés hídrico, etc.), cada vez más imprevisibles.

## **CONCLUSIONES**



En esta tesis se han caracterizado los compuestos orgánicos volátiles de 8 táxones autóctonos de las Islas Baleares y se han descrito, aplicado y relacionado sus diferentes funcionalidades ecológicas.

Las conclusiones particulares de cada capítulo son:

### Capítulo 1.

- 1.- Se ha estudiado la composición de los aceites esenciales e identificado los compuestos orgánicos volátiles (COV) emitidos por *Clinopodium rouyanum*. Más del 80% de los compuestos son monoterpenos oxigenados, entre los que destacan la pulegona y el mentol, en menos medida.
- 2.- En la caracterización de los rasgos micromorfológicos de las estructuras epidérmicas de los tejidos aéreos de *C. rouyanum*, se han observado tricomas tricelulares no glandulares, tricomas peltados y tricomas capitados.
- 3.- Los compuestos volátiles de *C. rouyanum*, principalmente, pulegona y mentol, muestran actividad repelente contra herbívoros invertebrados. El efecto disuasorio de moluscos, es una estrategia de defensa clave, para la conservación de esta especie endémica de las Islas Baleares.

### Capítulo 2.

- 1.- Los perfiles florales de *Clematis cirrhosa* y *Clematis flammula*, presentan un patrón de emisión diferente, rico en monoterpenos, pero dirigido a la atracción de polinizadores generalistas.
- 2.- *C. cirrhosa* que florece durante las estaciones lluviosas del clima mediterráneo, presenta las flores en forma de campana orientadas hacia abajo, que permanecen abiertas cerca de 20 días, y son polinizadas casi exclusivamente por *A. mellifera* y *B. terrestris*, en proporciones parecidas.
- 3.- *C. flammula*, que florece durante la época seca del clima mediterráneo, presenta las flores las flores en forma de disco y orientadas hacia arriba, que permanecen abiertas unos 12 días, y son visitadas por al menos 20 especies diferentes, entre las que destacan *A. mellifera* y *Polistes dominula*.
- 4.- La floración abundante de estas dos especies de *Clematis*, en periodos de mayor estrés para los polinizadores, juega un papel fundamental en la supervivencia de la entomofauna polinizadora.

### Capítulo 3.

- 1.- La emisión de compuestos orgánicos volátiles florales, de *Rhamnus alaternus* y *Rh. ludovici-salvatoris*, muestra diferencias cuantitativas y cualitativas significativas, aunque ambos aromas son atractivos para la atracción de polinizadores himenópteros generalistas.
- 2.- *Rh. alaternus* muestra una mayor heterogeneidad química y genética que *Rh. ludovici-salvatoris*, mientras que los híbridos entre ambas especies, son químicamente más parecidos a *Rh. alaternus* que a *Rh. ludovici-salvatoris*.
- 3.- Se ha corroborado que los compuestos orgánicos volátiles pueden tener implicaciones taxonómicas y pueden discriminar entre taxones estrechamente emparentados.

### Capítulo 4.

- 1.- Los principales compuestos volátiles en *A. albus* son derivados bencénicos y sesquiterpenos, mientras que en *A. acutifolius* son derivados de los carotenoides, monoterpenos y sesquiterpenos. Además de las diferencias cualitativas y cuantitativas entre especies, *A. albus* varía la composición del aroma floral durante el día.
- 2.- La fenología de la floración de las dos especies de *Asparagus* parece estar determinada principalmente por dos reguladores: el fotoperiodo en *A. albus* (floreció entre 10 y 15 días antes), y la disponibilidad de agua (precipitaciones) en *A. acutifolius*. tras un periodo de estrés hídrico.
- 3.- La diversificación de aromas y las variaciones fenológicas, resultan estrategias adaptativas entre especies sincrónicas y simpátricas que compiten potencialmente por los mismos polinizadores.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abobakr Y, Alsarar A, Abdel-Kader M. 2022. Fumigant Toxicity and Feeding Deterrent Activity of Essential Oils from *Lavandula dentata*, *Juniperus procera*, and *Mentha longifolia* against the Land Snail *Monacha obstructa*. Agriculture. 12. 934. Doi: 10.3390/agriculture12070934.

Alpuente N, Miranda M, Cursach J. 2022. Pollination biology of *Aristolochia bianorii* Sennen & Pau: promoting cross-pollination but assuring the reproductive success in island ecosystems. Plant Biology. Doi:10.1111/plb.13497.

Akula R, Ravishankar GA. 2011. Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants. Plant Signal. Behav. 6:1720–1731. Doi: 10.4161/psb.6.11.17613

Baldwin IT, Halitschke R, Paschold A, von Dahl CC, Preston CA. 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions: “talking trees” in the genomics era. Science. 311: 812–815. Doi: 10.1126/science.1118446

Baldwin EA, Goodner K, Plotto A. 2008. Interaction of volatiles, sugars, and acids on perception of tomato aroma and flavor descriptors. Journal of food science. 73(6): S294-S307. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00825.x

Baldovini N, Ristorcelli D, Tomi F, Casanova J. 2000. Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France). 15(1): 50-54. Doi: 10.1002/(SICI)1099-1026(200001/02)15:13.0.CO;2-F

Bari R, Jones JD. 2009. Role of Plant Hormones in Plant Defence Responses. Plant Molecular Biology. 69: 473-488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>

Baser KHC, Buchbauer G. 2010. Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420063165>

Bischoff M, Jürgens A, Campbell DR. 2014. Floral scent in natural hybrids of *Ipomopsis* (Polemoniaceae) and their parental species. Ann Bot. 113(3):533-44. Doi: 10.1093/aob/mct279. Epub 2013 Dec 18. PMID: 24355404; PMCID: PMC3906972.

Bruinsma M, Lucas-Barbosa D, ten Broeke C, Dam N, van Beek T, Dicke M, van Loon J. 2014. Folivory Affects Composition of Nectar, Floral Odor and Modifies Pollinator Behavior. Journal of chemical ecology. 40: 39-49. Doi:10.1007/s10886-013-0369-x.

Bushdid C, Magnasco MO, Vosshall LB, Keller A. 2014. Humans Can Discriminate More than 1 Trillion Olfactory Stimuli. Science. 343:1370-1372. Doi: 10.1126/science.1249168

Cagliero C, Mastellone G, Marengo A, Bicchi C, Sgorbini B, Rubiolo P. 2021. Analytical strategies for in-vivo evaluation of plant volatile emissions - A review. Analytica Chimica Acta. 1147: 240-258 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.11.029>

Caissard JC, Meekijironenroj A, Baudino S, Anstett M. 2004. Localization of production and emission of pollinator attractant on whole leaves of *Chamaerops humilis* (Arecaceae). American Journal of Botany. 91. 1190-9. 10.3732/ajb.91.8.1190.

Camele I, De Feo V, Altieri L, Mancini E, De Martino L, Luigi Rana G. 2010. An attempt of postharvest orange fruit rot control using essential oils from Mediterranean plants. *Journal of Medicinal Food*. 13(6):1515–1523. doi: 10.1089/jmf.2009.0285.

Cardoza YJ, Alborn HT, Tumlinson JH. 2002. In vivo Volatile Emissions from Peanut Plants Induced by Simultaneous Fungal Infection and Insect Damage. *Journal of Chemical Ecology*. 28: 161–174. <https://doi.org/10.1023/A:1013523104853>

Ćavar, S., Vidic, D., Maksimović, M., 2013. Volatile constituents, phenolic compounds, and antioxidant activity of *Calamintha glandulosa* (Req.) Benth. *J. Sci. Food Agric*. 93, 1758–1764. Doi: 10.1002/jsfa.5967.

Cheng AX, Lou YG, Mao YB, Lu S, Wang LJ, Chen, XY. 2007. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *Journal of Integrative Plant Biology*. 49: 179-186. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00395.x>

Çirak C, Seyis F, Aykutlu A, Yurteri E. 2022. Ontogenetic changes in phenolic contents and volatile composition of *Hypericum androsaemum* and *Hypericum xylosteifolium*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 102. 104429. Doi: 10.1016/j.bse.2022.104429.

Conforti F, Marrelli M, Statti G, Menichini F, Uzunov D, Solimene U, Menichini F. 2012. Comparative chemical composition and antioxidant activity of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) Nyman and *Calamintha grandiflora* (L.) Moench (Labiatae). *Nat Prod Res*. 26(1):91-7. Doi: 10.1080/14786419.2010.545356.

Cortis P, Vereecken NJ, Schiestl FP, Lumaga MRB, Scrugli A, Cozzolino S. 2009. Pollinator convergence and the nature of species' boundaries in sympatric Sardinian *Ophrys* (Orchidaceae) *Annals of Botany*. 104:497–506. Doi: 10.1093/aob/mcn219

Cuperlovic-Culf M. 2018. Machine Learning Methods for Analysis of Metabolic Data and Metabolic Pathway Modeling. *Metabolites*. 11,8(1):4. Doi: 10.3390/metabo8010004.

Dicke M, Baldwin IT. 2010. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in Plant Science*. 15: 167–175. Doi: 10.1016/j.tplants.2009.12.002

Dicke M, Lucas-Barbosa D. 2020. Herbivore-induced plant volatiles as a source of information in plant–insect networks. In *Biology of plant volatiles* pp. 327-346. CRC Press. Doi:10.1201/9780429455612-20

Dobravalskytė D, Venskutonis PR, Talou T. 2012 Antioxidant properties and essential oil composition of *Calamintha grandiflora* L. *Food Chem*. 135(3):1539-46. Doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.094.

Dobson HEM. 2006. Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. In: Dudareva N, Pichersky E, eds. *Biology of floral scent*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 147–198. Doi: 10.1201/9781420004007.sec4

Dötterl S, Wolfe LM, Jürgens A. 2005. Qualitative and quantitative analyses of flower scent in *Silene latifolia*. *Phytochemistry*, 66(2): 203-213. Doi: 10.1016/j.phytochem.2004.12.00

Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J. 2004. Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiology*. 135 (4): 1893–1902. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049981>

Dudareva N, Pichersky E. 2006. Floral scent metabolic pathways: their regulation and evolution. *Biology of Floral Scent* (eds N. A. P. Dudareva & E. Pichersky), pp. 55–78. Taylor and Francis, Boca Raton. DOI:10.1201/9780429455612-10

Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK, Kaplan I. 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*. 198(1): 16-32. Doi: 10.1111/nph.12145

Dufayé M, Hossaert-McKey M, Anstett MC. 2003. When leaves act like flowers: how dwarf palms attract their pollinators. *Ecology Letters* 6: 28–34. Doi: 10.1046/j.1461 0248.2003.00382.x

Elshafie HS, Camele I. 2017. An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health. *Biomed Res Int*. 2017:9268468. Doi: 10.1155/2017/9268468.

Farré-Armengol G, Filella I, Llusia J, Penuelas J. 2013. Floral volatile organic compounds: Between attraction and deterrence of visitors under global change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 15: 56–67. Doi: 10.1016/j.ppees.2012.12.002.

Feulner M, Schuhwerk F, Dötterl S (2011) Taxonomical value of inflorescence scent in *Hieracium* s. str. *Biochem Syst Evol* 39: 732–743.

Filella I, Primante C, Llusia J, Martín González AM, Seco R, Farré-Armengol G, Rodrigo A, Bosch J, Peñuelas J. 2013. Floral advertisement scent in a changing plant-pollinators market. *Sci. Rep.* 3:3434. Doi: 10.1038/srep03434.

Friberg M, Schwind C, Raguso RA, Thompson JN. 2013. Extreme divergence in floral scent among woodland star species (*Lithophragma* spp.) pollinated by floral parasites. *Ann Bot* 111:539–550. <https://doi.org/10.1093/aob/mct007>

Friberg M, Schwind C, Roark LC, Raguso RA, Thompson JN. 2014. Floral scent contributes to interaction specificity in coevolving plants and their insect pollinators. *Journal of Chemical Ecology*. 40 (9): 955-65. Doi: 10.1007/s10886-014-0497-y.

Gagliano M. 2013. Green symphonies: A call for studies on acoustic communication in plants. *Behavioral Ecology*. 24. Doi: 10.1093/beheco/ars206.

Gagliano M, Renton M. 2013. Love thy neighbour: Facilitation through an alternative signalling modality in plants. *BMC Ecology*. 13:19. Doi: 10.1186/1472-6785-13-19.

Glinwood R, Ninkovic V, Pettersson J. 2011. Chemical interaction between undamaged plants—effects on herbivores and natural enemies. *Phytochemistry*. 72(13):1683-1689. Doi: 10.1016/j.phytochem.2011.02.010

Goodrich K, Raguso R. 2009. The olfactory component of floral display in *Asimina* and *Deeringothamnus* (Annonaceae). *The New phytologist*. 183: 457-69. Doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02868.x.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 853–860. Doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x

Heiduk A, Kong H, Brake I, von Tschirnhaus M, Tolasch T, Tröger AG, Wittenberg E, Francke W, Meve U, Dötterl S. 2015. Deceptive *Ceropegia dolichophylla* fools its kleptoparasitic fly pollinators with exceptional floral scent. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 3:66. doi: 10.3389/fevo.2015.00066

Heil M, Silva Bueno JC. 2007. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *PNAS. USA* 104: 5467–5472. doi: 10.1073/pnas.0610266104

Heil M. 2014. Herbivore-induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions *New Phytologist*. 204: 297-306. Doi:10.1111/nph.12977

Holopainen JK, Gershenzon J. 2010. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends in Plant Science*. 15:176–184. Doi: 10.1016/j.tplants.2010.01.006

Huang M, Sanchez-Moreiras AM, Abel C, Sohrabi R, Lee S, Gershenzon J, Tholl D. 2012. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- $\beta$ -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytologist*. 193: 997–1008. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.04001.x

Huber FK, Kaiser R, Sauter W, Schiestl FP. 2005. Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (Orchidaceae). *Oecologia*. 142: 564–575. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1750-9>

Jaeger DM, Runyon JB, Richardson BA. 2016. Signals of speciation: volatile organic compounds resolve closely related sagebrush taxa, suggesting their importance in evolution. *New Phytologist*. 211(4): 1393-1401. Doi: 10.1111/nph.13982

Johnson D, Gilbert L. 2014. Interplant signalling through hyphal networks. *The New phytologist*. 205. Doi:10.1111/nph.13115.

Junker RR, Gershenzon J, Unsicker SB. 2011. Floral odor bouquet loses its ant repellent properties after inhibition of terpene biosynthesis. *Journal of Chemical Ecology*. 37: 1323–1331. Doi: 10.1007/s10886-011-0043-0

Junker RR. 2016. “Multifunctional and Diverse Floral Scents Mediate Biotic Interactions Embedded in Communities” in Deciphering Chemical Language of Plant Communication. Eds. J. Blande and R. Glinwood (Cham: Springer) 257-282. Doi: 10.1007/978-3-319-33498-1\_11

Jürgens A, Glück U, Aas G, Dötterl S. 2014. Diel fragrance pattern correlates with olfactory preferences of diurnal and nocturnal flower visitors in *Salix caprea* (Salicaceae). Botanical Journal of the Linnean Society. 175(4): 624-640.

Kallenbach M, Oh Y, Eilers EJ, Veit D, Baldwin IT, Schuman MC. 2014. A robust, simple, high-throughput technique for time-resolved plant volatile analysis in field experiments. Plant Journal. 78: 1060–1072. doi.org/10.1111/tpj.12523

Karban R, Shiojiri K, Ishizaki S. 2010. An air transfer experiment confirms the role of volatile cues in communication between plants. American Naturalist. 176:381– 384. Doi:10.1086/655222

Kegge W, Pierik R. 2010. Biogenic volatile organic compounds and plant competition. Trends in Plant Science. 15(3):126-32. doi: 10.1016/j.tplants.2009.11.007.

Kessler D, Gase k, Baldwin IT. 2008. Field experiments with transformed plants reveal the sense of floral scents. Science 321:1200–1202. Doi: 10.1126/science.1160072

Kessler A, Halitschke R, Poveda K. 2011. Herbivory-mediated pollinator limitation: negative impacts of induced volatiles on plant–pollinator interactions. Ecology. 92(9): 1769-1780. Doi: 10.2307/23034853

Kessler M, Connor E, Lehnert M. 2015. Volatile organic compounds in the strongly fragrant fern genus *Melpomene* (Polypodiaceae). Plant Biology. 17(2): 430-436. https://doi.org/10.1111/plb.12252

Knudsen JT, Tollsten L. 1995. Floral scent in bat-pollinated plants: a case of convergent evolution, Botanical Journal of the Linnean Society. 119 (1): 45–57. https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1995.tb00728.x

Knudsen JT, Tollsten L, Groth I, Bergström G, Raguso R. 2004. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: Floral scent composition in hummingbird-pollinated taxa. Botanical Journal of The Linnean Society – Bot J Linn Soc. 146. 191-199. 10.1111/j.1095-8339.2004.00329. x.

Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, Ståhl B. 2006. Diversity and distribution of floral scent. Botanical Review. 72:1–120. doi.org/10.1663/0006-8101

Laule O, Fürholz A, Chang HS, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Grussem W, Lange M. 2003. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 100(11): 6866-6871. Doi: 10.1073/pnas.1031755100



Llorens L, Llorens-Molina JA, Agnello S, Boira H. 2014. Geographical and environment-related variations of essential oils in isolated populations of *Thymus richardii* Pers. in the Mediterranean basin. *Biochemical Systematics and Ecology* 56: 246–254. Doi: 10.1016/j.bse.2014.05.007

Llusia J, Penuelas J, Gimeno BS. 2002. Seasonal and species-specific response of VOC emissions by Mediterranean woody plant to elevated ozone concentrations. *Atmospheric Environment*. 36: 3931-3938. Doi: 10.1016/S1352-2310(02)00321-7

Loreto F, Delfine S. 2000. Emission of isoprene from salt-stressed *Eucalyptus globulus* leaves. *Plant Physiology*. 123(4): 1605-1610. Doi: 10.1104/pp.123.4.1605

Loreto F, Barta C, Brilli F, Nogues I. 2006. On the induction of volatile organic compound emissions by plants as consequence of wounding or fluctuations of light and temperature. *Plant, cell & environment*. 29(9): 1820-1828. Doi: 10.1111/j.1365-3040.2006. 01561.x

Loreto F, Schnitzler JP. 2010. Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends Plant Science*.15(3):154-66. Doi: 10.1016/j.tplants.2009.12.006

Majetic CJ, Raguso RA, Ashman TL. 2009. The sweet smell of success: floral scent affects pollinator attraction and seed fitness in *Hesperis matronalis*. *Functional Ecology*. 23: 480-487, doi:10.1111/j.1365-2435.2008. 01517.x

Mancini E, Camele I, Elshafie H, De Martino L, Pellegrino C, Grulova D, De Feo V. 2014. Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* from Different Areas in the Southern Apennines (Italy). *Chemistry & Biodiversity*. 11. Doi: 10.1002/cbdv.201300326.

Mateos A, Carbonell E. 1990. "Análisis de la fracción aromática de alimentos. Técnicas de extracción y concentración". *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. 30: 431-444.

Mccall A, Irwin R. 2007. Florivory: The intersection of pollination and herbivory. *Ecology letters*. 9. 1351-65. 10.1111/j.1461-0248.2006.00975. x.

McGill BJ, Enquist BJ, Weiher E, Westoby M (2006) Rebuilding community ecology from functional traits. *OpTrends Ecol Evol* 21 (4): 178-185. DOI: 10.1016/j.tree.2006.02.002.

Moeller DA (2004) Facilitative interactions among plants via shared pollinators. *Ecology* 85: 3289–3301. doi:10.1890/03-0810.

Okamoto T, Su ZH. 2021. Chemical analysis of floral scents in sympatric *Ficus* species: highlighting different compositions of floral scents in morphologically and phylogenetically close species. *Plant Systematics and Evolution*. 307: 45. 10.1007/s00606-021-01767-y.

Orians C. 2005. Herbivores, vascular pathways, and systemic induction: facts and artifacts. *Journal of Chemical Ecology*. 31(10):2231-42. doi: 10.1007/s10886-005-7099-7.

Ormeño E, Fernandez C, Mévy, JP. 2007. Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. *Phytochemistry*. 68. Doi: 840-52. 10.1016/j.phytochem.2006.11.033.

Owen S, Penuelas J. 2005. Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. Trends in plant science. 10: 420-6. [10.1016/j.tplants.2005.07.010](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.07.010)

Pasquini D, Gori A, Ferrini F, Brunetti C. 2021. An Improvement of SPME-Based Sampling Technique to Collect Volatile Organic Compounds from *Quercus ilex* at the Environmental Level. Metabolites. 11(6): 388. [doi.org/10.3390/metabo11060388](https://doi.org/10.3390/metabo11060388)

Pawliszyn J. 1997. Solid Phase Microextraction. Theory and Practice. 1<sup>a</sup> ed. New York: Wiley. ISBN: 978-0-471-19034-9

Pawliszyn J. 2000. Theory of Solid-Phase Microextraction. Journal of Chromatographic Science. 38: 270-278. [Doi.org/10.1093/chromsci/38.7.270](https://doi.org/10.1093/chromsci/38.7.270)

Pellegrino G, Bellusci F, Palermo AM (2016) Who helps whom? Pollination strategy of *Iris tuberosa* and its relationship with a sexually deceptive orchid. J Plant Res 129: 1051–1059. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0853-9>.

Peñuelas, J, Llusià J. 2002. Linking photorespiration, monoterpenes and thermotolerance in Quercus. New Phytologist. 155(2): 227-237. Doi: [10.1046/j.1469-8137.2002.00457.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00457.x)

Pichersky E, Gang DR. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective. Trends in Plant Science. 5: 439–445. Doi: [10.1016/S1360-1385\(00\)01741-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01741-6)

Pichersky E, Noel JP, Dudareva N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. Science. 311:808–811. Doi: [10.1126/science.1118510](https://doi.org/10.1126/science.1118510)

Pierik R, Ballaré CL, Dicke M. 2014. Ecology of plant volatiles: taking a plant community perspective. Plant Cell Environment. 37(8): 1845-1853, [10.1111/pce.12330](https://doi.org/10.1111/pce.12330)

Pizà B. 2017. Aspectes químico-funcionals de la flora dunar (BVOCs i Al·lelopatia). Universitat de les Illes Balears.

Quintero C, Barton K, Boege K. 2013. The ontogeny of plant indirect defenses. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. 15. 245–254. Doi: [10.1016/j.ppees.2013.08.003](https://doi.org/10.1016/j.ppees.2013.08.003).

Radwan M, Gad A. 2021. Essential oils and their components as promising approach for gastropod mollusc control: a review. Journal of Plant Diseases and Protection. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00484-5>

Raguso RA. 2008a. Start making scents: The challenge of integrating chemistry into pollination ecology. Entomologia Experimentalis et Applicata. 128. 196 - 207. Doi: [10.1111/j.1570-7458.2008.00683.x](https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00683.x).

Raguso RA. 2008b. Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. Annual review of ecology, evolution, and systematics, 549-569.

Salzmann CC, Cozzolino S, Schiestl FP. 2007. Floral scent in food-deceptive orchids: species specificity and sources of variability. *Plant Biol.* 9(6):720-9. Doi: 10.1055/s-2007-965614.

Sanz J, Mus M, Rossello JA. 2000. Volatile components variation in the *Teucrium marum* complex (Lamiaceae) from the Balearic Islands. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 132: 253 - 261. Doi: 10.1111/j.1095-8339.2000.tb01530.x.

Schäffler I, Steiner KE, Haid M, van Berkel SS, Gerlach G, Johnson SD, Wessjohann L, Dötterl S. 2015. Diacetyl, a reliable cue and private communication channel in a specialized pollination system. *Scientific Reports.* 5:12779. Doi: 10.1038/srep12779

Schiestl FP, Glaser F. 2012. Specific ant-pollination in an alpine orchid and the role of floral scent in attracting pollinating ants. *Alpine Botany.* 122: 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00035-011-0098->

Stashenko E, Martínez JR. 2010. Separar, fragmentar e integrar: la rutina de un análisis por GC-MS. Patrones de fragmentación de moléculas orgánicas. *Scientia Chromatographica.* 2: 23-46. Instituto Internacional de Cromatografía ISSN 1984-4433

Tattini M, Loreto F. 2014. Plants in Mediterranean Areas: “Living in the Sun”. *Environ. Exp. Bot.* 103:1–2. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.02.004.

Thompson JN, Schwind C, Guimarães PR Jr, Friberg M. 2013. Divergence through multitrait evolution in a coevolving interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:11487–11492. Doi:10.1073/pnas.1307451110

Tollsten L, Knudsen J. 1992. Floral scent in dioecious *Salix* (Salicaceae)-a cue determining the pollination system?. *Plant Systematics and Evolution.* 182: 229-237. Doi: 10.1007/BF00939189.

Tomàs J, Gil L, Cardona C, Llorens L. 2019. Variación del perfil químico de los compuestos orgánicos volátiles en el agregado mediterráneo de *Hippocrepis balearica* (Leguminosae). Implicaciones para la conservación. 9º Congreso de Biología de la Conservación de Plantas (SEBiCoP), Libro de resúmenes. Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

Vallat A, Gu H, Dorn S. 2005. How rainfall, relative humidity and temperature influence volatile emissions from apple trees in situ. *Phytochemistry.* 66(13), 1540-1550. Doi: 10.1016/j.phytochem.2005.04.038

Van Dam NM, Qiu BL, Hordijk CA, Vet LE, Jansen JJ. 2010. Identification of biologically relevant compounds in aboveground and belowground induced volatile blends. *Journal of Chemical Ecology.* 36(9):1006-16. Doi: 10.1007/s10886-010-9844-9

Vereecken NJ, Cozzolino S, Schiestl FP. 2010. Hybrid floral scent novelty drives pollinator shift in sexually deceptive orchids. *BMC Evol Biol.* 10, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-103>

Whitehead MR, Peakall R. 2009. Integrating floral scent, pollination ecology and population genetics. *Functional Ecology.* 23:863–874. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01620.x>

Woolfenden E. 2012. Desorción térmica para cromatografía de gases. Cromatografía de gases, ed. CF Poole, Elsevier. 10:235-289. Desorción térmica analítica: Historia, aspectos técnicos y rango de aplicación, Nota de soporte técnico de desorción térmica 12, Markes International. <http://www.markes.com/Downloads/Application-notes.aspx>

Wright GA, Schiestl FP. 2009. The evolution of floral scent: the influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signalling of floral rewards *Functional Ecology*. 23 (5):841-851. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01627.x>

Wu R, Lev-Yadun S, Sun L, Sun H and Song B. 2021. Higher elevations tend to have higher proportion of plant species with glandular trichomes. *Frontiers in Plant Sciences*. 12:632464. Doi: 10.3389/fpls.2021.632464

Xie Y, Tian L, Han X, Yang Y. 2021. Research Advances in Allelopathy of Volatile Organic Compounds (VOCs) of Plants. *Horticulturae*. 7(9):278. Doi:10.3390/horticulturae7090278

Zhang T, Bao F, Yang Y, Hu L, Ding A, Ding A, Wang J, Cheng T, Zhang Q. 2020. A comparative analysis of floral scent compounds in intraspecific cultivars of *Prunus mume* with different corolla colours. *Molecules*. 25(1): 145. <https://doi.org/10.3390/molecules25010145>

