



**XIè Premi PRBB al millor treball de recerca en
Ciències de la Salut i de la Vida**

2016

Treball guanyador del 4rt premi

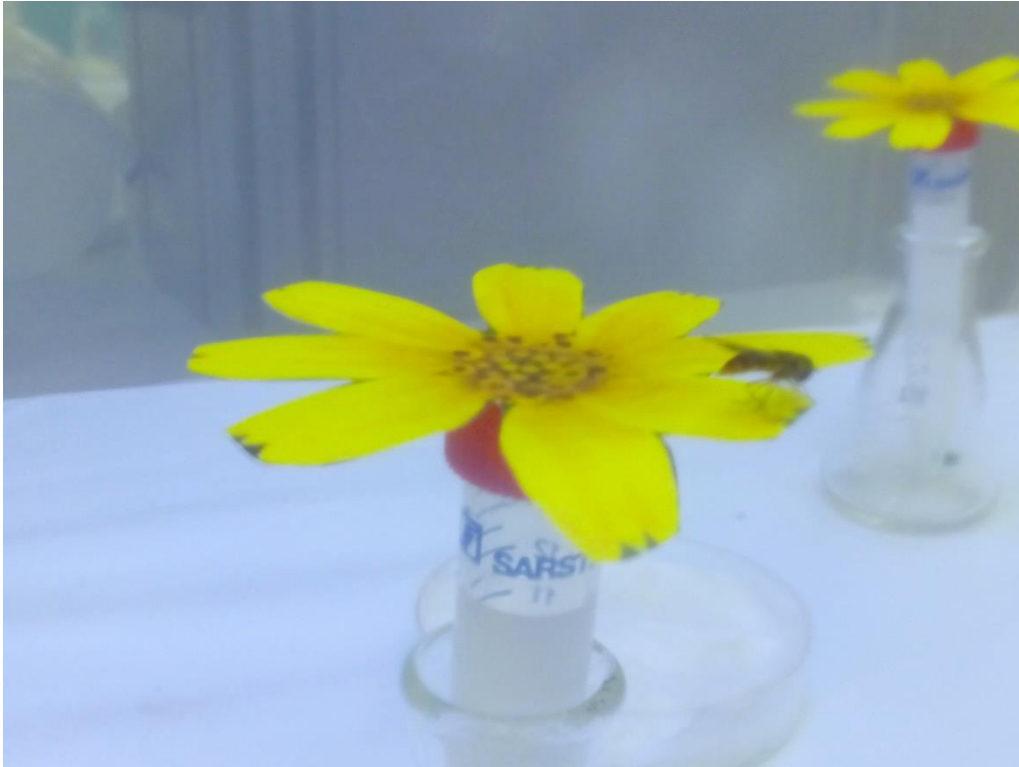
**Canvi climàtic i interacció planta-pol·linitzador:
Respostes d'*Episyrphus balteatus* a BVOCs actuals i
predits de *Sonchus tenerrimus* i *Globularia alypum***

Helena Nereida Calatrava Rodríguez

Tutor: Joan Perdigués

Col·legi Claret Barcelona (Barcelona)

Treball de Recerca



Canvi climàtic i interacció planta-pol·linitzador

Respostes d'*Episyrphus balteatus* a BVOCs actuals i predits de
Sonchus tenerrimus i *Globularia alypum*

Helena Nereida Calatrava Rodríguez

Tutor: Joan Perdigués

Col·legi Claret Barcelona

Curs 2015-2016

Agraïments

M'agradaria donar les gràcies principalment al meu tutor de Treball de Recerca Joan Perdigués per tota l'ajuda durant el procés de treball i per haver-me obert els ulls al preciós món de la química durant aquest curs i mig al Col·legi Claret.

També m'agradaria donar les gràcies a la meva tutora de classe Anna Clavaguera per haver-se preocupat de que tinguéssim al dia el projecte i per animar-nos a treballar.

Gràcies a l'Eva Jiménez Guri, investigadora del CRG (Centre de Regulació Genòmica de Barcelona) pel fet d'haver-me permès fer els experiments al laboratori del CRG, dins el PRBB (Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona) i per haver estat sempre amb un somriure present per ajudar-me. També gràcies al Karl R Wottom per les mosques, l'infraestructura experimental i la feromona a-farnesene, així com per l'ajuda amb els problemes en el moment de fer els experiments.

Gràcies a la Mariana López pel compost 1R-a-pinene del laboratori del Mathieu Louis al CRG. Gràcies també al Xavier Ariza, professor de la Universitat de Barcelona, Departament de Química Orgànica, pels compostos 3-carè i D-limonè.

Agraeixo plenament l'ajuda del Doctor en Biologia Gerard Farré, Departament d'Ecologia de la UAB, qui em va ajudar a entendre el món de les mosques i les emissions florals i qui em va permetre assistir a la presentació de la seva tesi doctoral.

Gràcies infinites al meu pare i a la meva mare, els quals estimaré indefinidament. Gràcies també al meu gat, qui ha estat al meu costat durant totes les hores d'escriptura, (sempre adormit però inspirador).

Índex

1. Objectius i justificació del treball	pàg. 4
2. Introducció	
2.1. Esquema general	pàg. 5
2.2. El procés de pol·linització	pàg. 6
2.3. El nostre insecte	pàg. 6
2.4. Les nostres plantes	pàg. 7
2.5. Estímuls i genètica	pàg. 8
2.6. Els nostres BVOCs	pàg. 9
2.7. El Canvi Climàtic i com influeix en els BVOCs	pàg. 12
2.8. Els volàtils actuals i els volàtils predits	pàg. 16
3. Materials i Mètodes	
3.1. Disseny experimental	pàg. 18
3.2. Esquema general de la metodologia experimental	pàg. 21
3.3. Rondes preliminars	pàg. 22
3.4. Rondes experimentals	pàg. 24
3.4.1. Preferència de compost	pàg. 24
3.4.2. Distribució de la resposta	pàg. 24
3.4.3. Influència del dejuni	pàg. 25
3.4.4. Influència del tipus d'estructura de compost	pàg. 25
3.4.5. Preferències cromàtiques	pàg. 26
3.5. Enregistrament de resultats	pàg. 26
4. Resultats i Discussió	
4.1. Preferència de compost	pàg. 29
4.2. Distribució de la resposta	pàg. 30
4.3. Influència del dejuni	pàg. 32
4.4. Influència del tipus d'estructura de compost	pàg. 33
4.5. Preferències cromàtiques	pàg. 34
5. Conclusió	pàg. 35
6. Bibliografia	pàg. 37

1. Objectius i justificació del treball

La pol·linització és la base tant de l'alimentació dels insectes com de la reproducció de les plantes i per tant determina el progrés de gran part dels nostres ecosistemes. És essencial estudiar-la i fer una predicció de com es desenvoluparà en els pròxims anys ja que canviarà conseqüentment a l'escalfament global. Això és degut als efectes de la temperatura observats a recerques prèvies, que demostren com aquest factor causa un augment i canvi de les emissions volàtils de les flors, les quals són essencials per establir la relació planta-pol·linitzador.

En alguns casos, es prediu que en un futur les plantes emetran alguns compostos amb més intensitat i que fins i tot emetran compostos que la seva espècie mai havia sintetitzat. Els compostos emesos actualment els anomenarem compostos actuals. Els compostos que s'emetran amb més intensitat en un futur (ara s'emeten lleument) o que apareixeran conseqüentment a un canvi de temperatura els anomenarem compostos predits.

El nostre objectiu és descobrir si els pol·linitzadors tenen preferències pel grup de compostos actuals o pels predits. Ens basarem en la hipòtesi de que l'espècie de mosca *Episyrphus balteatus* té una preferència per algun dels dos grups de volàtils. Suposem que aquesta preferència es podrà veure reflectida clarament als resultats dels nostres experiments.

També cal tenir en compte que no només l'estímul olfatiu influeix en els insectes. És per això que també hem estudiat la influència de l'estímul visual al comportament de les nostres mosques, per tal d'entendre millor la psicologia de les respostes dels pol·linitzadors.

L'objectiu d'aquest treball, per tant, és participar en una petita part de la recerca que vetlla per la nostra futura natura al planeta Terra. Estudiem la comunicació entre insectes i plantes i intentem preveure com es veurà alterada per l'escalfament global. Per tant, durant les següents pàgines ens hem llençat a descobrir allò més gran i quilomètric intentant entendre uns petits i mil·limètrics éssers: les mosques.

2. Introducció

1. Esquema general

A continuació es presenta un esquema general que relaciona gràficament tots els conceptes de la teoria que apareixen al treball. Aquests són essencials per entendre el cos i l'objectiu dels experiments, així com la posterior discussió final. Cada apartat de la introducció està inclòs en aquest esquema, amb el qual es pot establir una relació des del redactat gràcies a la numeració dels apartats, que també apareix a l'esquema.

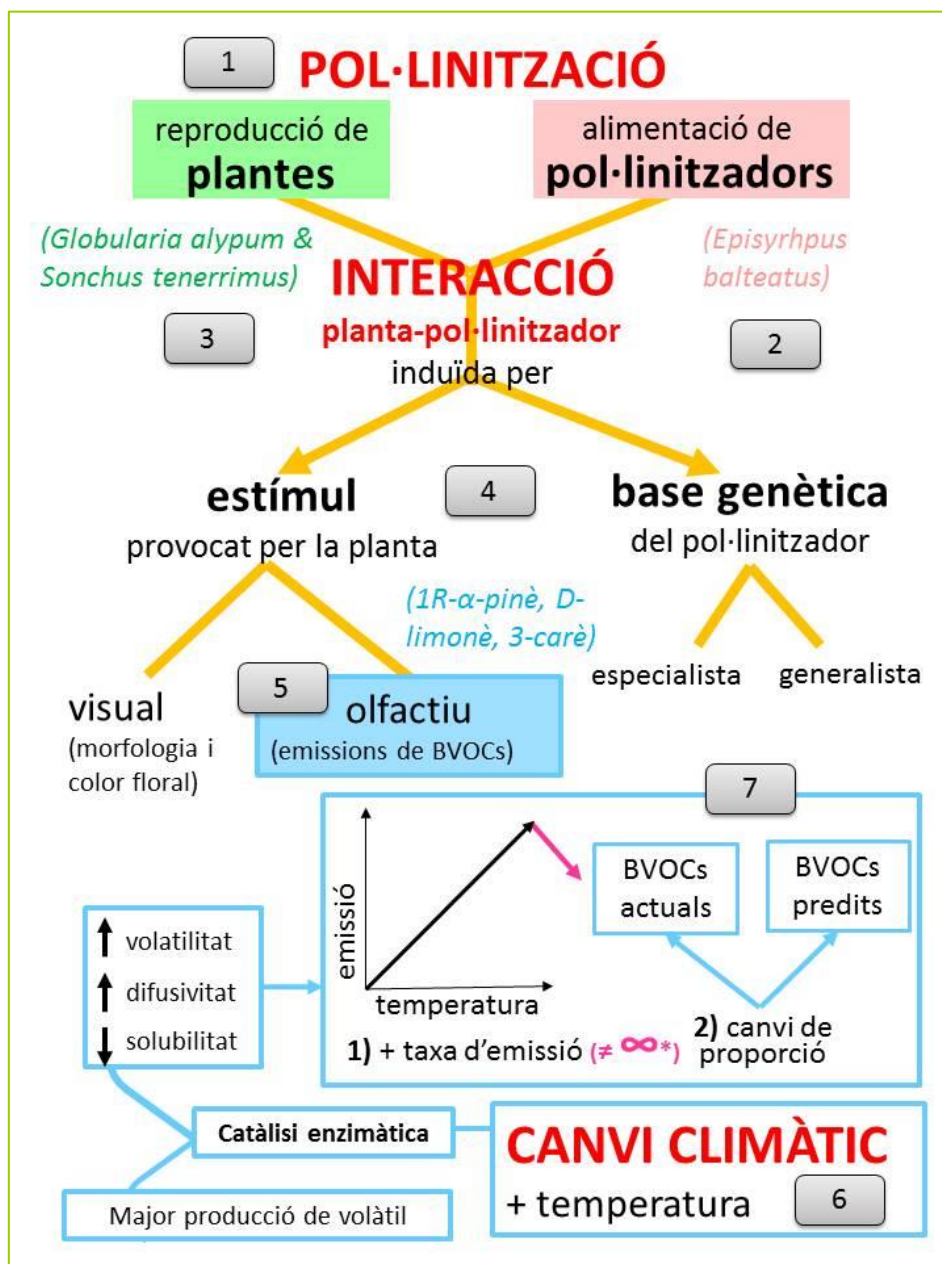


Figura 1. Esquema general de la teoria en la qual es basa la recerca del treball.

2. El procés de pol·linització

El procés de pol·linització és essencial en la reproducció de plantes amb llavors, també anomenades espermatòfits (*Spermatophyta*). Consisteix en el transport de pol·len des del sac pol·línic d'una planta (*pollenizer*) fins el receptacle estructural d'una altra planta, on el gra de pol·len germinarà. Hi ha molts tipus de pol·linització, els quals venen determinats pel seu mitjà de transport o vector. Els vectors possibles són el vent, l'aigua, els insectes i els animals vertebrats.

Segons el tipus de pol·linització que una espècie de planta posi en pràctica, aquesta tindrà un conjunt de característiques destinades a atreure el seu tipus de vector. Aquest conjunt de característiques s'anomenen síndromes florals. En el nostre cas de recerca ens centrarem en la pol·linització facilitada per insectes i, per tant, en les espècies de plantes que presenten el síndrome floral de l'entomofília.

Si es té en compte el tipus d'insecte pol·linitzador es pot ser més específic i parlar de diferents tipus de síndrome entomòfil. En el nostre cas de recerca ens centrarem en la pol·linització per part de l'espècie de mosca *Episyrphus balteatus*. Les plantes pol·linitzades per mosques (insectes pertanyents a l'ordre dels dípters) s'anomenen miòfiles i per tant presenten un conjunt de característiques que atreuen els insectes d'aquest ordre.

3. El nostre insecte

Els insectes corresponen la classe predominant del fílum dels artròpodes, els quals es caracteritzen per ser invertebrats amb exosquelet, cos segmentat i apèndixs també segmentats (amb funció d'extremitats). Es troben dins el subfílum dels hexàpodes degut a que tenen tres parells de potes al seu tòrax. Se'n coneixen més espècies d'insectes (més d'un milió) que de tota la resta de grups d'animals en conjunt; tot i així s'estima que podria haver-ne de sis a deu milions d'espècies i, per tant, encara en queden moltes per descobrir.

Les mosques són insectes que es troben dins de l'ordre dels dípters, els quals només tenen dues ales anteriors degut a que les seves ales posteriors es van veure evolutivament modificades i van donar lloc als halteris. Els halteris són unes estructures contenidores d'òrgans posicionals que aporten informació espacial a l'insecte i dirigeixen el seu vol. Són insectes neòpters ja que pleguen les seves ales quan estan en repòs, a diferència dels paleòpters.

L'espècie de mosca en la qual centrarem la nostra recerca és *Episyrphus balteatus*. Pertany a la família *Syrphidae*, caracteritzada per imitar l'aspecte d'espècies més perilloses com abelles, vespes o borinots. En el cas d'*E. balteatus*, els individus imiten la família *Vespidae* amb bandes de color taronja i negre sobre el seu abdomen. És diferenciable de les vespes per les línies

longitudinals de color gris que té al tòrax i també per les línies negres secundàries (Figura 2). La seva llargària és d'aproximadament 2 cm. S'estén principalment pel continent europeu i asiàtic i s'adapta a ecosistemes tant urbans com naturals. En la seva etapa adulta s'alimenta del nèctar que rep de les plantes. Quan es troba en estat de larva s'alimenta d'àfids, que constitueixen insectes paràsits de les plantes. Cal tenir en compte que són mosques diürnes.

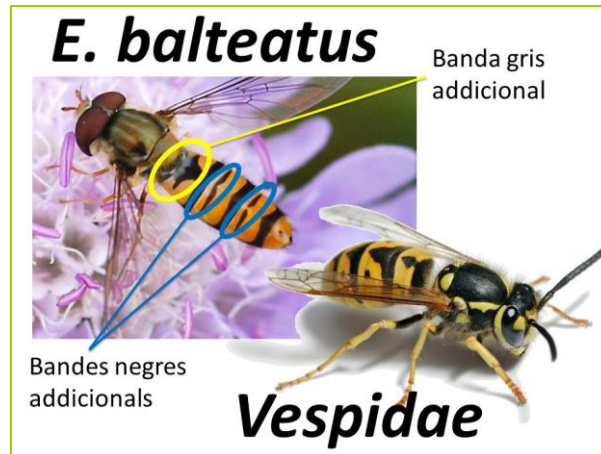


Figura 2. Trets físics mitjançant els quals podem diferenciar l'espècie de mosca *Episyrrhus balteatus* d'un insecte de la família *Vespidae*. **Wikipedia**

Reino:	<i>Animalia</i>
Filo:	<i>Arthropoda</i>
Clase:	<i>Insecta</i>
Orden:	<i>Diptera</i>
Familia:	<i>Syrphidae</i>
Subfamilia:	<i>Syrphinae</i>
Tribu:	<i>Syrphini</i>
Género:	<i>Episyrrhus</i>
Especie:	<i>E. balteatus</i>

Figura 3. Classificació taxonòmica de l'espècie *Episyrrhus balteatus*. **Wikipedia**.

4. Les nostres plantes

Les dues espècies de plantes de les quals parlarem durant el treball són *Globularia alypum* i *Sonchus tenerrimus*. Ambdues pertanyen al grup de plantes angiospermes, és a dir: tenen flors i produeixen fruits amb llavors. Són natives de la regió mediterrània i solen trobar-se en terrenys secs i àrids. Les seves flors donen lloc a aquenís, uns fruits secs produïts per moltes espècies de plantes. L'espècie *Globularia alypum* té flors de color lila-blavós. És considerada un arbust, ja que pot arribar a mesurar entre 30 i 60 cm. L'espècie *Sonchus tenerrimus* té flors de color groc. És fràgil i pot arribar a fer fins 80 cm d'alt.



Regne: *Plantae*
Divisió: *Magnoliophyta*
Classe: *Magnoliopsida*
Ordre: *Lamiales*
Família: *Plantaginaceae*
Gènere: *Globularia*
Espècie: *G. alypum*

Figura 4. A l'esquerra: fotografia de l'espècie de planta *Globularia alypum*. **Wikipedia.** A la dreta: classificació taxonòmica de l'espècie *Globularia alypum*. **Wikipedia.**



Regne: *Plantae*
Clade: *Angiospermae*
Clade: *Asterids*
Ordre: *Asterales*
Família: *Asteraceae*
Tribu: *Cichorieae*
Gènere: *Sonchus*
Espècie: *S. tenerrimus*

Figura 5. A l'esquerra: fotografia de l'espècie de planta *Sonchus tenerrimus*. **Wikipedia.** A la dreta: classificació taxonòmica de l'espècie *Sonchus tenerrimus*. **Wikipedia.**

5. Estímuls i genètica

El conjunt de característiques que tenen les plantes miòfiles per atreure els insectes són tant visuals com olfactives. Aquestes característiques estimulen els pol·linitzadors amb l'objectiu d'atreure'ls. El color de les flors és un senyal molt important utilitzat per cridar l'atenció. Les preferències innates dels pol·linitzadors són principalment pel color groc, però també pels colors blavosos i lilosos. Tot i així, degut a la capacitat d'aprenentatge dels insectes, les seves preferències innates es poden veure alterades i poden arribar a pol·linitzar flors d'altres colors. Fins i tot, aquests colors poden passar a formar part de les seves preferències. Això succeeix quan s'obté nèctar d'una flor d'un color pel qual el pol·linitzador no té una preferència innata (generalment el blanc). Aquest procés s'anomena *colour-reward association*.

Si parlem de l'estímul olfatiu provocat per les plantes, hem de conèixer els BVOCs. Els compostos orgànics volàtils biogènics, també anomenats COVBs (per les sigles en català) o BVOCs (per les sigles en anglès), fan possible el desenvolupament de la comunicació planta-pol·linitzador, la qual és essencial tant a la reproducció de les plantes com a l'alimentació dels propis pol·linitzadors. És la barreja de BVOCs emesos la que constitueix l'aroma de cada espècie de planta i que constitueix l'estímul olfatiu que aquesta emet.

Els *pollenizers* atreuen els pol·linitzadors emetent BVOCs, els quals aporten informació crucial, com per exemple l'espècie de la planta emissora o l'etapa de desenvolupament en la qual es troben [1]. Les emissions de BVOCs no només depenen de l'espècie de planta i de l'estació de l'any, sinó també d'altres factors resultants de canvis en el clima com les sequeres o l'ús agrari de la terra.

Tot i així, cal tenir en compte que el fet que un pol·linitzador es vegi suficientment estimulat per un *pollenizer* depèn no només de l'estímul en sí sinó també de la base genètica de l'insecte, que determina la seva memòria olfactiva. Hi ha espècies d'insectes que són especialistes i, per tant, es basen en les seves preferències olfactives innates. No tenen la capacitat d'establir noves associacions aroma-premi. És a dir, difícilment pol·linitzaran un *pollenizer* que per ells resulta desconegut i descobriran que els aporta el mateix premi (el nèctar, pol·len) que els *pollenizers* que d'alguna manera estan integrats al seu DNA. Les altres espècies d'insectes són generalistes, és a dir, tenen facilitat per establir noves associacions aroma-premi i no tenen cap d'aquestes dificultats.

6. Els nostres BVOCs

Els compostos orgànics volàtils biogènics són substàncies químiques alliberades per les plantes que contenen principalment carboni i també altres elements com hidrogen, oxigen, fluor, clor, brom, sofre o nitrogen. Es converteixen fàcilment en vapor o gas. Un gran grup de BVOCs són els terpenoides, els quals es classifiquen com metabòlits secundaris: compostos orgànics que no estan involucrats en el desenvolupament de les funcions primàries de les plantes (com la fotosíntesi o la reproducció). Estan constituïts per cadenes d'entre 5 i 15 carbonis de llargària, contenint un o més d'un enllaç doble entre ells; es classifiquen per tant com alquens.

Els terpenoides són lípids insaponificables i deriven biosintèticament d'unitats d'isoprè (2-metil-1,3-butadiè), el qual té com a fórmula molecular C_5H_8 . Per tant, la fórmula molecular bàsica dels terpenoides és múltiple de la fórmula de l'isoprè: $(C_5H_8)_n$, on n és el número d'unitats d'isoprè lligades. Es per això que es classifiquen com a isoprenoides. Aquestes unitats poden estar lligades estructurant cadenes linears o ajuntant anells. La classificació dels terpenoides

segons la seva estructura química es basa en el nombre d'unitats d'isoprè que aquesta tingui.

Els anomenats terpens també són hidrocarburs que resulten de la combinació d'unitats d'isoprè. És per això que alguns autors també utilitzen el terme de terpè per referir-se als terpenoides, però nosaltres seguirem la classificació que els separa en dos grups diferents. La diferenciació entre terpens i terpenoides es basa en què els terpenoides constitueixen terpens modificats als quals se'ls ha ressituat o eliminat els grups metil o se'ls ha afegit àtoms d'oxigen.

Les unitats d'isoprè que formen els terpenoides poden estar biosintetitzades per mitjà de dues vies metabòliques: la ruta de l'àcid mevalònic (MVA) o la ruta del 2-c-metil-D-eritritol 4-fosfat (DXP), la qual es va descobrir més tard al trobar que existia una alternativa independent de l'àcid mevalònic per biosintetitzar unitats d'isoprè a bacteris i plantes.

Els BVOCs presenten isomeria. Alguns dels isòmers dels quals parlarem són estructurals: s'han format a partir de la reagrupació d'enllaços. Veurem per exemple el cas de l' α -pinè i el β -pinè, els quals es diferencien per la posició d'un doble enllaç de carboni. En el cas dels enantiòmers la isomeria és òptica, és a dir, cadascun és la imatge especular i no superposable de l'altre. Aquest tipus d'isomeria s'anomena estereoisomeria. És el cas de l'R- α -pinè i l' S- α -pinè, per exemple.

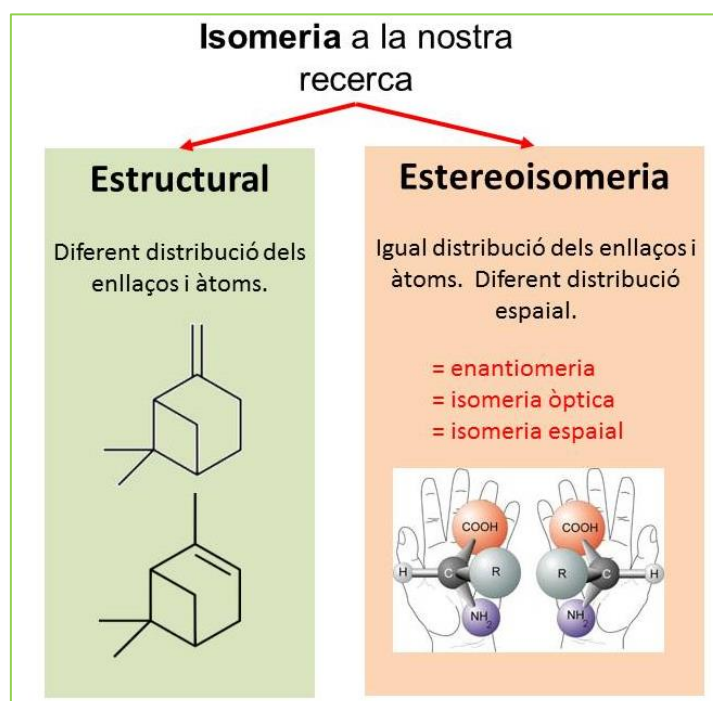


Figura 6. Esquema dels tipus d'isomeria a la nostra recerca.

Els terpenoides dels quals parlarem durant el nostre treball són 1R- α -pinè, D-limonè i 3-carè. El 1R- α -pinè és un monoterpè cíclic que conté un

ciclobutà a la seva estructura. És un dels isòmers estructurals del pinè (l'altre és el beta-pinè). Dins de l'isòmer alfa-pinè podem diferenciar dos enantiòmers: R-alfa-pinè (del qual parlarem) i S-alfa-pinè. A temperatura ambient constitueix un líquid incolor que es volatilitza fàcilment. És un compost molt present en els olis essencials de les coníferes, especialment en els pins.

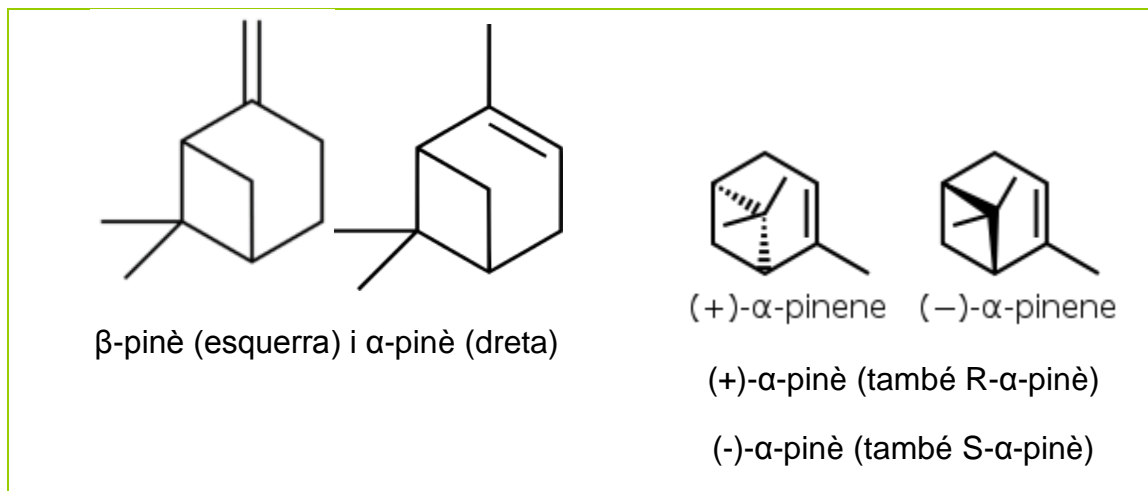


Figura 7. A l'esquerra: els dos isòmers del pinè (β -pinè i α -pinè). **Wikipedia.** A la dreta: els dos enantiòmers de l' α -pinè (R- α -pinè i S- α -pinè). **Wikipedia.**

El D-limonè és un monoterpenoide cíclic. Juntament amb el L-limonè és un dels enantiòmers del limonè. El D-limonè fa l'olor característica de la taronja i el L-limonè fa l'olor característica de la llimona. Constitueix un important dissolvent biodegradable i també un component aromàtic de caràcter cítric, ja que és la substància que aporta olor característica a les llimones i taronges. Tant el pinè com el limonè són els terpens més àmpliament distribuïts a la natura i representen un dels principals compostos orgànics volàtils emesos a l'atmosfera.

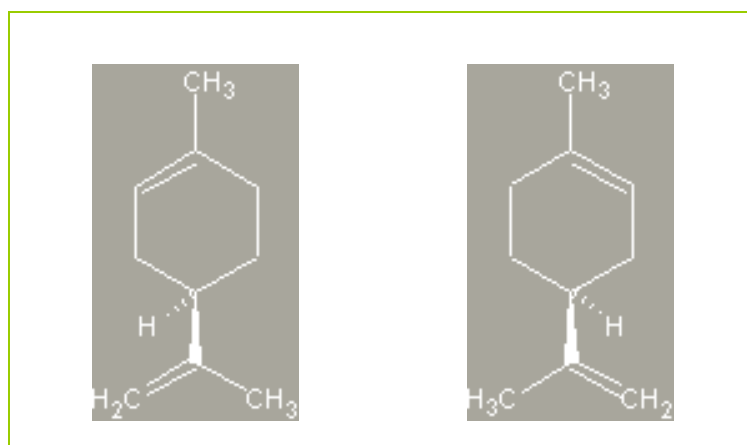


Figura 8. A l'esquerra: estructura química del D-limonè. **Quiminet.** A la dreta: estructura química del L-limonè. **Quiminet.**

El 3-carè és un monoterprenoide bicíclic. Presenta dos enantiòmers degut a que la seva estructura conté un carboni asimètric. Té una aroma afruitada i és present als olis essencials (substància química sintetitzada per una planta que dóna el seu aroma característic) de molts arbres i plantes com les coníferes i el gerd. És un dels principals components de la trementina, utilitzada fins al segle XIX com a preparat amb propietats curatives.

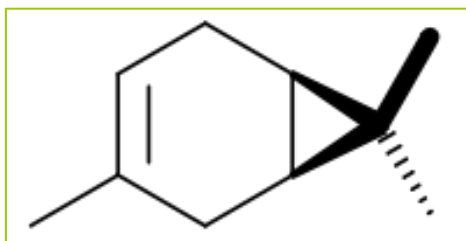


Figura 9. Estructura del 3-carè. **Wikipedia.**

7. El Canvi Climàtic i com influeix en els BVOCs

El canvi climàtic és una variació del clima del nostre planeta produït per l'activitat humana i que se suma a la seva variabilitat natural influint sobre els paràmetres climàtics de la temperatura, les precipitacions i la nuvolositat. És produït per l'augment de la quantitat de gasos amb efecte hivernacle presents a l'atmosfera. Aquests gasos en augment poden ser gasos que ja es trobaven (en menor quantitat) de forma natural o que s'han abocat de forma totalment artificial.

L'efecte hivernacle és un fenomen natural de l'atmosfera essencial per mantenir el planeta Terra a una temperatura ideal. Els gasos absorbeixen i emeten de nou els raigs infrarojos cap a l'interior de la terra, impedit que part dels raigs escapi i d'aquesta manera mantenint una certa calor interior necessària. Tot i així, si la quantitat de gasos és massa elevada la temperatura també ho serà, provocant un no desitjat i problemàtic escalfament global.

La temperatura és un dels factors abiòtics que més afecta l'emissió de volàtils. Els factors abiòtics són els que constitueixen les propietats fisico-químiques del medi (llum, temperatura, pH, quantitat d'oxigen, etc.). Per tant podem dir que el canvi climàtic influeix directament en els BVOCs emesos al ser el causant de l'augment de temperatura.

L'augment de calor causa un augment en la taxa total d'emissions florals ja que augmenta l'actuació dels enzims que participen en la biosíntesi dels volàtils i redueix la resistència dels canals d'emissió modificant algunes de les propietats dels BVOCs com la volatilitat (augmentant-la), la difusivitat (augmentant-la) i la solubilitat (disminuint-la). La volatilitat és la tendència que té una substància a passar a la fase de vapor; si augmenta, per tant, la taxa total de volàtil serà major. La difusivitat o coeficient de difusió presenta la facilitat amb la que un

solut es mou en un solvent; si augmenta, per tant, el transport del volàtil serà més ràpid i la taxa també pujarà. La solubilitat és la capacitat que té un solut de dissoldre's en un solvent, és a dir, el contrari de la difusivitat. Si la solubilitat disminueix podem dir de nou que el transport del volàtil serà més ràpid i per tant la taxa continuarà augmentant.

Els factors abiòtics, però, afecten de manera diferent cadascun dels BVOCs degut a les seves propietats químiques pròpies. Això vol dir que dins d'un mateix augment de temperatura els diferents volàtils augmentaran les taxes d'emissió amb proporcions distintes. D'aquesta manera, el nou aroma d'una mateixa planta no serà només més intens sinó diferent.

Aquests fenòmens d'augment i canvi de proporció es poden veure reflectits a l'article *Changes in floral bouquets from compound-specific responses to increasing temperatures*. Explica un experiment on els BVOCs emesos per diverses espècies de plantes als períodes de màxim floreixement s'analitzen sota diferents temperatures. Les emissions de totes les espècies varien notablement a mesura que la temperatura va augmentant.

D'aquesta manera, amb algunes espècies podem establir una diferència entre els COBV emesos actualment (els quals anomenarem components actuals) i els COBV que, degut a un augment de temperatura, apareixeran o s'emetraran en més quantitat (els quals anomenarem components predits). Observant la Figura 10 veiem el patró d'augment en la taxa d'emissió de volàtils, que es produeix de forma diferent a cadascun d'ells. Observant la Figura 11 podem entendre el fenomen esmentat prèviament de que no només es produeix un patró d'augment de la taxa d'emissió, sinó també un patró de canvi en la proporció dels volàtils emesos.

Cal tenir en compte que als resultats de la Figura 10 s'observa que la taxa total d'emissió no augmenta infinitament si la temperatura continua augmentant. Podem observar com algunes espècies presenten una disminució de l'emissió d'alguns dels seus volàtils (com en el cas del terpè 1R-a-pinè a *Spartium junceum*). Observem que això està relacionat amb el conjunt espècie i no amb el volàtil en sí, ja que aquest mateix volàtil 1R-a-pinè continua augmentant a major temperatura a altres espècies de planta com *Sonchus tenerrimus* o *Dittrichia viscosa*.

És important entendre que a la Figura 11 es presenta la proporció de volàtil. Per tant, pot ser que un volàtil que disminueixi la seva presència al gràfic realment no hagi disminuït en quantitat, sinó que la resta de volàtils hagin augmentat en gran mesura i hagin, per tant, reduït el percentatge dels altres volàtils.

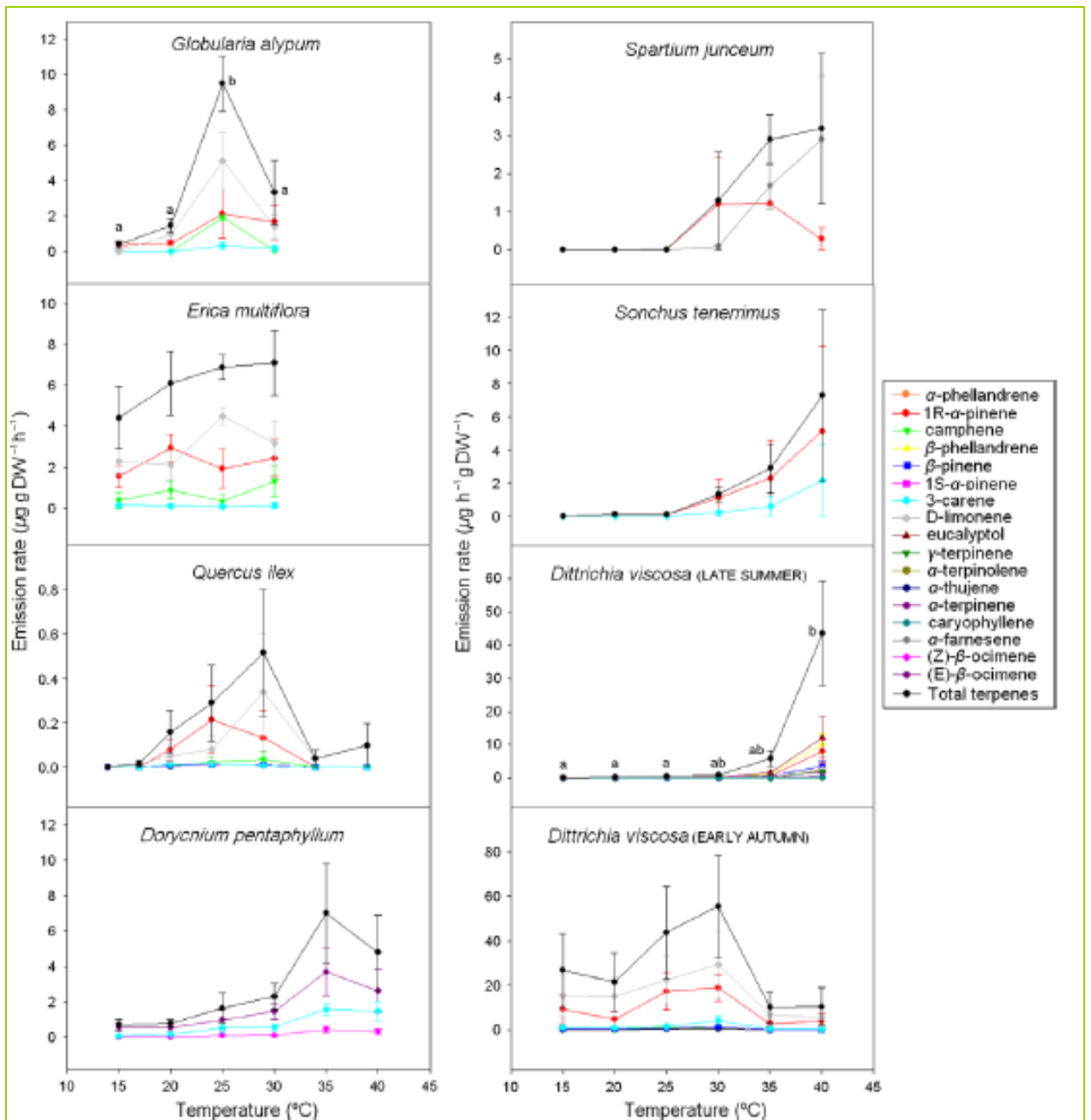


Figura 10. Proporcions (eix y = taxa d'emissió; eix x = temperatura) de les taxes dels diferents BVOCs emesos dins del total de cada espècie de planta sota un gradient de temperatura de 15-40°C. Farré-Armengol G. (2014) **Changes in floral bouquets from compound-specific responses to increasing temperatures.** *Global Change Biology* (2014), doi: 10.1111/gcb.12628.

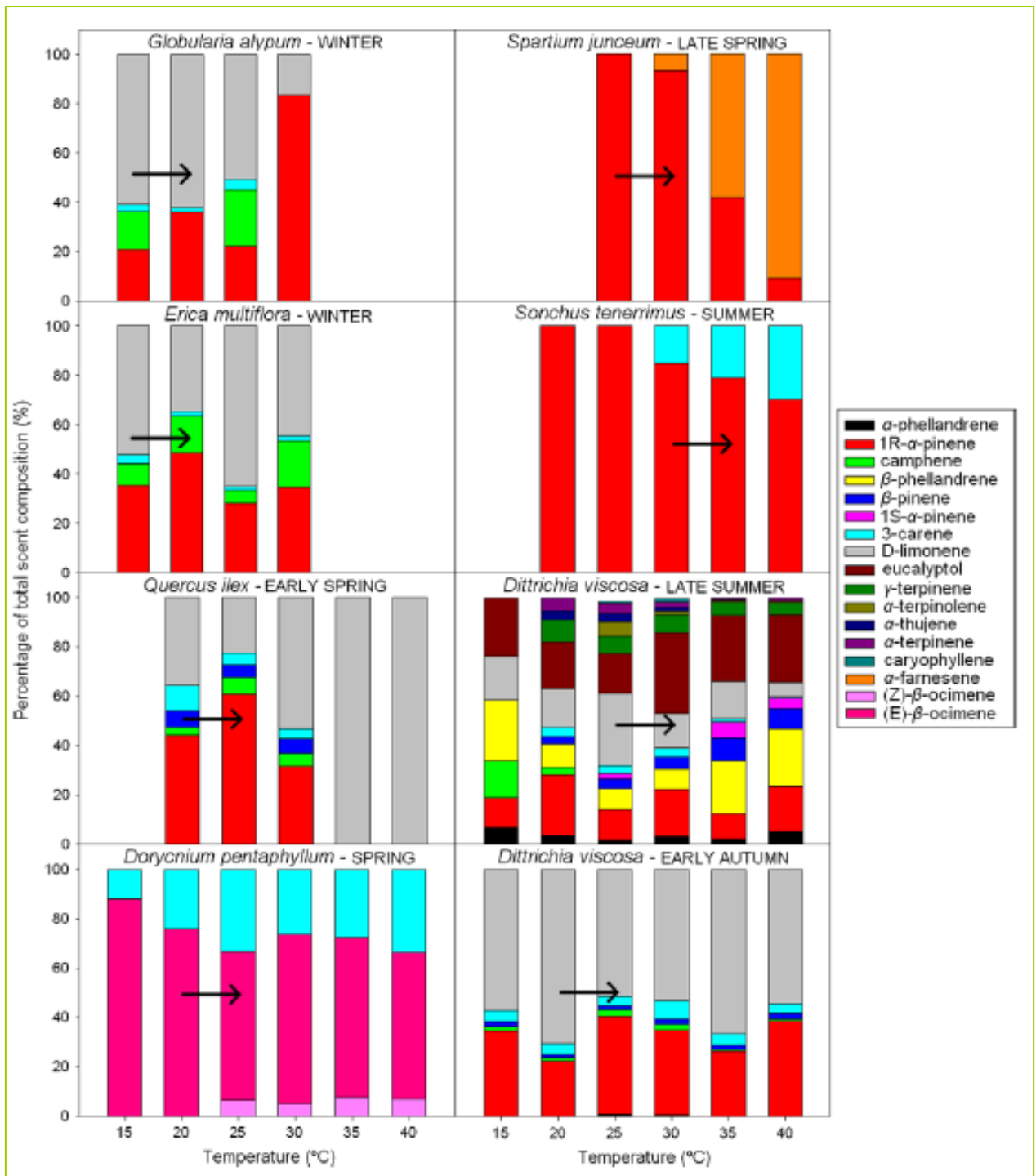


Figura 11. Proporció (eix y = percentatge dins l'emissió total; eix x = temperatura) dels volàtils procedents de flors de set espècies mediterrànies sota un gradient de temperatura de 15-40°C. Farré-Armengol G. (2014) Changes in floral bouquets from compound-specific responses to increasing temperatures. *Global Change Biology* (2014), doi: 10.1111/gcb.12628.

Altres components relacionats amb el canvi climàtic també influeixen en l'emissió de BVOCs, com les sequeres o els nutrients disponibles. A recerques prèvies s'ha demostrat que algunes espècies de plantes responen augmentant les seves taxes d'emissió davant les sequeres moderades i reduint-les davant les sequeres severes. Tot i així, les respostes a la falta d'aigua depenen dels BVOCs estudiats i això suposa una gran dificultat per preveure-les. L'augment de disponibilitat de nutrients suposa un augment proporcional en les taxes d'emissió. Aquest fenomen s'ha pogut estudiar degut a l'augment en l'eutrofització (concentració d'aliment o matèria orgànica) dels ecosistemes durant les últimes dècades.

8. Els volàtils actuals i els volàtils predits

Per tal de comparar les reaccions de la nostra mosca (*Episyrphus balteatus*) davant els estímuls produïts per volàtils actuals i volàtils predits primer hem de classificar els nostres BVOCs. Ho farem de forma independent a cada planta.

En el cas de les emissions de *Globularia alypum* durant el seu període de floreixement (hivern) s'observa una substitució parcial del monoterpenoide D-limonè pel monoterpenoide 1R-alfa-pinè. Per tant, el BVOC actual és el D-limonè i el BVOC predit és el 1R-alfa-pinè, que augmenta.

A les emissions de *Sonchus tenerrimus* durant el seu període de floreixement (estiu) s'observa l'aparició del monoterpenoide 3-carè. Per tant, el BVOC actual és el 1R-alfa-pinè i el predit el 3-carè, que apareix.

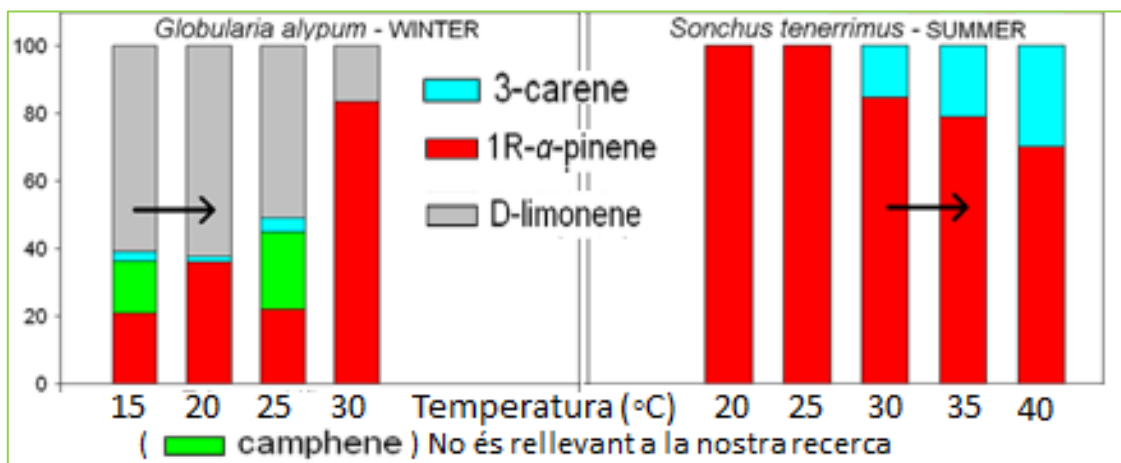


Figura 12. Proporció (eix y = percentatge dins l'emissió total; eix x = temperatura) dels volàtils emesos a les espècies *Globularia alypum* i *Sonchus tenerrimus* sota un gradient de temperatura de 15-40°C. Farré-Armengol G. (2014) **Changes in floral bouquets from compound-specific responses to increasing temperatures.** *Global Change Biology* (2014), doi: 10.1111/gcb.12628.

El fet que un mateix compost (1R-alfa-pinè) correspongui al compost actual en una espècie de planta i al compost predit en una altra és degut a l'anàlisi de l'emissió de BVOCs que es duu a terme al gràfic (Figura 11, Figura 12) es fa de

forma proporcional (tal i com s'ha explicat prèviament). Això vol dir que potser a ambdues espècies la quantitat de 1R-alfa-pinè és la mateixa, però que degut a la quantitat tan diferent dels altres volàtils fa que les proporcions siguin molt baixes en un cas i molt altes en un altre. A més, com s'ha esmentat anteriorment, l'emissió dels volàtils està relacionada amb el conjunt espècie. Per tant l'efecte que té la temperatura en el BVOC no és independent i no podem establir fàcilment un patró.

3. Materials i mètodes

1. Disseny experimental

Per dur a terme la nostra recerca vam introduir els pol·linitzadors en un cubiculum on rebien l'estímul olfatiu de dos compostos volàtils diferents, contrastant d'aquesta manera la reacció cap a un compost actual i cap a un compost predit. Vam determinar com a ronda el període de 10 minuts en què el pol·linitzador es trobava en contacte amb els BVOCs, els quals s'emetien des d'una font de compost (de les quals en teníem dos tipus). En els casos en què l'activitat de les mosques era alta vam allargar el temps de les rondes.

Vam fer comparacions entre les reaccions de les mosques als compostos 3-carè i 1R- α -pinè (en el cas de l'espècie de planta *Sonchus tenerrimus*) i entre D-limonè i 1R- α -pinè (en el cas de l'espècie de planta *Globularia alypum*). Vam definir el terme de reacció com el temps transcorregut en una de les anomenades estructures de compost, el qual vam registrar a cada ronda amb l'ajuda de dos *timers*. En el cas de les rondes amb els compostos D-limonè i 1R- α -pinè també vam tenir en compte el nombre de visites a cada compost.

També vam anotar observacions que vam considerar rellevants, com el temps de *grooming* (temps en què l'insecte es neteja) i el desinterès cap a les estructures d'emissió de compost. Aquesta informació va ser essencial per la determinació de les variables i la metodologia de l'experiment.

Els insectes utilitzats per l'experiment van ser femelles adultes de l'espècie de mosca *Episyrphus balteatus*, les quals havien nascut i crescut en un laboratori amb previsions de beguda i menjar basades en aigua, pol·len i una dissolució mel-aigua de concentració 1:1. Vam utilitzar tant mosques alimentades com mosques amb un previ període de dejuni (21 hores, 6.5 hores, 5 hores i 4 hores).

El cubiculum utilitzat era transparent (BugDorm-4030 Insect Rearing Cage (32.5x32.5x32.5 cm)). Dins d'aquest vam distribuir dues fonts de compost (una pel BVOC actual i l'altra pel BVOC predit) simètricament. Era des de les fonts de compost des d'on s'emetien els volàtils. Els compostos utilitzats van ser 3-carè (115576 de Sigma-Aldrich), 1R-alfa-pinè (115576 de Sigma-Aldrich) i D-limonè (183164 de Sigma-Aldrich). Les estructures de les fonts de compost es van preparar de dues maneres diferents. En una mateixa ronda eren les mateixes ja que no volíem que constituïssin una variable de l'experiment. Independentment del tipus d'estructura utilitzat a totes les rondes vam col·locar al centre del cubiculum una càpsula de Petri que contenia cotó amb aigua.

La preparació de l'estructura 1 consistia en posar 10µl d'una dissolució de compost-parafina de concentració 1:10 o 1:100 dins d'una microcàpsula per compost. Cada microcàpsula estava localitzada en una càpsula de Petri, la qual vam posar a sobre d'un tros de paper groc amb l'objectiu d'atreure les mosques. Tot i així finalment vam decidir no considerar-lo com a estímul visual ja que en comparació amb el de l'estructura 2 (la veurem a continuació) no influenciava els insectes.

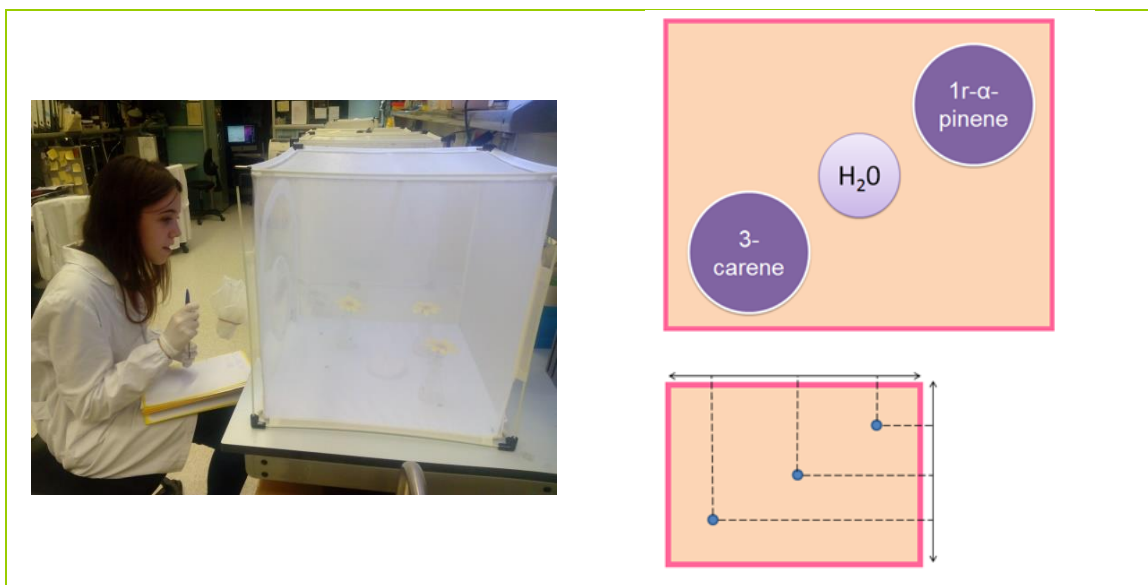


Figura 13. A l'esquerra: Fotografia del cubiculum transparent. A la dreta: disposició simètrica diagonal de les fonts de compost en el cas d'ambdues estructures (vam distribuir tant les càpsules de Petri com les flors falses d'aquesta manera). Al centre una càpsula de Petri amb aigua.

El disseny de l'estructura 2 va ser com a conseqüència de la baixa resposta de les mosques envers l'estructura de compost 1. Per preparar-la vam dissenyar una estructura de flor groga falsa. Aquest disseny consistia d'una flor groga de paper impresa enganxada a la part superior d'un tub Falcon de 15 ml, localitzat dins un matràs Erlenmeyer de 50 ml com a suport. Vam posar 10µl de la mateixa dissolució amb concentració 1:10 (compost: oli de parafina) a la superfície de la flor utilitzant anells de reforç amb l'objectiu que el compost no es dispersés.

A la ronda de test cromàtic vam canviar el color de la flor de paper de l'estructura 2. En aquesta ronda vam utilitzar tres fonts de compost (tipus 2), cadascuna d'elles amb una flor falsa d'un color diferent (groc, lila i blanc).

Considerem molt important la manera com es presenta el volàtil a l'estructura de font de compost. A l'estructura 1 el volàtil es troba tancat dins la microcàpsula i a l'estructura 2 es troba lliure. Vam pensar que per tant això

podria influir en els resultats i constituir una variable, tenint en compte que l'alliberació de l'aroma és en teoria més senzilla a l'estructura 2.

A algunes rondes vam sotmetre les mosques a estímuls addicionals, els quals suposadament les atreuen fortament: pol·len, una dissolució mel-aigua de concentració 1:1 i la feromona α -farnesene. Ho vam fer amb l'objectiu de promoure la seva activitat i de comprovar que tenien un correcte sentit de l'olfacte, del qual vam començar a dubtar com a conseqüència de la seva baixa resposta. Vam col·locar aquestes substàncies substituint els compostos a l'estructura 2.

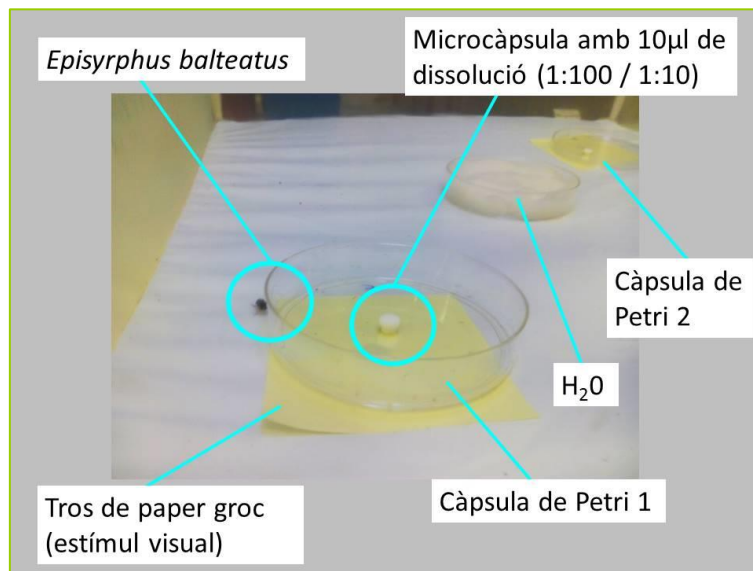


Figura 14. Fotografia i anàlisi de l'estructura 1.

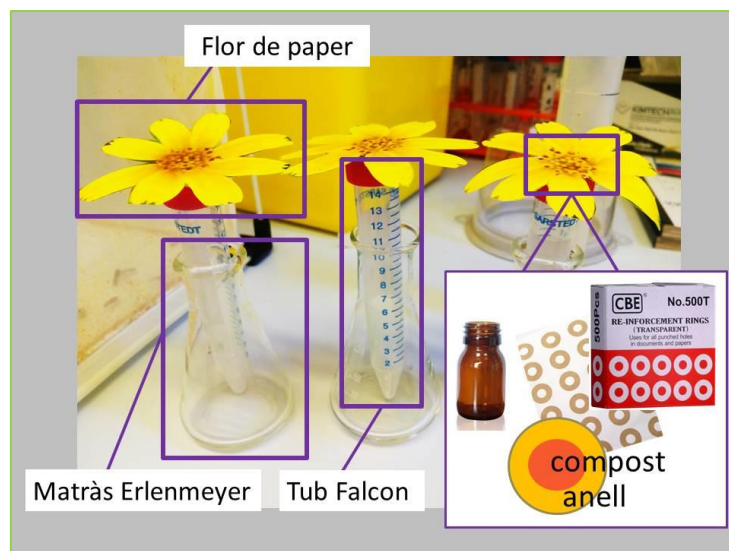


Figura 15. Fotografia i anàlisi de l'estructura 2.

2. Esquema general de la metodologia experimental

A continuació es presenta un esquema general de la metodologia experimental de la nostra recerca. Relaciona gràficament els fets que van induir a determinar les variables de l'experiment (presentades en color taronja) i els objectes principals d'estudi i d'estadística dins la recerca i discussió (presentats en color lila). Els següents apartats de *Materials i Mètodes* estan dedicats a l'explicació de la motivació de tots els experiments i estadístiques que vam realitzar. Es pot establir una relació amb l'esquema des del redactat gràcies a la numeració (veiem que inclou l'apartat número 3 i els subapartats de l'apartat 4).

La determinació d'algunes variables (concentració, estímuls addicionals i estructura de compost) la vam dur a terme a partir dels resultats obtinguts al nostre experiment preliminar, el qual ens va donar informació sobre la concentració de dissolució adequada, l'estructura de compost més atractiva i la possible utilització d'estímuls addicionals, amb els quals vam estar experimentant.

La variable del color, el dejuni, els compostos i la llum artificial van estar en gran part determinades pels descobriments de recerca científica prèvia amb la qual ens vam documentar. Tot i així, les variables del color i el dejuni van resultar dinàmiques dins el contacte amb els dípters, ja que van jugar un paper molt important en el nostre dia a dia al laboratori.

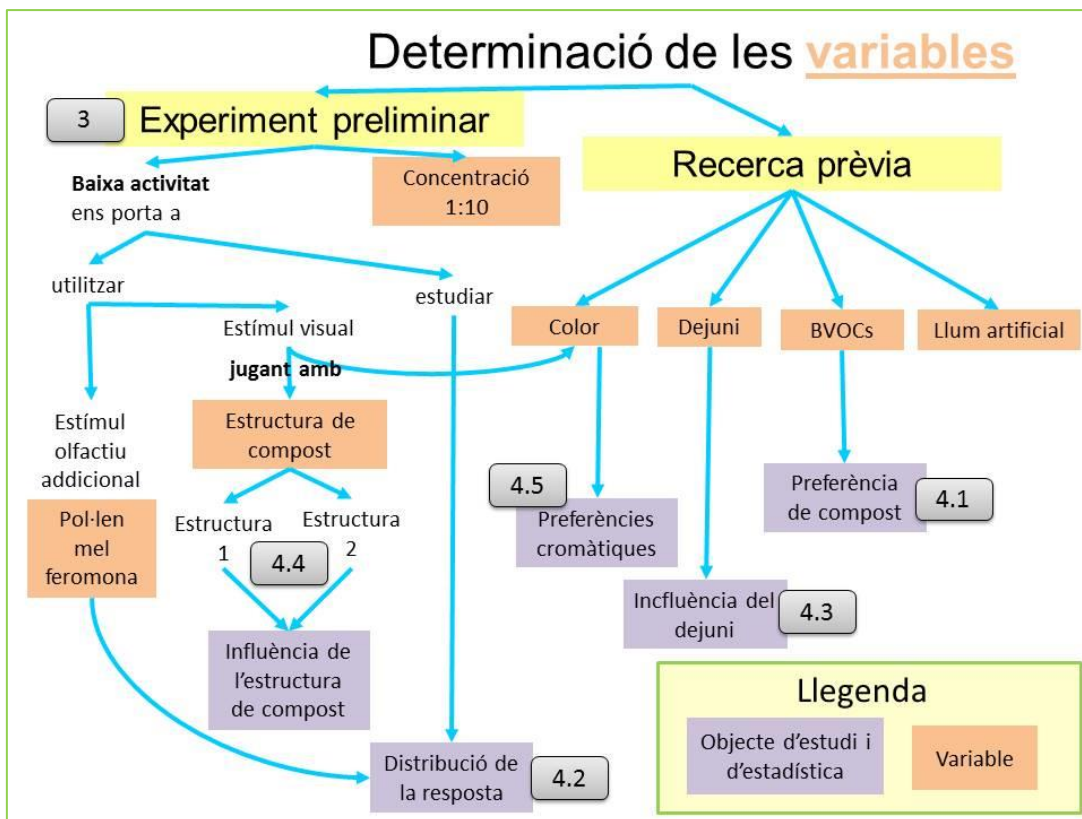


Figura 16. Esquema general dels experiments de la nostra recerca. Veure redactat per ampliar.

3. Rondes preliminars

Amb l'objectiu d'estudiar les millors condicions per fer l'experiment vam dissenyar un experiment preliminar de sis rondes amb diferents variables, basat en la comparació de les reaccions de les mosques davant els compostos 3-carè (compost predit) i 1R- α -pinè (compost actual). Aquestes rondes preliminars van ser essencials en la determinació dels mètodes i variables utilitzats durant la nostra recerca.

A les rondes 1 i 2 vam utilitzar mosques alimentades, absència de llum artificial i una dissolució de concentració 1:100 (oli de parafina-compost). A les rondes 3 i 4 vam utilitzar mosques amb període de dejuni i llum artificial, però vam continuar amb la mateixa concentració. Finalment, a les rondes 5 i 6 vam pujar la concentració de compost a 1:10.

Degut a què els resultats d'aquestes rondes van servir per dirigir la metodologia del nostre treball, els presentarem en aquest apartat (Figura 17, Taula 1). Els percentatges d'activitat a les dues rondes finals van augmentar del 0% a l'1% (1R- α -pinè) i del 0% al 5% (3-carè). Sota la mateixa baixa concentració (1:100) el dejuni i la llum artificial no van influenciar l'activitat dels pol·linitzador, sent 0% tots els percentatges a les primeres quatre rondes.

En aquestes rondes la dissolució de concentració alta (1:10) semblava atreure amb més intensitat les mosques en comparació amb la dissolució de concentració baixa. És per això que vam decidir adoptar-la com a dissolució estàndard de l'experiment. Tot i que sota una mateixa baixa concentració no vam apreciar la influència del dejuni o de la llum artificial, vam prendre una decisió basant-nos en recerca prèvia. D'aquesta manera, vam decidir que utilitzaríem un estímul lumínic artificial (làmpara) i que sotmetríem les mosques a un període de dejuni.

Això últim va ser degut a què segons estudis anteriors la resposta olfactiva dels dípters és modulada pel dejuni i decau al no haver-lo patit (Figura 18). Així doncs vam adoptar el dejuni com a variable de l'experiment intentant induir una major activitat de les mosques mitjançant quatre diferents períodes de dejuni (21, 6.5, 5 i 4 hores) a les futures rondes experimentals.

També degut a les observacions de la baixa activitat de les mosques durant l'experiment preliminar i algunes rondes experimentals, vam decidir canviar l'estructura de compost i crear la número 2, amb un major estímul visual i una diferent manera de presentar el volàtil (explicada a l'apartat de disseny experimental).

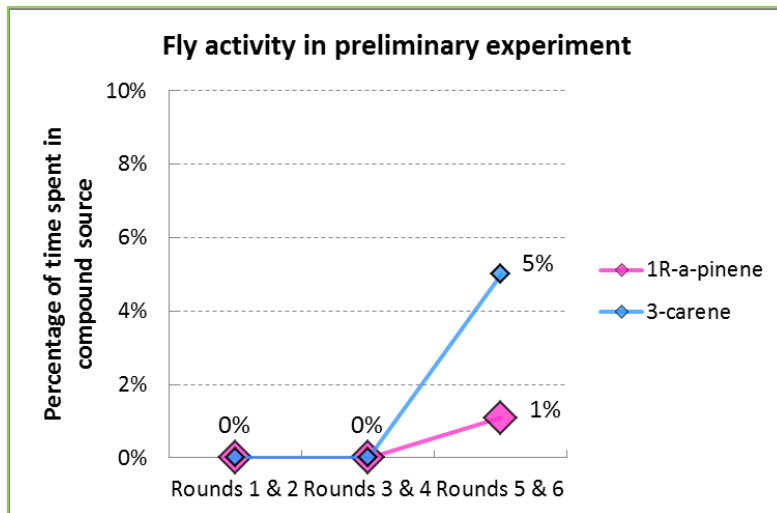


Figura 17. Canvis a l'activitat de les mosques com a conseqüència de la variació de llum, període de dejuni i concentració de dissolució a les rondes preliminars. Eix x: Rondes. Eix y: percentatge del temps total d'observació en què les mosques es trobaven a la font de compost.

Rounds	1 & 2	3 & 4	5 & 6
Starvation	No	Yes ⁽¹⁾	Yes ⁽¹⁾
Light	No	Yes	Yes
Dilution	1:100	1:100	1:10
Observation time (s)	1200	1200	2100
1R-a-pinene time (s)	0	0	23
3-carene time (s)	0	0	105
% activity (1R-a-pinene)	0%	0%	1%
% activity (3-carene)	0%	0%	5%

⁽¹⁾20 hours of base starvation period

In **blue**: changed variables

Taula 1. Variables i resultats de l'experiment preliminar.

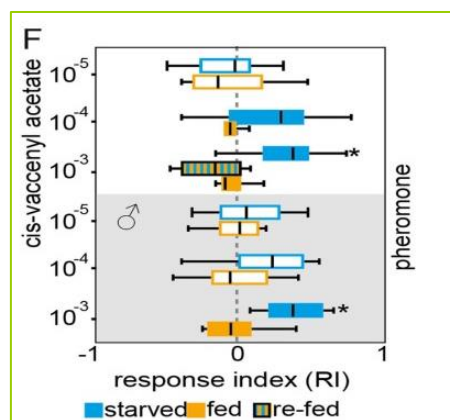


Figura 18. Gràfic que demostra que les mosques que han patit un període de dejuni (starved) són més receptives que les mosques alimentades (fed). Farhan & Gulati, 2013. <http://www.nature.com/srep/2013/130926/srep02765/full/srep02765.html>

4. Rondes experimentals

A continuació parlarem de la metodologia individual de cadascun dels experiments o de les estadístiques que vam fer. Per tal d'estudiar diferents aspectes de les mosques vam jugar amb les mateixes dades, les quals estan presentades en una mateixa taula de forma global, mitjançant tractaments estadístics diferents. En aquest apartat expliquem aquests tractaments de la informació amb detall per tal de justificar la motivació dels càlculs i dels gràfics fets, essent essencials per arribar a les conclusions de l'apartat de *Resultats i Discussió*.

4.1. Preferència de compost

L'experiment principal de la nostra recerca es basa en la comparació del comportament de les mosques davant els compostos predits i els actuals. Amb l'objectiu de veure si els nostres dípters tenien preferència per algun dels dos tipus de volàtils, vam fer comparacions entre les reaccions davant els terpenoides 3-carè i 1R- α -pinè (compostos de les emissions de *Sonchus tenerrimus*) i també davant els terpenoides D-limonè i 1R- α -pinè (compostos de les emissions de *Globularia alypum*). Per fer-ho vam mesurar el temps que les mosques van estar a cada font de compost.

La variable independent en aquest experiment va ser el compost utilitzat, sempre emès des de la mateixa estructura de compost (o la 1 o la 2), per tal de no influir en el comportament de la mosca. Durant l'experiment vam canviar algunes variables de control (com per exemple el període de dejuni, la presència de pol·len, l'estructura de compost, etc.), però sempre afectant de manera equànime les fonts de compost d'una mateixa ronda amb l'objectiu de no induir preferències en els pol·linitzadors cap a un compost.

4.2. Distribució de la resposta

Durant totes les rondes la resposta de les mosques als estímuls olfactivs va ser considerablement baixa. Per tant, vam decidir estudiar estadísticament si hi havia alguna tendència dins la seva indiferència. Per fer-ho, vam utilitzar les dades de totes les rondes per comparar el temps en què les mosques havien respost als estímuls olfactivs dels compostos amb el temps en què no havien reaccionat a cap d'ells. Dins el temps de resposta, per tant, estem incloent única i exclusivament el temps de resposta als BVOCs.

Amb l'objectiu de mesurar el temps en què les mosques van respondre a estímuls olfactivs en general (és a dir, no només tenint en compte el temps de resposta als BVOCs) vam fer una altra estadística incloent el temps en què responien als estímuls addicionals (pol·len, mel, feromona, etc.). Per tant, dins

el temps de resposta nul·la s'inclou únicament el temps en què les mosques estaven ignorant qualsevol dels estímuls olfactius als quals estaven sotmeses. De la mateixa manera, podem dir que dins el temps de resposta s'inclou el temps de reacció a qualsevol estímul olfactiu.

A l'última estadística explicada no podem veure realment la influència individual dels estímuls olfactius addicionals (pol·len, mel, feromona) perquè les rondes en què els vam utilitzar representen un percentatge molt petit. Sabent això vam fer una altra estadística estudiant només les dades de les rondes amb pol·len, les quals eren comparacions carè-pinè.

4.3. Influència del dejuni

La documentació sobre recerca prèvia va ser essencial per saber que les mosques amb període de dejuni presenten respostes més altes que les mosques alimentades, però també volíem saber si la quantitat d'hores de dejuni influeix. Vam establir quatre períodes de dejuni diferents i vam comparar la resposta de les mosques a cadascun d'ells. Per fer-ho vam utilitzar les dades de totes les comparacions carè-pinè i limonè-pinè. Les variables de control varien entre les rondes tingudes en compte i per tant els resultats podrien estar influenciats per variables no relacionades amb el dejuni. Tot i així, vam pensar que seria interessant veure la tendència als resultats obtinguts als diferents períodes de dejuni.

4.4. Influència del tipus d'estructura de compost

Les estructures de compost 1 i 2 eren molt diferents. L'estímul visual a l'estructura 1 semblava no atreure altament els pol·linitzadors degut a què era únicament un tros groc de paper sota la càpsula de Petri. A més, el compost s'emetia des d'una microcàpsula i per tant feia més difícil la seva expansió pel cubiculum. L'estructura 2 es basava en un estímul visual més atractiu i el compost no es trobava dins cap càpsula i per tant tenia més fàcil expandir-se pel cubiculum. Degut a les notables diferències entre l'estructura 1 i 2 vam decidir estudiar si hi havia cap tendència al comportament de les mosques influenciada pel tipus d'estructura de compost utilitzada.

Per fer-ho vam utilitzar totes les dades de les comparacions carè-pinè i limonè-pinè. Algunes variables de control varien entre les rondes tingudes en compte i per tant els resultats podrien estar influenciats per variables no relacionades al tipus d'estructura de compost. Tot i així, vam pensar que seria interessant veure la tendència als resultats obtinguts amb ambdues maneres de presentar els volàtils. No vam tenir en compte les rondes amb estímuls olfactoris addicionals, ja que el pol·len atreu altament les mosques i només el vam

utilitzar amb una de les estructures de compost (la 2). Això hauria fet que el percentatge de resposta amb l'estructura 2 hagués estat falsament més alt.

4.5. Preferències cromàtiques

Degut al fet que recerques prèvies mostren que els colors atractius pels pol·linitzadors són el groc en primer lloc, el blau i el violeta en segon lloc i el blanc en alguns casos minoritaris, vam decidir dur a terme un test cromàtic amb les nostres mosques. Vam col·locar tres flors falses (seguint el model de l'estructura de compost 2) de tres colors diferents (groc, violeta i blanc) dins el cubículum. Sobre cada flor vam posar pol·len, promovent d'aquesta manera l'esmentada anteriorment *colour-reward association* (les mosques associen el color amb el premi del nèctar). Vam tenir en compte el temps que les mosques passaven a cada flor.



Figura 19. Fotografia de l'estructura 2 al test cromàtic.

5. Enregistrament de resultats

Totes les dades es van recollir en el software especialitzat en bases de dades Microsoft Excel 2010, tenint en compte els temps enregistrats i totes les variables de cadascuna de les rondes.

A continuació presentem l'enregistrament de les dades de totes les rondes que vam dur a terme. Conté la metodologia de cadascuna, indicant detalladament el tractament de totes les variables.

	Round	Type	Starvation	C. Dillution	Light	Visual stimulus	Pollen	Honey
Day 1	1	pre	No	1:100	No	No	No	No
	2		No	1:100	No	No	No	No
Day 2	1	pre	21h	1:100	Yes	No	No	No
	2		21h	1:100	Yes	No	No	No
	3	exp	21h	1:10	Yes	No	No	No
	4	exp	21h	1:10	Yes	No	No	No
	5	exp	21h	1:10	Yes	No	No	No
	6	exp	21h	1:10	Yes	No	No	No
	7	exp	21h	1:10	Yes	No	No	No
	8	exp	21h	1:10	Yes	No	No	No
	9	exp	21h	1:10	Yes	No	No	No
	10	exp	21h	1:10	Yes	No	Yes	Yes
	11	exp	21h	1:10	Yes	No	Yes	No
	12	exp	21h	1:10	Yes	Yes	No	No
Day 3	1	exp	20h30'	1:10	Yes	Yes	No	No
	2	exp	No	1:10	Yes	Yes	No	No
	3	exp	20h30'	1:10	Yes	Yes	No	No
	4	exp	20h30'	1:10	Yes	Yes	No	No
	5	exp	20h30'	1:10	Yes	Yes	Yes	No
	5	exp	20h30'	1:10	Yes	Yes	Yes	No
	5	exp	20h30'	1:10	Yes	Yes	Yes	No
	5	exp	20h30'	1:10	Yes	Yes	Yes	No
	5	exp	20h30'	1:10	Yes	Yes	Yes	No
	5	exp	20h30'	1:10	Yes	Yes	Yes	No
Day 4	1,2	exp	5h	1:10	Yes	Yes	No	No
	3,4,5	exp	5h	1:10	Yes	Yes	No	Yes
	6	exp	5h	1:10	Yes	Yes	Yes	Yes
Day 5	1	exp	3h43'	1:10	Yes	Yes	No	No
	2	exp	3h43'	1:10	Yes	Yes	No	No
	3	exp	4h27'	1:10	Yes	Yes	No	No
	4	exp	4h27'	1:10	Yes	Yes	No	No
	5	exp	4h27'	1:10	Yes	Yes	No	No
	6	exp	5h13'	1:10	Yes	Yes	Yes	Yes
Day 6	1	exp	3h30min	1:10	Yes	Yes	No	No
	2	exp	3h30min	1:10	Yes	Yes	No	No
	3	exp	6h30min	1:10	Yes	Yes	No	No
	4	exp	6h30min	1:10	Yes	Yes	No	No
	5	exp	6h30min	1:10	Yes	Yes	No	No

Figura 20. D'esquerra a dreta: dia de l'experiment, número de la ronda, tipus de ronda (preliminar o experimental), hores del període de dejuni, concentració de la dissolució del compost, ús de llum addicional, ús d'estímul visual (variable relacionada amb el tipus d'estructura de font de compost), addició de pol·len i addició de mel. Les cel·les de l'experiment preliminar són de color gris. Les cel·les que indiquen addició d'altre estímul són de color blau. El text vermell indica un canvi de variable no planejat. Les cel·les liles indiquen els períodes de dejuni nuls a les rondes experimentals.

Pheromone	Comp. Capsule	Time (minutes)	Current C (10µl)	Predicted C (10µl)
No	Yes	10	1R-α-pinene	3-carene
No	Yes	10	1R-α-pinene	3-carene
No	Yes	10	1R-α-pinene	3-carene
No	Yes	10	1R-α-pinene	3-carene
No	Yes	10	1R-α-pinene	3-carene
No	Yes	15	1R-α-pinene	3-carene
No	Yes	10	1R-α-pinene	3-carene
No	Yes	10	1R-α-pinene	3-carene
No	Yes	10	1R-α-pinene	3-carene
No	Yes	10	1R-α-pinene	3-carene
Yes	Yes	10	1R-α-pinene	3-carene
No	Yes	10	None	None
Yes	Yes	10	1R-α-pinene	3-carene
No	Yes	10	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	20	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	10	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	20	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	10	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	10	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	5	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	5	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	5	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	5	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	5	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	20	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	30	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	10	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	10	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	10	D-limonene	1R-α-pinene
No	No (sticker)	10	D-limonene	1R-α-pinene
No	No (sticker)	10	D-limonene	1R-α-pinene
No	No (sticker)	12	D-limonene	1R-α-pinene
No	No (sticker)	15	D-limonene	1R-α-pinene
No	No (sticker)	10	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	10	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	10	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	10	1R-α-pinene	3-carene
No	No (sticker)	10	1R-α-pinene	3-carene

Figura 21. D'esquerra a dreta: addició de feromona, ús de càpsula per alliberar el component, duració de cada ronda, compost actual utilitzats i compost predit utilitzat. Les cel·les de l'experiment preliminar són de color gris. Les cel·les que indiquen addició d'un altre estímul són de color blau.

4. Resultats i Discussió

1. Preferència de compost

A les comparacions entre les reaccions als compostos 3-carè i 1R-alfa-pinè vam observar que del temps en què les mosques es trobaven visitant una estructura de compost, el 64% era responent a l'estímul del 3-carè i el 36% al del 1R- α -pinè (Figura 22). Com s'explica al següent apartat dels resultats, s'ha de tenir en compte que aproximadament només el 10% del temps total d'observació les mosques es trobaven visitant una estructura de compost.

Paral·lelament, a les comparacions entre les reaccions al D-limonè i al 1R-alfa-pinè, el 100% de les respostes als compostos van ser al D-limonè, d'aquesta manera tenint el pinè un 0% de les respostes. Tot i així, s'ha de tenir en compte que durant les cinc rondes on el limonè va ser utilitzats només va haver una visita als compostos, la qual va suposar el 100% de les visites al D-limonè. Aquest és el motiu pel qual hem considerat innecessari fer un gràfic per la comparació limonè-pinè.

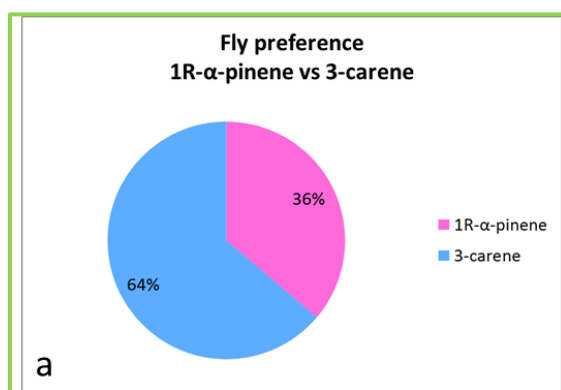


Figura 22. Percentatge de resposta als compostos dins el temps en què les mosques estaven visitant un compost. Hem inclòs la comparativa pinè-carè. No hem inclòs la comparativa limonè-pinè perquè només va haver una visita en totes les rondes (cinc).

Els nostres resultats mostren una preferència pel compost 3-carè (compost futur) a les comparacions pinè-carè (compostos de l'espècie *Sonchus tenerrimus*), com es pot veure a la Figura 22. A les comparacions pinè-limonè no podem concloure cap preferència perquè només una mosca va respondre a l'estímul olfatori dels compostos, anant a la flor falsa de limonè i quedant-se allà durant 334 segons. A més, aquesta mosca no semblava interessada pel compost, ja que va romandre tota l'estona practicant el *grooming* (netejan-se). D'aquesta manera, podem afirmar que no es presenten resultats suficientment contrastables com per arribar a una conclusió ferma de la preferència per un dels dos compostos utilitzats de l'espècie de planta *Globularia alypum*.

2. Distribució de la resposta

A les comparacions pinè-carè el percentatge d'indiferència envers els compostos va ser del 89% mentre que a les comparacions pinè-limonè del 90%. Els gràfics 23a i 23b mostren el percentatge de temps de resposta als compostos en relació al temps total d'observació.

Cal tenir en compte que als gràfics 23a i 23b l'àrea de "Sense resposta als compostos" inclou tant el temps en què les mosques estaven inactives com el temps en què van respondre als estímuls addicionals (pol·len, mel o feromona). Aquests gràfics es van fer amb l'objectiu de mesurar el temps de resposta als compostos, els quals són l'objecte principal d'aquesta recerca.

Tenint en compte totes les rondes les mosques van respondre a estímuls olfactivs (de forma general, és a dir, incloent els addicionals) durant el 16% del temps total d'observació. D'aquesta manera podem concloure que durant el 84% del temps les mosques no es trobaven receptives a cap estímul. Al gràfic 23c l'àrea de "Sense resposta" inclou únicament el temps en què les mosques es mostraven indiferents.

Al gràfic 23d (estadística feta només mitjançant dades de les rondes amb pol·len) es mostra com les mosques van respondre a estímuls olfactoris (de nou, incloent els addicionals) el 32% del temps total d'observació, per tant ignorant-los durant el 68% del temps. Si estudiem la distribució de la preferència de l'insecte dins d'aquest 32%, podem veure que durant el 20% del temps total d'observació les mosques responen al pol·len. Els percentatges de resposta als compostos romanen quasi bé iguals entre ells (pinè un 5% i carè un 7%).

El temps de resposta als estímuls olfactivs (incloent tant els BVOCs com els estímuls addicionals) és del 16% dins el temps total. Aquest percentatge és un 5-6% més del que es mostra a les Figures 23a i 23b, on es mostren els temps de resposta als compostos sense incloure el temps de resposta als estímuls addicionals.

Quan vam tenir en compte només les rondes amb pol·len, el percentatge total de resposta va variar del 16% a la Figura 23c al 32% a la figura 23d. La distribució de la preferència dels dípters dins els temps de resposta afirma que el pol·len és un factor de gran importància per atreure les mosques.

Els percentatges de resposta als compostos són gairebé iguals (només el pinè varia d'un 4% a un 5%), d'aquesta manera suggerint que les respostes als compostos no varien amb la presència de pol·len col·locat en una altra estructura de compost. Si el pol·len s'hagués afegit a les estructures de compost els pol·linitzadors possiblement haurien establert la *compound-reward association*, d'aquesta manera augmentant la seva resposta als compostos.

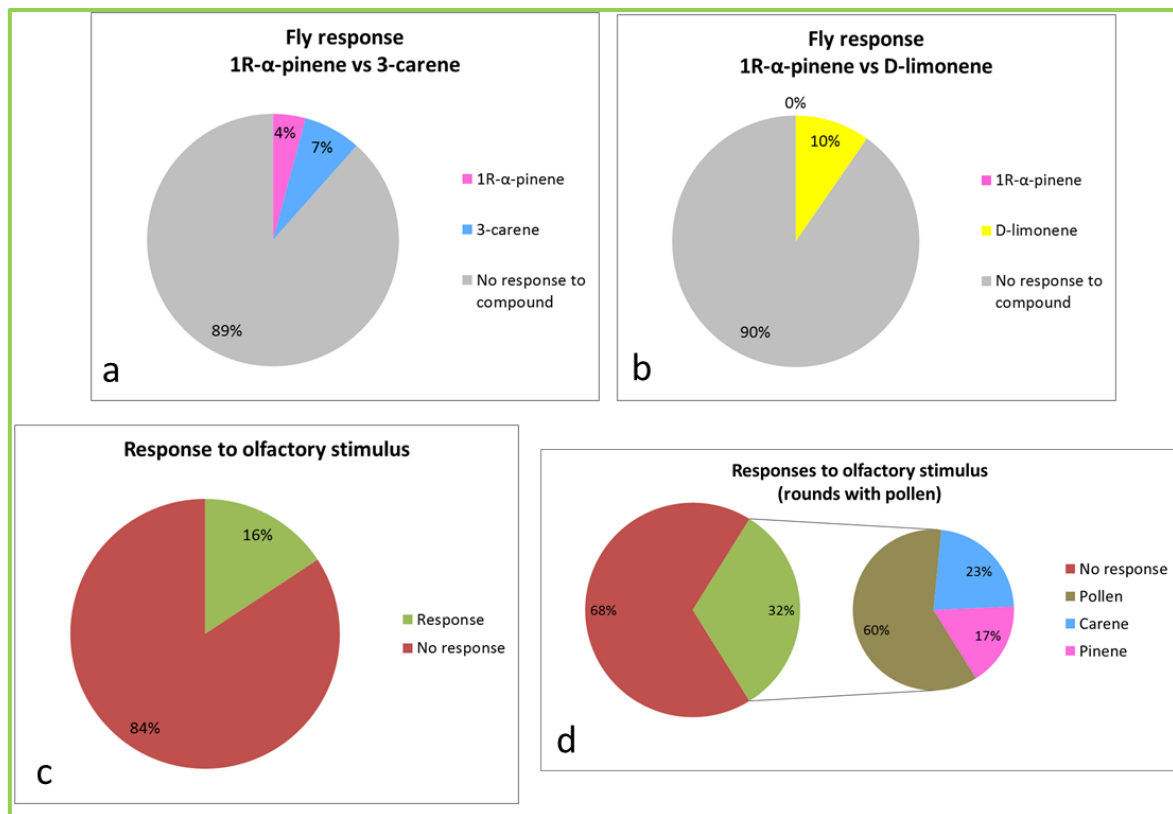


Figura 23. Estudi de la resposta de les mosques sota diversos tractaments estadístics. Veure el text pels detalls.

Els nostres resultats suggereixen que el temps de resposta a estímuls olfactoris representa una considerable minoria en relació al temps d'observació total (Figura 23a, 23b). Considerem que la concentració de la dissolució podria ser encara massa baixa com per atreure altament els pol·linitzadors, essent 1:10 una concentració insuficient per produir les senyals necessàries per atraure les mosques. A recerca prèvia s'ha confirmat que la resposta de pol·linitzadors a l'emissió de compostos varia segons els canvis a la concentració de dissolució. Això suggereix que la que vam utilitzar no era la òptima per atraure els nostres dípters.

Una causa de la baixa resposta podria ser que els compostos escollits per fer l'experiment no siguin els emesos per les flors que usualment pol·linitzen les mosques *Episyrphus balteatus*. Això voldria dir que tant en els cas especialista com en el generalista el reconeixement d'aquests volàtils no estaria inclòs en la base genètica de les mosques. Si això fos cert, la interacció amb els compostos dependria de factors genètics. Per una banda, si aquests pol·linitzadors fossin especialistes (es guien per les seves preferències innates), no serien suficientment flexibles com per experimentar amb compostos desconeguts. D'aquesta manera no interactuarien altament amb els compostos que hem utilitzat. Per una altra banda, si fossin pol·linitzadors generalistes (tenen capacitat d'aprenentatge), serien suficientment flexibles com per experimentar amb nous compostos.

Tot i així, està confirmat en recerca prèvia que els pol·linitzadors aprenen nous aromes quan visiten repetidament una flor i com a conseqüència associen el color i l'aroma de la flor visitada amb el nèctar, el qual constitueix el seu premi. Per tant les nostres mosques, tot i ser generalistes, podrien no arribar a establir la *scent-reward* o la *colour-reward association* perquè el pol·len i la mel van ser utilitzats en poques rondes i sempre dins una font de compost on no hi havia compost volàtil, sinó únicament l'estímul olfatiu addicional. A més, fins i tot si les mosques haguessin rebut sempre pol·len de les estructures falses, el temps de les rondes no hauria sigut suficientment llarg com per permetre que duguessin a terme l'associació.

La baixa activitat envers l'estímul dels compostos podria ser també degut a que els pol·linitzadors se senten més atrets pel conjunt de l'aroma floral que pels compostos de forma individual. Tot i així, a recerca prèvia s'ha confirmat que els compostos poden funcionar com a atractants florals de pol·linitzadors, suggerint d'aquesta manera que l'individualisme de compost no és un problema. A *Electroantennogram responses of Hyles lineata (Sphingidae: Lepidoptera) to volatile compounds from Clarkia breweri (Onagraceae) and other moth-pollinated flowers (Raguso R., Light D., & Pickersky E. (1996))*, podem observar com dins les respostes de l'espècie *Hyles lineata* envers diferents compostos i aromes, les més baixes corresponen a les reaccions envers monoterpenoides individuals. Aquests resultats coincideixen amb els nostres, ja que els compostos escollits pels nostres experiments (3-carè, D-limonè i 1R-a-pinè) són monoterpenoides i les respostes que van general van ser considerablement baixes. Per tant, podem afirmar que l'individualisme de compost no és un problema per generar la resposta dels pol·linitzadors sempre i quan el compost els atregui.

3. Influència del dejuni

La Figura 24 mostra els percentatges de les respostes olfactòries sota els períodes de dejuni A (21 hores), B (6,5 hores), C (5 hores) i D (4 hores), els quals són 16%, 17%, 11% i 27%, respectivament. No hi ha una notable tendència de canvi dins la resposta produïda per aquesta variable.

Això podria ser degut a què les mosques no se senten altament atretes als compostos escollits per fer l'experiment. Tot i la impossibilitat d'establir una tendència dins la influència duta a terme pels diferents períodes de dejuni, la comparació entre rondes amb mosques alimentades i rondes amb mosques amb dejuni ens permet confirmar que les mosques sota un període de dejuni se senten més atretes pels estímuls olfactoris que les mosques alimentades, ja que aquestes es mostraven indiferents.

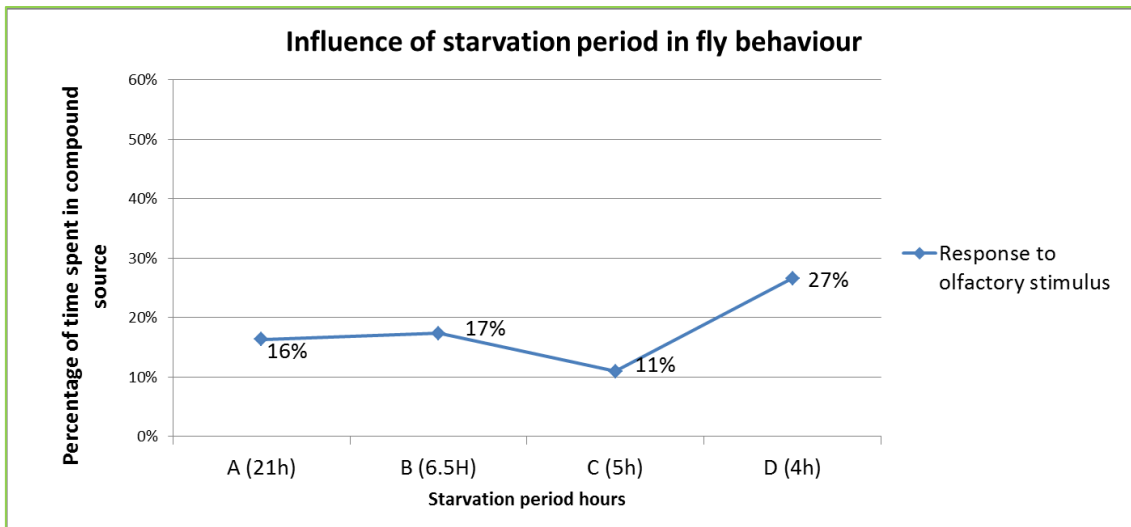


Figura 24. Influència de la quantitat d'hores del període de dejuni al comportament de les mosques.

4. Influència del tipus d'estructura de compost

Els percentatges de resposta a l'estructura de compost 1 va ser del 6%, mentre que a l'estructura de compost 2 va ser del 14%. Els resultats confirmen que l'estructura 2 atreu més els pol·linitzadors que l'estructura 1. Considerem que això és degut a la flor de paper groga, la qual va rebre l'atenció dels pol·linitzadors amb facilitat des del primer moment que la vam utilitzar, d'aquesta manera fent que decidíssim continuar amb ella. Aquest hipòtesi coincideix amb recerca prèvia, la qual confirma que els pol·linitzadors se senten genèticament atrets pel color groc.

Tot i que vam considerar que potser l'estructura 2 seria més eficaç degut a l'absència de microcàpsula, ja que vam pensar que això faria més fàcil l'expansió de l'olor, les microcàpsules utilitzades estaven expressament dissenyades per fer *colour testing*, fet que suggereix que la difusió del compost no s'hauria de veure gens afectada per la seva presència.

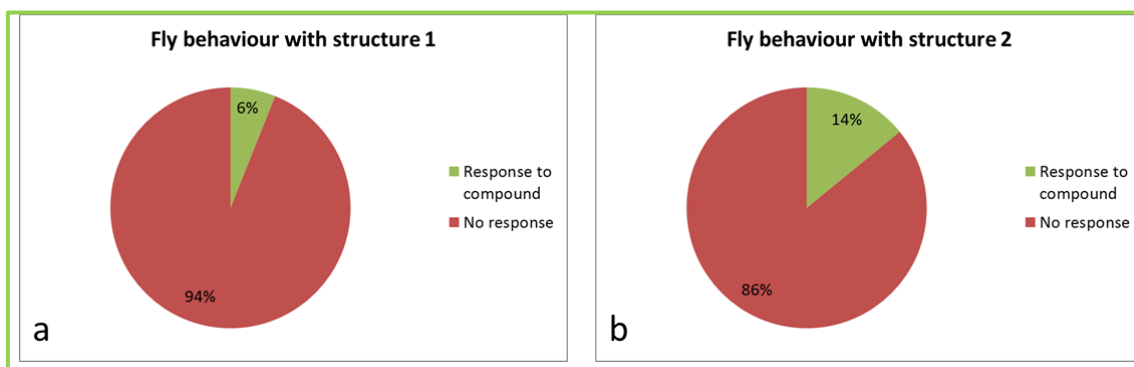


Figura 25. Influència del tipus d'estructura de compost al comportament de les mosques.

5. Preferències cromàtiques

Els percentatges de resposta als estímuls visuals en relació al temps total d'observació van ser del 10.2% a la flor groga falsa, del 9.7% a la flor violeta falsa i del 6.8% a la flor blanca falsa. Els resultats coincideixen amb recerca prèvia. Les flors grogues i violetes van generar més resposta que les flors blanques. Tot i que els percentatges de resposta a les flors grogues i violetes són bastant similars, el percentatge de les flors grogues és més alt, d'aquesta manera confirmant que el grog és el color que atreu més els pol·linitzadors.

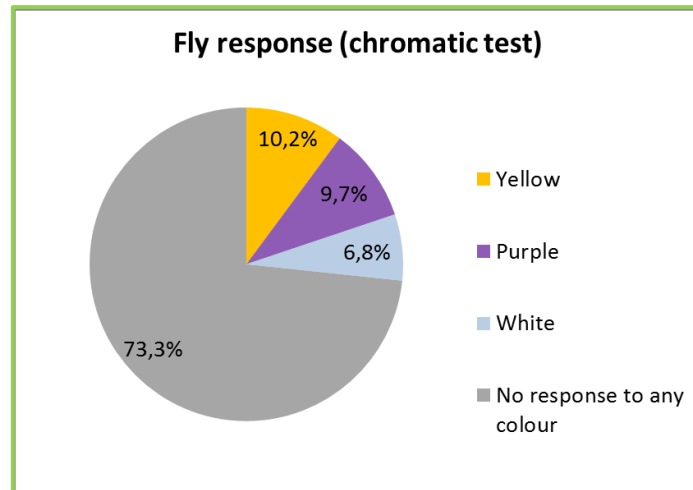


Figura 26. Respostes a les diferents flors falses de color.

5. Conclusió

Les mosques *Episyrphus balteatus* van mostrar una preferència pel compost predit (3-carè) dins la comparació dels dos BVOCs (1R- α -pinè i 3-carè) de l'espècie *Sonchus tenerrimus*. A les comparacions pinè-limonè de l'espècie *Globularia alypum* no podem concretar una preferència ja que només una mosca va respondre a l'estímul dels compostos.

Dins del temps total d'observació el temps de resposta als BVOCs representa una minoria (aproximadament un 10%). El temps de resposta a estímuls olfactivs genèrics (és a dir, incloent els addicionals) és un 5-6% major, suggerint que les substàncies addicionals, com el pol·len, indueixen les respostes dels dípters. Comprovem que això és cert fent estadístiques només amb les rondes on vam utilitzar pol·len, ja que el percentatge de resposta als estímuls olfactivs varia del 16% al 23%.

Aquests resultats estan directament relacionats amb una clara baixa resposta als estímuls als quals vam sotmetre les mosques. Valorem la possibilitat que sigui degut a què els volàtils escollits no siguin els emesos per les flors que usualment pol·linitzen les mosques *Episyrphus balteatus*. En cas de ser una espècie especialista no podria establir l'associació *scent-reward* degut a la seva poca flexibilitat. Si fos generalista, tot i ser flexible, el curt temps de les rondes i l'absència de premi (nèctar, pol·len) a les fonts de compost amb volàtil no li haurien permès establir l'associació. Per tant, no podem determinar si l'espècie és generalista o especialista. Per fer-ho hauríem de realitzar experiments amb l'objectiu que les mosques establissin una associació per color, aroma o premi (nèctar).

Valorem també la possibilitat que sigui degut a què no haguem utilitzat la concentració de dissolució de compost òptima. També vam pensar que els compostos presentats de forma individual podien atreure en menor magnitud les mosques, però a recerca prèvia es demostra que poden funcionar com a atractants de la mateixa manera que els aromes (conjunt de volàtils). Considerem molt vàlida la opció que els monoterpenoides siguin les substàncies volàtils que menys atreuen els nostres insectes, fet també constatat a recerca prèvia.

Comprovem que no hi ha una tendència notable de canvi dins la resposta de les mosques produïda per la quantitat d'hores dins el període de dejuni. Tot i així, les comparacions entre les rondes amb mosques alimentades i mosques sota període de dejuni permeten reafirmar allò demostrat per recerca prèvia: les mosques alimentades tenen menys activitat. L'estructura de compost 2 atreu més els pol·linitzadors que l'estructura 1. Pensem que és degut al seu eficaç estímul visual. A l'experiment cromàtic coincidim amb la recerca prèvia, ja que els colors que resulten més atractants per les mosques són el groc i el violeta.

Veiem que en el moment en què les mosques no se senten atretes pels BVOCs i per tant no poden establir l'associació *scent-reward*, la comunicació entre *pollenizer* i pol·linitzador es veu afectada negativament. Aquesta dificultat d'associació altera greument el procés de pol·linització i per tant, si es dóna en un futur, ens trobarem davant un problema que afectarà massivament els nostres ecosistemes.

Allò que afecta la nostra natura i el nostre planeta, limita la nostra vida i societat. És per això que l'alteració del procés de pol·linització que es preveu conseqüent al canvi climàtic s'ha d'estudiar per intentar preveure com evolucionaran els aromes emesos per les flors i quins impactes podria tenir pel planeta aquesta variació.

Amb aquest treball m'intento unir a la lluita contra el massiu canvi climàtic a partir de l'observació d'uns petits però interessantíssims éssers: les mosques. Tal i com va dir el gran Nikola Tesla: *"El present és d'ells, però el futur, pel qual he treballat tant, és meu"*. Treballem pel futur i així serà nostre i podrem escollir que sigui un futur feliç.

6. Bibliografia

Articles científics

1. Farré-Armengol G. (2014) Changes in floral bouquets from compound-specific responses to increasing temperatures. *Global Change Biology* (2014), doi: 10.1111/gcb.12628.
2. Blanch J., Peñuelas J., & Llusà J. (2007) Sensitivity of terpene emissions to drought and fertilization in terpene-storing *Pinus halepensis* and non-storing *Quercus ilex*. *Physiologia Plantarum* 131:211-225.
3. Wang Y., Owen S., Li Q., & Peñuelas J. (2007) Monoterpene emissions from rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in a changing landscape and climate: Chemical speciation and environmental control. *Global Change Biology* 13:2270-2282.
5. Vanhaelen N., Haubruge E., Gaspar C., & Francis F. (2001) Oviposition preferences of *Episyrphus balteatus*. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet.* 2001;66(2a):269-75.
6. Farhan A., Gulati J., Große-Wilde E., Vogel H., Hansson B., & Knaden M. (2013) The CCHamide 1 receptor modulates sensory perception and olfactory behavior in starved *Drosophila*. *Sci Rep.* 2013 Sep 26;3:2765. doi: 10.1038/srep02765.
7. Goyret J., Pfaff M., Raguso R., & Kelber A. (2008) Why do *Manduca sexta* feed from white flowers? Innate and learnt colour preferences in a hawkmoth. *Naturwissenschaften* (2008) 95:569-576. DOI 10.1007/s00114-008-0350-7.
8. Weiss R. M. (1996) Innate colour preferences and flexible colour learning in the pipevine swallowtail. *Anim. Behav.*, 1997, 53, 1043–1052.
9. Raguso R., Light D., & Pickersky E. (1996). Electroantennogram responses of *Hyles lineata* (Sphingidae: Lepidoptera) to volatile compounds from *Clarkia breweri* (Onagraceae) and other moth-pollinated flowers. *Journal of Chemical Ecology* October 1996, Volume 22, Issue 10, pp 1735-1766.

Pàgines web

1. LastDragon.org – Biodiversity Reference: Images and short accounts of British organisms and habitats. *Episyrphus balteatus*. Marmalade Hoverfly. http://bioref.lastdragon.org/Diptera/Episyrphus_balteatus.html

Llibres

1. Bidlack, & Wayne R. (2000) *Phytochemicals as Bioactive Agents*. Lancaster, PA: Technomic Publishers.